

**Résumés des projets utilisant des animaux à des fins scientifiques autorisés
du 4 janvier 2021 au 30 août 2021**

17525 Les objectifs généraux de ces procédures sont d'étudier

- (i) les principaux facteurs de variation de la dépense énergétique du chien et du chat, notamment en fonction de leur composition corporelle et donc de leur embonpoint,
- (ii) les variations concomitantes de sensibilité à l'insuline dont la baisse est à l'origine de multiples désordres métaboliques en général considérés comme secondaires à l'embonpoint et
- (iii) certains facteurs de variation de l'utilisation de l'énergie des rations, principalement au niveau digestif en fonction du microbiote présent. Les industriels du PetFood sont continuellement à la recherche de formules de haute qualité nutritionnelle et « environnementale » sans toutefois que cela expose les animaux à des risques de surconsommation d'énergie avec les conséquences délétères que cela implique.

Globalement, il s'agit donc d'explorer, d'une part, certains facteurs propres aux animaux (microbiote intestinal, facteurs épigénétiques, nutrition périnatale) et qui peuvent expliquer la propension à l'excès de poids et, d'autre part, certains facteurs alimentaires exposant davantage ces animaux à ce risque, dans la perspective de formuler ultérieurement des aliments le limitant. Pour poursuivre ces objectifs, nous sommes susceptibles de mettre en oeuvre de manière récurrente, sur les animaux, dix-huit chiens et dix-huit chats, de notre animalerie quatre procédures, résumées ci-dessous et décrites en détail au chapitre 4.

1. Détermination de la composition corporelle par dilution d'eau deutérée (2H₂O)

L'objectif est de déterminer la composition corporelle qui est en effet un élément déterminant de la dépense énergétique. La procédure consiste en deux prélèvements de sang, l'un basal, l'autre 2 ou 4 heures après injection d'une dose d'eau deutérée (au maximum 500 mg/kg).

2. Détermination de la sensibilité à l'insuline par la technique du clamp euglycémique hyperinsulinémique

Cette méthode est la méthode de référence pour la détermination de la sensibilité à l'insuline. Pendant quatre heures, les animaux sont équipés de deux cathéters permettant la perfusion d'insuline et de glucose, d'une part, et des prélèvements de sang, d'autre part.

3. Détermination de la dépense énergétique au repos par la méthode des échanges respiratoires

La dépense énergétique est fortement corrélée à la production de dioxyde de carbone et au quotient respiratoire (CO₂ produit/O₂ consommé) qui indique la nature des substrats oxydés.

Les animaux sont placés pendant au maximum 4 heures (détermination d'autant plus précise que la durée d'enregistrement est plus longue) dans une cage assujettie à un dispositif assurant la ventilation et la mesure de la concentration en gaz de l'air entrant (inspiré) et sortant (exhalé) de la cage.

Les procédures 1, 2 et 3 pourraient être mises en oeuvre trois fois par an pour certains animaux. Toutefois, la procédure 2 ne sera pas mise en oeuvre plus d'une fois par chat et par an.

Ces procédures concerneront au total dix-huit chiens et dix-huit chats.

Les animaux dont on déterminera la dépense énergétique et la composition corporelle sont soit des animaux déjà présents dans notre animalerie et inclus dans des projets impliquant tous des procédures classées légères sans aucune ambiguïté soit de nouveaux animaux arrivés pour renouveler les panels d'animaux vieillissants.

4. Détermination de la digestibilité d'aliments industriels ou ménagers chez le chien et le chat (et détermination concomitante des paramètres urinaires)

Nous utilisons à cette fin deux groupes de six chiens (12) et deux groupes de six chats (12). L'effectif de chaque groupe est celui minimal pour obtenir des informations valides.

Cette procédure implique, outre le contrôle individuel de la consommation alimentaire, la collecte quantitative et également individuelle des matières fécales.

Pour ce faire, pour la détermination de la digestibilité d'un aliment, six chiens ou six chats sont placés dans des cages pour une durée de 5 et 11 jours respectivement.

Cette procédure sera, au maximum, mise en oeuvre quinze fois par an et par animal pour les chiens et dix fois pour les chats.

Au total ce projet utilisera 60 animaux. Il sera réalisé dans le respect de la règle des 3R :

Remplacer : Le chat et le chien sont les espèces cibles et il n'existe pas de modèle ou moyen alternatif qui ne soit pas in vivo

Réduire : Le nombre d'animaux est réduit au minimum afin de pouvoir effectuer une analyse statistique descriptive.

Raffiner : Le bien-être des animaux sera surveillé tout au long des protocoles par leur observation quotidienne. Les conditions d'hébergement et les méthodes expérimentales utilisées seront les plus adaptées pour réduire toute souffrance et tout dommage que pourraient ressentir les animaux.

17526 L'épilepsie touche plus de 50 millions de personnes dans le monde. Dans environ un tiers des cas, les patients continuent de présenter des crises fréquentes malgré les traitements antiépileptiques. Il est nécessaire de développer de nouvelles méthodes thérapeutiques. L'épilepsie du lobe temporal mésial (MTLE) est la forme la plus commune d'épilepsie réfractaire. La plupart des caractéristiques morphologiques et électrophysiologiques du MTLE humain peuvent être reproduites chez la souris par l'injection de kaïnate au niveau de l'hippocampe dorsal (modèle KA). Les souris ont un cerveau assez complexe pouvant générer les activités épileptiques. Le projet constitue un essai sur l'impact de la perméabilisation de la barrière hémato-encéphalique (BHE) par l'utilisation ciblée d'ultrasons de basse intensité et l'ablation thermique de lésions épileptogènes par ultrasons de haute intensité, méthodes non invasives. La perméabilisation de la BHE permet le passage dans le cerveau de médicaments mais également des composants sériques stimulant la neurogenèse (développement du système nerveux.). Notre hypothèse repose sur les bénéfices que pourrait apporter l'induction de cette neurogenèse sur les symptômes épileptiques de notre modèle, et à plus long terme sur le patient. L'ablation thermique par ultrasons vise aux mêmes résultats que les techniques chirurgicales mais de manière non invasive. L'utilisation de méthode pouvant enregistrer l'activité cérébrale et des études de structure du cerveau nous permettra de répondre à ces questions. Bien que les animaux ne puissent pas être remplacés dans nos expériences, nous prenons les mesures afin de réduire leur utilisation. Nous raffinons sans cesse l'hébergement et utilisation des animaux afin de réduire la douleur, l'angoisse et le stress. L'enrichissement (maisonnettes et neslets) est ajouté pour toutes les cages. Un nombre de 236 (au maximum) souris sera utilisé. L'ensemble du projet est mis en oeuvre dans l'application des 3 R : Remplacement, Réduction, Raffinement :

- Remplacement :Le développement au niveau cérébral implique des interactions cellulaires complexes, entre les cellules endothéliales mais également entre les capillaires sanguins et le tissu neuronal, neurones et astrocytes, et les cellules immunitaires. Cette complexité est difficile à reproduire in vitro et nécessite donc l'utilisation d'animaux notamment dans notre cas d'épilepsie focale et le remplacement complet n'est pas possible.

- Réduction : l'ensemble des expérimentations sont effectués de manière à réduire le nombre d'animaux utilisés. La stratégie expérimentale se fait en étape permettant d'appréhender et d'optimiser la taille des lots expérimentaux.

- Raffinement : l'hébergement ainsi que les procédures seront optimisés et dans le but d'améliorer les conditions expérimentales et d'hébergement. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour diminuer la souffrance lors des interventions sur les animaux. Des protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis. A chaque fois qu'il est possible les animaux sont hébergés en groupe

dans des cages, enrichies de modules permettant de diversifier leurs activités, et sont observés au quotidien par une équipe en charge de leurs soins.

17527 La fertilité dépend de l'activité de neurones cérébraux spécialisés, les neurones à GnRH (GnRH : gonadotropin-releasing hormone) de l'hypothalamus. La GnRH est sécrétée dans le sang et est responsable de l'ovulation et la production des spermatozoïdes. Ces neurones, en plus de la GnRH, élaborent et sécrètent différents messagers chimiques qui agissent par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques, soit sur les neurones eux-mêmes, soit sur leur entourage immédiat ou encore à distance. Le dérèglement de ces mécanismes conduit à une sécrétion inadéquate de GnRH et donc à des désordres de la puberté voire à l'infertilité.

Parmi ces messagers chimiques, nous nous intéressons aux tachykinines et à leurs récepteurs. Nous voulons poser des questions simples : 1) quels neurones à GnRH élaborent tachykinines et récepteurs ?, 2) à partir de quel âge postnatal ?, 3) y-at-il une différence entre sexe, si oui quel est le rôle des hormones sexuelles ?, et 4) quelle sont les actions des tachykinines sur les neurones à GnRH ?

L'ensemble de ce projet nécessite l'utilisation de 360 souris C57BL/6J. Il n'existe actuellement pas de modèle in vitro et donc de méthode alternative permettant de REMPLACER les animaux. Afin de respecter la règle des 3R, nous avons REDUIT à 360 le nombre d'animaux que nous prévoyons d'utiliser pour une période de 5 ans. Il s'agit du nombre minimal d'animaux nécessaire à l'obtention de données de qualité exploitable et permettant une analyse statistique fiable. La mise en évidence des tachykinines va impliquer l'injection préalable de drogues pour favoriser leur accumulation dans les neurone et faciliter leur détection. L'effet délétère de ces drogues est connu pour apparaître 24 heures après l'injection. C'est pourquoi nous avons prévu d'euthanasier les 35 souris injectées avec ces drogues moins de 24 heures après l'injection.

Des mesures de RAFFINEMENT seront mises en place durant toute la durée du projet. Les animaux seront hébergés au sein d'un établissement utilisateur agréé dans des conditions d'hébergement favorisant leur bien-être (enrichissement, suivi quotidien par du personnel qualifié). Enfin, des points-limites ont été établis entraînant une prise en charge de l'animal afin d'anticiper toute souffrance et réduire au mieux l'inconfort des animaux (anesthésie, analgésie, gel oculaire, tapis chauffant. . .).

17528 Le cancer de l'ovaire est la pathologie gynécologique associée à la plus forte mortalité dans les pays développés. La plupart des patientes diagnostiquées le sont à des stades avancés de la maladie, lorsque le cancer présente déjà des métastases au-delà de l'ovaire. Tandis qu'on observe souvent une réponse initiale à la chirurgie et la chimiothérapie, le pronostic à long terme est généralement non favorable, associé à l'apparition de récives et à la mise en place de mécanismes de résistance aux médicaments. Il existe donc un besoin important d'identifier de nouveaux agents thérapeutiques prolongeant la durée de survie et contrecarrant les résistances qui s'établissent. Dans l'optique du développement de telles molécules, les modèles expérimentaux chez la souris permettent d'étudier la biologie de la tumeur en réponse à de nouveaux traitements. L'objectif de ce projet est d'évaluer le potentiel anti-tumoral d'un candidat médicaments qui a déjà fait état de fortes propriétés anti-tumorales en laboratoire en "assoiffant" les tumeurs (c'est à dire en les privant de vascularisation) et en éduquant le système immunitaire à combattre les cellules cancéreuses. Le candidat médicament en question cible une molécule surexprimée au niveau de la tumeur, limitant ainsi les effets secondaires du traitement.

L'éventuel effet anti-tumoral du produit sera testé dans un modèle d'implantation tumorale, en considérant l'inoculation de cellules cancéreuses ovariennes de souris dans des animaux ayant une immunité normale. Trois sites d'implantation des cellules tumorales seront considérés chronologiquement : une implantation sous-cutanée (mimant le développement d'une tumeur primaire), un modèle de dissémination métastatique intra-péritonéale, et un modèle impliquant l'implantation des cellules directement dans la bourse de l'ovaire (chirurgie). Ce dernier modèle, plus représentatif de la réalité pathophysiologique (modèle translationnel) permettra de mettre en

évidence un effet "mémoire" de la réponse immunitaire anti-tumorale médiée par le traitement expérimental (seules 3 administrations seront réalisées).

Un nombre maximal de 20 souris par condition expérimentale sera considéré (compte-tenu des différences d'expression tumorale des cibles moléculaires au sein d'une même colonie de souris), y compris pour les contrôles en présence d'un produit supposé inactif ou du solvant seul, en ne considérant par souci de reproductibilité que des souris femelles âgées de 8 semaines (à l'implantation des cellules). Une première étude sur un nombre d'animaux restreint permettra de déterminer le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir un résultat statistiquement significatif, en conservant la limite de 20 animaux par groupe. L'absence d'effet anti-tumoral des candidats médicaments durant cette phase pilote impliquera l'arrêt de la procédure. Pour chaque procédure et en cas d'effet avéré du produit testé, la spécificité d'action vis à vis de sa cible moléculaire sera vérifiée dans des souris n'exprimant pas la molécule ciblée.

Le nombre maximal d'animaux considéré est par conséquent de 490 souris, pour un projet d'une durée maximale de 5 ans.

La réalisation d'une étude préliminaire, l'aspect séquentiel des procédures, une étude approfondie de la littérature ainsi que l'utilisation de tests statistiques adaptés, sont autant d'efforts mis en oeuvre pour réduire le nombre d'animaux utilisés dans la présente étude. Dans un souci de raffinement, nous veillerons à améliorer le bien-être des animaux utilisés (suivi quotidien, éléments placés dans la cage pour favoriser la motricité, etc...) et à diminuer les contraintes qu'ils subissent. De même, l'acte chirurgical nécessaire à la mise en place du modèle de chirurgie (bourse de l'ovaire) fera l'objet d'une procédure d'anesthésie adaptée et de soins post-opératoires. De plus, il n'existe aucun modèle *in vitro* permettant de mimer à la fois le microenvironnement tumoral afin d'étudier la réponse immunitaire et l'efficacité d'un traitement.

Les propriétés inhibitrices de la vascularisation tumorale du produit testé ont déjà été largement démontrées dans les modèles *in vitro* et *ex vivo* et la littérature concernant les cibles moléculaires soutient la pertinence d'un tel outil thérapeutique. Ces expérimentations, dont le bénéfice attendu est une diminution significative du volume tumoral et/ou de la longueur et du volume moyens des vaisseaux sanguins alimentant la tumeur, constituent un prérequis indispensable afin de consolider la preuve de l'efficacité du candidat médicament avant d'envisager son utilisation dans le cadre d'essais cliniques.

Les effets attendus du produit sont supposés se restreindre à l'environnement tumoral, au sein duquel la molécule ciblée est fortement surexprimée. Cependant, un suivi quotidien des animaux sera assuré afin de limiter toute souffrance. Ainsi, toute modification du comportement (isolement, anxiété, ataxie) sera une indication pour la prise en charge des animaux qui pourra mener à l'euthanasie, en accord avec le comité du bien être animal. Il en est de même pour tout gain ou perte important(e) de masse corporelle (15% de la masse des animaux), ou encore en cas de distension abdominale importante sous l'effet de la production d'ascites (fluides abdominaux générés dans le modèle de dissémination péritonéale).

17529 La valorisation de la ration des bovins en croissance se traduit par une accréation de protéines dans les tissus, en particulier les tissus musculaires (production de viande). Cette rétention azotée ne peut être appréhendée *in vivo* que par la mesure de « bilan azoté », c'est-à-dire par différence entre l'azote ingéré d'une part, et de l'azote excrété dans les fèces et dans l'urine d'autre part. On fait alors l'hypothèse que la rétention azotée effective correspond au bilan azoté mesuré. Cette hypothèse suppose que chacune des composantes de ce bilan est mesurée sans biais, ou du moins avec un biais négligeable. En pratique, ce biais n'est pas négligeable, et peut atteindre plus de 10% de l'azote ingéré. Le moyen le plus efficace pour réduire ce biais est d'effectuer une collecte totale des fèces et urines sur une durée assez longue jusqu'à 10 jours en pratique. ou de répéter la mesure, sur des animaux à l'attache en stalles à digestibilité. Cette pratique demande à être affinée pour la restituer dans la perspective des 3R. C'est le principal objectif de cette étude qui vise à évaluer, parmi les différents facteurs méthodologiques susceptibles d'impacter la précision des mesures de bilan azoté, les effets de la durée des mesures, et de leur répétition. Cet essai visera également à évaluer les effets des méthodes d'échantillonnage, de conditionnement et de mesure

de l'azote dans les échantillons. En respect de la règle des 3Rs, les bovins, animaux cibles de l'étude, ne peuvent être remplacés car le projet vise d'une part à obtenir des éléments objectifs permettant de faire évoluer la méthode de référence de mesure in vivo de la rétention azotée chez les bovins en croissance, et contribue d'autre part au développement de proxies non invasifs de ce phénotype. Le recours à ce modèle animal est donc indispensable pour cette expérimentation. Il est proposé de réaliser cette étude en minimisant le nombre d'interventions sur chaque animal (4 prises de sang au cours des 10 mois d'engraissement) en raffinant les conditions d'hébergement, conduite des animaux en lot et en stabulation libre (stabulation non entravée, animaux non attachés), et sur un nombre réduit mais suffisant d'animaux ($n = 16$) pour mettre en évidence les relations recherchées. De plus, les prélèvements ne devraient pas générer de souffrance à l'animal. Cependant, si des signes de douleur au moment du prélèvement étaient observés (agitation, sensibilité au toucher), la suspension des prélèvements serait décidée le temps que le problème soit résolu et un traitement symptomatique sera administré à l'animal en cas de douleur. Parallèlement, le comportement des animaux sera suivi par des capteurs afin d'essayer d'évaluer leur éventuel inconfort en stalle à digestibilité. Enfin, des prélèvements de sang, de fèces, d'urines et de jus de rumen seront réalisés pour abonder la recherche de proxies de la digestibilité et de l'efficacité alimentaire qui pourraient se substituer à terme aux mesures de bilan sur animaux à l'attache. Cet essai s'inscrit dans un projet Européen qui vise à mettre en réseau les infrastructures de recherche européennes sur l'alimentation des bovins, et à en améliorer l'offre méthodologique dans une logique des 3R.

17530 Il a récemment été démontré que l'exposition à un régime supplémenté en acides biliaires, mimant une atteinte hépatique, a un impact délétère sur la physiologie testiculaire et la fertilité masculine. Cet effet semble en partie médié par deux récepteurs majeurs des acides biliaires: le récepteur nucléaire FXR α et le récepteur membranaire TGR5. Le récepteur membranaire aux acides biliaires TGR5 est exprimé dans la lignée germinale cependant le rôle des signalisations par les acides biliaires sur le développement de la lignée germinales sont peu connus; ce qui ne permet pas de pleinement comprendre l'origine de l'infertilité associée aux troubles hépatiques et l'augmentation des concentrations en acides biliaires. Il est donc essentiel de mieux comprendre l'impact que pourraient avoir les acides biliaires directement sur la lignée germinale in vivo. La spermatogenèse est un phénomène complexe impliquant des interactions entre divers types cellulaires et qui dure 35 jours chez la souris. De plus il y a la nécessité de prendre en considération les périodes de la vie pré-pubertaires (cellules germinales indifférenciées) et post-pubertaire (spermatogenèse active). Un des moyens couramment utilisé dans la littérature pour ce type d'analyse est d'exposer les animaux à une injection de busulfan 20mg/kg. Ce traitement permet de détruire la lignée germinale dès 4 semaines après l'injection. De manière intéressante, cet effet du busulfan est transitoire puisque dès 8 semaines après le traitement la lignée germinale recolonise l'épithélium séminifère avec une restauration du poids testiculaire et de l'histologie. Dès 12 semaines environ la recolonisation est quasi complète avec un retour du testicule à un poids normal. Cette approche est donc un système précieux pour mieux comprendre la physiologie des cellules germinales et leur capacité de prolifération et de différenciation. Nous souhaitons donc utiliser cette approche afin de mettre en évidence l'impact des acides biliaires sur les fonctions clés de la lignée germinale (prolifération/différenciation). Pour cela, les mâles de 8 semaines, matures sexuellement, seront traités avec une seule injection intra-péritonéale de busulfan (20mg/kg) avec le co-traitement d'un régime supplémenté en acides biliaires (0,5% acide cholique). L'analyse des animaux traités ou non avec le busulfan et exposés ou non aux acides biliaires nous permettra de déterminer l'impact des acides biliaires sur les capacités de la lignée germinale à recoloniser l'épithélium séminifère. Cela fera 4 groupes d'analyse véhicule, véhicule+CA; busulfan et busulfan+CA. Nous réaliserons ces 4 groupes sur 3 génotypes: des animaux contrôles (WT) et d'autres invalidés pour le gène codant le récepteur TGR5 (KO) ainsi que les animaux hétérozygotes (wt/KO). Cela fera donc 12 groupes au total. Les analyses de la spermatogenèse se feront sur 3 mois avec un prélèvement sur un groupe de souris à 1 semaine, 2 semaines, 4 semaines, 6 semaines, 8 semaines et 12 semaines après le traitement au busulfan; soit 6 timing analysés. Afin d'obtenir des résultats fiables nous prévoyons 10 souris par groupe. Nous utiliserons une analyse ANOVA pour

mesurer l'interaction entre les facteurs busulfan et acides biliaires. Le nombre de souris sera de 10 (souris par groupe)*6 (nombre de timing)* 4 (nombre de conditions de traitement)*3 (nombre de génotypes analysés)=720 Nous souhaitons pouvoir faire ces analyses sur trois expériences indépendantes pour valider la reproductibilité des résultats. Cela nous amènera à utiliser un nombre total de souris de 2160 sur les 5 ans.

L'ensemble de ce projet s'intègre au mieux dans le respect de la règle des 3R.

Le remplacement par des approches alternatives n'est pas possible car aucune approche ne permettrait d'analyser l'impact à long terme sur la fertilité à l'âge adulte puisque cela nécessite un modèle vivant intégré. Cependant, dans une logique de réduction du nombre d'animaux, nous avons calculé au plus juste le nombre d'animaux utilisés, de façon à obtenir des données statistiquement valides. Le raffinement reposera sur un hébergement et une surveillance des animaux ainsi que l'élaboration de protocoles prenant en compte au maximum le bien-être animal. Cela s'accompagnera notamment d'un enrichissement des cages (tunnel en carton et maisons à souris). Les souris seront hébergées en groupes sociaux avec des tailles de cages conformes à la législation en fonction du nombre de souris.

17531 La mémoire de reconnaissance sociale consiste à différencier un congénère inconnu d'un congénère familial, et elle est altérée dans la plupart des maladies psychiatriques. Chez l'Homme, comme chez les rongeurs, un fonctionnement normal de l'hippocampe est requis pour ce type de mémoire et l'incapacité de se rappeler ses interactions sociales est une caractéristique majeure des patients avec des lésions hippocampiques. L'implication d'une petite sous-région de l'hippocampe (région CA2) dans la formation de cette mémoire a récemment été démontrée, ainsi que sa vulnérabilité dans plusieurs pathologies psychiatriques, dont la schizophrénie. Cependant l'étude des mécanismes cellulaires a aussi montré que d'autres structures cérébrales pourraient influencer l'activité du CA2 selon le type (olfactif, social ou contextuel) d'information à mémoriser.

Ce projet a pour but de caractériser les régions cérébrales respectivement activées par une information sociale ou contextuelle chez la souris. Pour cela nous utiliserons des approches d'infections virales sur des souris transgéniques permettant d'inactiver ou d'activer spécifiquement les structures cérébrales-cibles afin :

- d'étudier les circuits cérébraux activés par la composante olfactive de stimuli sociaux et de définir leurs liens anatomiques et fonctionnels avec la région CA2 de l'hippocampe.
- d'étudier les réponses comportementales de ces animaux en réalisant des tests olfactifs, sociaux et cognitifs
- d'étudier l'activité cérébrale par imagerie in vivo pendant des stimulations olfactives ou sociales ou au cours de la mémoire sociale. Nous utiliserons une technique d'imagerie ultrasonore fonctionnelle (fUS) en temps réel, sorte d'échographie qui permet d'étudier l'activité et la connectivité cérébrale chez l'animal vigile.

Ces études seront aussi réalisées dans un modèle murin de schizophrénie dans lequel le fonctionnement de la région CA2 de l'hippocampe et la mémoire de reconnaissance sociale sont altérés (lignée LgDel, qui présente une délétion homologue à celle correspondant au plus fort facteur de risque de développer la pathologie chez l'Homme).

Amendement 1: ajout d'une nouvelle lignée de souris permettant de changer la stabilité intrinsèque de certains récepteurs aux neurotransmetteurs pour moduler la plasticité synaptique dans des neurones cibles.

Enfin, l'effet bénéfique potentiel d'un enrichissement contrôlé de l'environnement pendant trois semaines sera étudié sur les différents paramètres anatomiques, comportementaux et fonctionnels chez les souris contrôles et transgéniques. Dans le modèle LgDel, nous évaluerons son impact sur la mémoire sociale et l'activité cérébrale des souris déficientes, dans le but de proposer une piste thérapeutique.

Pour ce projet nous utiliserons 1224 souris pour une durée de cinq ans.

Amendement 1: 1242 souris avec ajout de 18 animaux pour nouvelle lignée.

L'utilisation de modèles animaux est indispensable pour étudier la transmission de l'information entre différentes régions cérébrales et l'impact de modifications d'activité neuronale sur le comportement animal envisagés dans ce projet. Aucun modèle in vitro ne permet de remplacer les expériences envisagées. L'utilisation du modèle souris nous permet de mimer la physiologie et la pathologie humaine et de corrélérer les modifications anatomiques et physiologiques observées in vivo à des déficits comportementaux (sociaux, cognitifs ou sensoriels). Ces approches expérimentales ne peuvent pas être remplacées par des méthodes substitutives (Remplacement). Pour réduire le nombre d'animaux, nous avons estimé la taille des échantillons permettant une analyse statistique efficace des résultats grâce aux données collectées au cours d'expériences précédentes (Réduction). Pour éviter toute souffrance les procédures de chirurgie se feront sous anesthésie générale. Les animaux seront observés et manipulés quotidiennement afin de minimiser le stress et la douleur qui seront évalués à l'aide de points limites adaptés à chaque procédure (Raffinement). La réalisation de ce projet apportera des données nouvelles sur les réseaux neuronaux impliquant le CA2 dans la mémoire sociale, sur leurs modifications fonctionnelles dans un modèle de schizophrénie et sur l'effet bénéfique potentiel d'un enrichissement de l'environnement sur les réponses sociales qui sont perturbées dans les pathologies psychiatriques.

17532 La Spondyloarthrite (SpA) est un rhumatisme inflammatoire chronique fréquent au sein de la population adulte française. L'allèle HLA-B27 du complexe majeur d'histocompatibilité est fortement associé au développement de SpA et constitue le facteur génétique principal multipliant le risque de développer cette maladie par 40. Malgré une association démontrée il y a plus de 45 ans, nous ne savons toujours pas à l'heure actuelle la raison pour laquelle le HLA-B27 confère cette prédisposition. La dissection des mécanismes impliqués dans l'association HLA-B27/SpA revêt une importance toute particulière car la spondylarthrite est une maladie fréquente, touchant 0,45% de la population adulte en France, soit près de 200 000 personnes. De manière importante, peu de traitements sont à l'heure actuelle efficaces et ciblent essentiellement les conséquences de l'état inflammatoire, aucun traitement curatif n'étant disponible. Plusieurs modèles de la SpA chez la souris existent mais ne reproduisent que partiellement la pathologie humaine. Le seul modèle récapitulant toutes les atteintes de la SpA est le rat transgénique pour le HLA-B27. Ainsi, ce modèle est considéré comme le modèle le plus pertinent d'étude de la pathologie. Dans ce modèle surviennent spontanément toutes les manifestations de la SpA : inflammation articulaire chronique ou récidivante, prédominant aux pattes arrière, inflammation intestinale chronique qui se manifeste par une diarrhée et atteintes inflammatoires de la peau et des ongles (psoriasis). Le développement de ces symptômes cliniques nécessite une flore microbienne conventionnelle, ainsi les rats HLA-B27 axéniques ne développent pas de SpA. Notre objectif principal est de déterminer l'influence des différents constituants du microbiote sur les cellules du système immunitaire du rat HLA-B27 conduisant au développement de la SpA. Des études précédentes de notre laboratoire utilisant le modèle de rats transgéniques HLA-B27 ont révélé le rôle crucial des cellules présentatrices d'antigène exprimant le HLA-B27 et des lymphocytes T dans le déclenchement de la maladie. Cependant les mécanismes précis impliqués dans ce phénomène ne sont pas encore élucidés. Les objectifs majeurs de notre projet sont d'étudier plus précisément les sous-populations lymphocytaires impliquées dans la pathogénie de la SpA et l'influence du microbiote sur leur activation. L'utilisation de rats HLA-B27 NUDE (rats athymiques dépourvus de lymphocytes T), protégés du développement de la SpA permettra de préciser le rôle de lymphocytes particuliers dans l'initiation de la SpA après reconstitution. Une meilleure compréhension du rôle pathogène de ces lymphocytes pourra conduire à proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Dans un deuxième temps, la colonisation des animaux HLA-B27 par des bactéries candidates isolées ou à partir de selles de patients atteints de SpA permettra de déterminer le rôle de certains composants du microbiote sur l'initiation ou la pérennisation de la maladie. Pour caractériser les différents types de lymphocytes impliqués, nos expériences consisteront d'abord à comparer les rats malades (HLA-B27) à des rats témoins (non transgéniques ou portant un transgène témoin non associé à la maladie : le HLA-B7). En accord avec la règle des 3R, les organes (rate, moelle osseuse, ganglions, sang, principalement, mais aussi intestin, caecum, colon, plaques de Peyer, thymus) et pattes de chaque rat seront prélevés après mise à mort par asphyxie au CO₂ pour ensuite être utilisés par

les expérimentateurs à des fins différentes. Les animaux seront maintenus par cage de 2 ou 3 animaux, avec des changes de cages fréquents en cas de symptômes intestinaux. En cas de douleur, l'administration d'un analgésique est prévue pour le confort des animaux. Dès que possible, afin de réduire le nombre d'animaux nécessaires, nous utiliserons des lignées de culture primaire établies dans notre laboratoire pour disséquer des mécanismes cellulaires in vitro. Pour établir la pathogénicité lymphocytaire et des bactéries du microbiote impliquées dans la SpA, nous utiliserons 684 animaux. Ce nombre correspond au calcul du nombre minimal de rats nécessaires (réduire) pour obtenir une significativité avec une puissance de 0,9 et un risque α de 0,05.

17533 Malgré de grandes avancées dans la prise en charge des nouveau-nés prématurés, il reste fréquent qu'ils développent des séquelles neurodéveloppementales. L'une des explications à ce phénomène, outre leur état de santé et de développement, réside dans le fait que lors de leur intégration en unité de soins intensifs ils sont soumis à de nombreux stress pouvant perturber la mise en place de leur système nerveux encore en maturation. En particulier, il a déjà été démontré que les procédures douloureuses répétées qu'ils subissent lors des soins peuvent avoir un impact négatif sur le développement cérébral et les fonctions associées, notamment une altération à long terme de leurs réponses sensorielles.

Cependant, l'intégration en soins intensifs induit également un stress environnemental important du fait d'une sur-stimulation sensorielle, qui inclut une surexposition à des flashes lumineux et à des pics sonores. Ces variations environnementales ont un effet immédiat sur les enfants, engendrant une augmentation de leurs réponses autonomes et une augmentation de la probabilité d'éveil, ce qui pourrait avoir des effets délétères sur leur neurodéveloppement. Par ailleurs, ces stimulations induisent une modification du comportement et des réponses faciales qui pourraient être assimilées à des réponses de douleurs. Ces stress environnementaux s'ajoutent à une séparation parentale et à un manque d'interaction sensorielle avec les parents du fait de l'intégration en couveuse. L'objectif du projet sera donc de déterminer i) l'impact de ces stress environnementaux sur le neurodéveloppement des nouveau-nés et ii) leurs effets à long terme sur le système nerveux, en particulier le système nociceptif.

Ce projet est réparti sur 5 ans et nécessite 800 rats Sprague-Dawley. Il vise à modéliser chez le rat les stress précoces non douloureux liés à la prise en charge des enfants en unités de soins intensifs (pics sonores et flashes lumineux, associés ou non à une séparation maternelle) et à en déterminer les impacts à court et long terme sur le neurodéveloppement. Grâce à l'utilisation d'une batterie de tests neurodéveloppementaux, l'effet à court terme de chacun de ces stress et de leur combinaison sera mesuré. Ensuite, l'évolution des comportements nociceptifs, sociaux et d'anxiété/dépression chez les animaux jeunes et adultes seront suivis à l'aide des tests classiques caractérisés dans la littérature. Les résultats obtenus durant cette étude permettront d'apporter des informations clés pour améliorer l'environnement et la prise en charge des enfants intégrés en unités de soins intensifs.

La règle des 3R sera mise en œuvre à travers les procédures suivantes : i) Raffinement par hébergement en cages collectives enrichies (bâton de bois à ronger) après sevrage et maintien des fratries selon les sexes dans le but de préserver les interactions sociales entre congénères, et par une utilisation appropriée d'agents anesthésiques et antalgiques lors des procédures invasives ii) Réduction par l'utilisation d'un nombre d'animaux permettant d'obtenir des résultats exploitables en termes statistiques ainsi qu'un calcul spécifique du nombre d'animaux nécessaires, et iii) Remplacement : les processus nociceptifs nécessitent une organisation anatomique complexe et il est par conséquent impossible pour mener à bien cette étude de se passer de sujets vivants dotés d'un cortex cérébral.

17534 Le traitement de nombreuses pathologies cancéreuses ou bénignes nécessite, en complément d'un traitement médicamenteux, de la chirurgie.

La chirurgie conventionnelle passant par une ouverture cutanée, et communément appelée chirurgie ouverte, présente des risques pour le patient. En effet un temps de récupération long, des

douleurs post opératoires intenses et une augmentation du risque infectieux sont les inconvénients majeurs d'une telle intervention.

Depuis de nombreuses années des techniques dites mini invasives, comme la coelioscopie, se développent. Cette technique, permettant d'opérer à travers de petites incisions, devenue depuis un standard en chirurgie, présente un avantage majeur, celui de diminuer les contraintes rencontrées en chirurgie ouverte, mais présente certaines limites. Lors d'une intervention chirurgicale coelioscopique, les instruments utilisés sont totalement rigides dépourvus d'articulation, l'endoscope (caméra) qui permet la vision sera contrôlé, non pas par le chirurgien opérateur, mais par un tiers. Durant toute la totalité de l'intervention chirurgicale, le chirurgien sera debout au-dessus du patient dans une position inconfortable ce qui pourrait avoir un impact sur la concentration et l'état général de ce dernier.

Voilà pourquoi une nouvelle forme de chirurgie mini invasive a vu le jour, la chirurgie mini invasive robotique assistée. Cette dernière approche va combiner les avantages des deux autres et en apporter de nouveaux. Le chirurgien va travailler assis à une console, avec une vue en trois dimensions, contrôlant des instruments complètement articulés et cela en toute autonomie.

Aujourd'hui, les chirurgiens qui souhaitent accéder à la robotique doivent se former.

Il existe du personnel qualifié en robotique travaillant dans des centres spécialisés qui permettent la prise en main de ces nouveaux dispositifs et proposent différents modèles de chirurgie.

Après des phases de formation en simulation virtuelle, sur modèles en plastique, il reste une étape indispensable pour que ces chirurgiens soient prêts à opérer des patients. Afin de leur permettre de réaliser une intervention en toute sécurité sur l'Homme, une formation technique sur tissus vivants est nécessaire voir incontournable.

En effet des applications comme l'utilisation d'énergie visant à coaguler un vaisseau (electrocoagulation), disséquer ou exposer un tissu n'a de sens que sur un modèle vivant. Le modèle porc a été retenu du fait de sa taille adaptée aux instruments laparoscopiques et son homologie anatomique avec l'homme.

Un animal permet de former 2 chirurgiens en binôme et nous souhaiterions former 400 chirurgiens. Ainsi, 200 animaux seront nécessaires pour ce projet de formation sur 1 ans, pour former tous les chirurgiens des établissements hospitaliers qui s'équipent en chirurgie robotique assistée en Europe et ailleurs.

Les animaux seront utilisés dans le respect de la règle des 3Rs :

Remplacement

: Les premières phases de formation se feront par l'utilisation de méthodes alternatives (simulation virtuelle, modèle en plastique). Une fois le chirurgien prêt, il évoluera vers un apprentissage technique sur animal en suivant un protocole strict. L'enseignement comprend aussi des sessions sur sujet anatomique afin de compléter les objectifs de formation.

Réduction

: Le nombre de porcs sera réduit au minimum, à raison d'un animal par binôme avec une valorisation de chaque animal sur lequel plusieurs gestes chirurgicaux par temps opératoire pourront être effectués.

Raffinement

: Les porcs sont préalablement hébergés en groupe sociaux selon la réglementation en vigueur, ils disposent d'enrichissements leur permettant d'exprimer leurs comportements naturels comme le fouissage, l'exploration d'objets à mâchouiller, le repos sur une aire dédiée. Une surveillance et des soins quotidiens sont apportés par une équipe qualifiée de techniciens et vétérinaires.

Le protocole prévoit des procédures mini-invasives réalisées sous anesthésie générale par un chirurgien sous la supervision d'un formateur qualifié.

Tous les animaux seront soumis à des procédures sans réveil. A la fin de la chirurgie, ils sont plongés dans une anesthésie profonde et mis à mort par surdosage de barbituriques. Toute

anomalie pouvant impacter le bien-être des animaux est signalée au vétérinaire désigné qui prendra les dispositions de soins nécessaires.

17535 Chez les mammifères, devenir significativement plus petit que 50 - 100 g est limité, car il est trop coûteux pour des animaux à sang chaud de maintenir leur température corporelle à une valeur élevée et constante (thermoréguler). Ce coût élevé est en partie lié à une forte dissipation de chaleur à la surface corporelle, qui devient plus grande lorsque la masse corporelle diminue. Pour compenser ces pertes de chaleur accrues, les petits mammifères ont des taux métaboliques (par unité de masse) élevés comparés aux grands mammifères, qui sont partiellement expliqués par le fonctionnement de leurs mitochondries, les organites impliqués dans la production d'énergie cellulaire et de chaleur. Les mitochondries présentes dans le muscle squelettique des petits mammifères, tels que la petite souris Africaine *Mus minutoides* (7 g), sont moins efficaces que celles des grands mammifères. Comme un moteur mal réglé d'un véhicule, elles génèrent plus de chaleur lorsqu'elles « brûlent » les stocks énergétiques, pour produire la même quantité d'énergie cellulaire que celles des grands mammifères. Cette solution adaptative, coûteuse en énergie, n'est possible que si les ressources alimentaires sont abondantes. A défaut, certains mammifères miniatures économisent leur énergie en baissant leur température corporelle, en hibernant ou en étant inactifs. *Mus mattheyi* (5 g), très proche phylogénétiquement et physiquement de *Mus minutoides*, possède des mitochondries très efficaces pour sa petite taille. En étant plus efficace, elle réduit sa consommation de ressources alimentaires et limite le coût énergétique élevé lié à sa petite taille. Néanmoins, les mitochondries plus efficaces produisent moins de chaleur, ce qui peut être dangereux pour un animal à sang chaud qui se refroidit vite. Avoir des mitochondries plus efficaces impose alors à *Mus mattheyi* de choisir une autre stratégie de thermorégulation : utiliser son travail musculaire pour produire de la chaleur ou avoir un tissu spécialisé dans la production de chaleur (e. g. tissu adipeux brun) en plus grande quantité et/ou plus actif. La dernière possibilité étant qu'elle accepte que sa température corporelle descende à des valeurs relativement basses.

Cette étude cherche à déterminer la stratégie de thermorégulation utilisée par *Mus mattheyi*, comparée à *Mus minutoides* qui possède des mitochondries peu efficaces et produisant beaucoup de chaleur. Pour cela, 13 individus mâles par espèce seront utilisés. Dès leur arrivée, les souris seront placées individuellement dans des cages d'hébergement, pour les habituer aux conditions expérimentales et éviter les agressions entre mâles d'espèces semi-sauvages. Pour limiter le manque d'interaction sociale, les cages seront enrichies avec de la sciure, des nids (en plexiglass noir qui laisse passer les infrarouges pour les mesures), des tuyaux et des morceaux de cotons, ainsi qu'avec de l'eau et de la nourriture ad libitum. Les cages seront placées dans une pièce chauffée à 29°C (température optimale pour les deux espèces), pour éviter une forte déperdition de chaleur chez l'animal avec l'environnement, selon un cycle jour : nuit de 12h : 12h. Après une semaine d'acclimatation, les souris seront placées en cage expérimentale dans les mêmes conditions de stabulation (enrichissement précédent conservé). Sur 4 jours consécutifs et pour chaque individu, les paramètres suivants seront mesurés :

- L'activité locomotrice par caméra infrarouge. La durée, la fréquence et le type de déplacement seront évalués.

- L'activité métabolique via un système de calorimétrie indirecte, permettant d'obtenir des mesures complémentaires à celle de l'activité locomotrice, en quantifiant sur 24h l'énergie utilisée dans les fonctions vitales pour l'animal et celle impliquée dans d'autres fonctions telles que la locomotion. Le quotient respiratoire, la chaleur dégagée ainsi que les prises alimentaires et hydriques seront aussi estimés.

- Les variations journalières de la température corporelle par caméra thermique.

Cette étude, non invasive et indolore, est indispensable à l'apport de nouvelles connaissances sur deux espèces peu connues, *Mus mattheyi* et *Mus minutoides*. Ce serait la première étude à coupler des mesures physiologiques et comportementales, chez des organismes évoluant à une température optimale (29°C) pour déterminer la stratégie de thermorégulation utilisée au repos par une très petite espèce, *Mus mattheyi*. Les animaux ne seront pas réintroduits dans les élevages

initiaux sous peine d'être rejetés voire tués par leurs congénères. Ils seront mis à mort et seront conservés comme échantillons biologiques pour diverses mesures complémentaires (mesures de bioénergétique mitochondriale, western blot...) afin de mieux connaître ces deux espèces. A titre d'exemple, le tissu adipeux brun sera prélevé pour isoler les mitochondries et mesurer leur consommation d'oxygène afin de déterminer si ce tissu spécialisé dans la production de chaleur est plus actif chez *Mus mattheyi* comparée à *Mus minutoides*.

Le projet répond aux exigences éthiques :

- « Remplacement » : ces expérimentations nécessitent des organismes vivants dans leur intégralité, en particulier deux espèces, et ne peuvent pas être remplacées par une approche substitutive.

- « Réduction » : les manipulations sont optimisées statistiquement pour réduire le nombre d'individus utilisés (13 mâles par espèce soit 26 individus au total). Chaque individu sera utilisé à la fois pour les mesures d'activité physique, de taux métabolique et de température corporelle. 3 individus supplémentaires, pour chaque espèce, seront gardés en réserve et ne seront utilisés que dans le cas où des individus seraient écartés de la procédure expérimentale ou morts.

- « Raffinement » : les mesures nécessitent ni injection, ni manipulation des individus, excepté lors du changement de cage. Les cages d'hébergement seront enrichies de nids et de jeux, et la nourriture ainsi que l'eau seront disponibles ad libitum pour limiter la solitude des individus dans la cage. Ce même enrichissement sera conservé dans les cages expérimentales et aucun changement de cage ne sera effectué lors des mesures pour limiter le stress des animaux. Une attention particulière sera portée sur diverses manifestations : les prises hydrique et alimentaire, la présence ou non de toilettage, la modification de comportement ou de posture, l'apparition d'une hypothermie et la consistance de selles. Un individu en souffrance sera écarté de la procédure et placés dans leur cage d'hébergement initiale, plus enrichie. Si son état venait à s'aggraver, l'animal serait mis à mort par dislocation cervicale précédée d'une sédation.

17536 Environ 15% des cancers peuvent être attribués à des microorganismes. Le tube digestif est hautement colonisé par des bactéries et plusieurs études suggèrent que des modifications du microbiote sont impliquées dans la carcinogenèse. Il a notamment été montré que la muqueuse intestinale de patients atteints de cancer colorectaux (CCR) est anormalement colonisée par des souches de *E. coli* producteurs d'une toxine appelée colibactine, mais les mécanismes d'actions sur le développement tumoral restent à éclaircir. Des résultats préliminaires nous laissent penser qu'un acide aminé, la sérine, pourrait jouer un rôle essentiel dans le pouvoir pro-carcinogène des *E. coli* producteurs de colibactine (CoPEC). L'objectif de ce projet est d'évaluer l'effet de la sérine présente dans l'alimentation sur l'activité pro-tumorale d'une souche bactérienne de CoPEC isolée d'un patient atteint de CCR, afin de mieux comprendre l'interaction hôtes-bactéries-nutrition dans le développement du cancer colorectal. Nous avons choisi de travailler avec le modèle murin de prédisposition à développer des CCR : APC^{min/+}. Ces souris porteuses d'une mutation dans le gène *apc* (Adenomatous Polyposis Coli) développent spontanément des tumeurs intestinales et sont ainsi un modèle animal de référence pour étudier la carcinogenèse colique. Ce gène *apc* est un gène suppresseur de tumeur qui est muté dans 80% des cancers colorectaux chez l'Homme.

L'étude proposée a été définie selon le principe des 3R de l'éthique animale. L'expérimentation animale est indispensable pour ce projet : en effet, il n'y a pas de méthodes alternatives pour évaluer les effets promoteurs des bactéries du tube digestif sur le développement tumoral. De plus, le nombre d'animaux est réduit au minimum dans la mesure où cela ne compromet pas les objectifs du projet. Le nombre de 12 souris/lot permettra d'analyser statistiquement les résultats (voir détail). Le nombre estimé d'animaux est de 216 souris sur 3 ans (6 lots de 12 souris/expérience ; 3 expériences). Etant donnée que l'obtention du phénotype *Apc^{min/+}* sera réalisée à l'Unité de Stabulation Animale de l'UCA, l'obtention des 216 animaux conduira à la génération d'environ 800 animaux sur 3 ans, dont environ 200 mâles *Apc^{min/+}* qui serviront de reproducteurs pour les expériences suivantes. L'expérimentateur observera quotidiennement le comportement général de l'animal, son apparence (activité, locomotion, état du poil, prostration, vocalise...), et contrôlera la présence d'eau et de nourriture pour chaque cage. Les signes d'inflammation colique seront

également considérés, le cas échéant : diarrhée, présence de sang dans les fèces, inflammation visible de la zone anale. Des pesées régulières des animaux sont prévues tout au long du protocole. Dans le cas où une perte de poids importante serait observée, les animaux seront sacrifiés lorsqu'ils atteindront 80% de leur poids initial. Si des signes de douleur se manifestent, une injection sous cutanée de Kétoprophène sera alors réalisée. Si une douleur niveau 3 est constatée, elle sera contrôlée par l'administration quotidienne de Buprenorphine (un antalgique fort, utilisé dans le traitement des douleurs cancéreuses) en sous cutanée. Enfin, les animaux seront sacrifiés s'ils présentent une attitude inhabituelle traduisant un mal-être pendant plus d'une semaine.

Cette expérimentation vise à identifier les mécanismes mis en jeu dans l'effet pro-carcinogène de certaines bactéries présentes dans le microbiote intestinal de patients atteint de CCR sur le développement du cancer colorectal, et plus particulièrement le rôle de la nutrition sur ces effets. A long terme, les résultats générés par ces recherches devraient permettre de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques en ciblant ces bactéries pathogènes intestinales.

17537 La myopathie à agrégats tubulaires est une maladie musculaire rare qui présente aussi des défauts touchant d'autres tissus comme les yeux (miosis), la peau (ichthyosis), les plaquettes (thrombocytopenie), la rate (hyposplénie/asplénie) et la taille des souris (petite). Les mutations trouvées chez les patients dans le gène STIM1 sont responsables d'une entrée excessive de calcium dans la cellule provoquant une multitude de signes cliniques. Ce projet vise à étudier chez l'animal, une mutation pour le gène STIM1 identique à celle retrouvée chez des patients. Une étude approfondie de cette pathologie nous permettra de suivre l'évolution des symptômes afin de mieux comprendre les mécanismes biologiques impliqués afin d'apporter une potentielle nouvelle thérapie. A ce jour, aucun traitement n'est disponible et cette étude vise à mettre en place une thérapie par croisement génétique. En effet, nous envisageons un croisement de la souris malade (Stim1 KI), portant la mutation dans le gène Stim1, avec une souris qui exprime 50% du gène Stim1 (Stim1 KO). De cette manière, nous espérons réduire l'entrée excessive de calcium dans la cellule due à la mutation afin d'améliorer les phénotypes préalablement observés. Cette étude est indispensable pour l'avancement dans la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques dans le traitement des myopathies à agrégats tubulaires ainsi que d'autres maladies liées à l'excès de calcium.

Plusieurs procédures expérimentales seront réalisées avec un maximum d'un test par jour. Le nombre d'animaux sera réduit au maximum pour obtenir une puissance statistique suffisante. Ainsi, nos précédentes études montrent que 15 souris maximum par groupe seront nécessaires pour obtenir une étude concluante (REDUCTION). Donc, nous prévoyons 334 animaux et cette estimation tient compte des différents croisements nécessaires pour obtenir les différentes mutations mais également des animaux d'expériences issus de ces accouplements.

Pour ces travaux il est primordial d'utiliser la souris, modèle animal de choix, physiologiquement et structurellement proche de l'Homme, pour étudier d'une part la physiopathologie et d'autre part l'amélioration des symptômes suite à notre thérapie (REMPLACEMENT). Le bien-être des animaux sera contrôlé quotidiennement et tout signe de douleur sera pris en charge en prenant les mesures appropriées en fonction du niveau de douleur observé. De la nourriture en gel sera déposée et du gel ophtalmologique sera utilisée selon les besoins des animaux. En cas de douleur intense, un analgésique pourra être administré et les animaux seront mis à mort prématurément pour éviter toute souffrance inutile. Certaines procédures seront réalisées sous anesthésie générale en utilisant des plaques chauffantes pour éviter l'hypothermie des animaux. (RAFFINEMENT).

17538 Le système opioïde est un système neuro-modulateur constitué d'une famille de peptides qui agissent en activant 3 types de récepteurs opioïdes : mu, delta et kappa. Parmi eux, le récepteur opioïde mu (ROM) est le plus étudié car il représente la cible moléculaire principale des opiacés, et joue un rôle essentiel dans de grandes fonctions physiologiques, en particulier la récompense et le tonus hédonique.

Les opiacés sont des composés exogènes abondamment utilisés en clinique pour le traitement de la douleur, mais dont l'utilisation prolongé peut induire une dépendance physique et une addiction

chez certains individus. Ces médicaments puissants sont dans la très grande majorité des cas administrés par voie systémique (injections orale, intraveineuse, sous-cutanée ou transdermique), et ils induisent l'activation du ROM dans l'ensemble des structures cérébrales où ce récepteur est exprimé.

Pourtant, les données de recherche récentes chez l'animal indiquent que l'activation du ROM induit vraisemblablement des effets comportementaux distincts (et potentiellement opposés) selon la structure cérébrale considérée, dépendants notamment du type de neurones qui expriment le récepteur. Pour approfondir la compréhension de son rôle, il est nécessaire d'étudier les effets comportementaux induits par une activation locale du récepteur, restreinte à chaque structure cérébrale d'intérêt. Ceci pourrait à terme permettre le développement de nouveaux médicaments qui pourraient induire préférentiellement les effets bénéfiques des opiacés (analgésie), sans leurs effets délétères (dépendance physique, risque addictif). Dans ce contexte, nous proposons ici une étude pour caractériser chez l'animal les effets comportementaux associés à la modulation de l'activité des neurones qui expriment le ROM, et l'activation de ce récepteur dans ces neurones. Nous nous focaliserons sur l'étude du ROM dans le noyau accumbens (NAc), une structure centrale dans la fonction de récompense et les effets des opiacés.

Ce projet nécessitera un total de 640 souris. Il sera conduit en respectant la règle des 3R (remplacer –réduire – raffiner) visant à remplacer ou réduire chaque fois que possible le nombre d'animaux, ainsi qu'à optimiser les procédures pour minimiser au maximum l'inconfort des animaux tout en permettant néanmoins d'étudier les propriétés aversives des opiacés. "Remplacer" : les effets moléculaires des opiacés, sur le cerveau et d'autres tissus de l'organisme, ne peuvent pas être étudiés en utilisant des modèles cellulaires, qui par nature ne récapitulent ni la complexité de l'organisation cérébrale en réseaux complexes de structures interconnectées, ni les communications inter-tissulaires. L'étude de ces effets nécessite donc l'analyse d'organismes vivants et entiers. "Réduire" : les animaux utilisés étant consanguins, la variabilité phénotypique est limitée, ce qui permet de réduire le nombre d'animaux tout en mettant potentiellement en évidence un effet statistiquement significatif. Ainsi, au regard des données de la littérature et de la variabilité interindividuelle attendue, les groupes expérimentaux destinés à caractériser les comportements liés aux effets de récompense ou aux effets aversifs des opiacés seront constitués de 10 souris chacun (par sexe). En effet, chaque expérience sera menée en parallèle chez des souris mâles et femelles. Alors que l'addiction aux opiacés est plus fréquente chez l'homme que chez la femme, on sait très peu de choses sur les mécanismes neurobiologiques qui pourraient différer selon le sexe et contribuer à expliquer cette différence de vulnérabilité. Sur le plan éthique, il apparaît essentiel d'aborder systématiquement cet aspect sur le plan de la recherche fondamentale, aussi bien pour maximiser la pertinence des données obtenues pour la compréhension de l'addiction aux opiacés chez l'homme, que pour l'utilisation de tous les animaux obtenus lors de la reproduction de la lignée de souris que nous utiliserons. "Raffiner" : nous avons choisi d'utiliser des protocoles expérimentaux qui minimisent au maximum l'inconfort des animaux tout en permettant néanmoins d'étudier les propriétés aversives des opiacés. Les conditions d'hébergement sont optimisées en fonction des comportements naturels des rongeurs : les souris sont hébergées en groupe sociaux de 3 à 5 animaux par cage, et chaque cage est enrichie avec un barreau à ronger et des papiers absorbants pour faire un nid. Enfin, lors de la réalisation de procédures chirurgicales les animaux reçoivent un traitement antidouleur (anesthésique local autour du site de chirurgie et traitement par un anti-inflammatoire non stéroïdien).

17539 Suite à un épisode de douleur intense, même après rémission des symptômes, l'organisme reste dans un état hypersensibilisé. Par exemple, 10 à 50% de patients déclarent développer des douleurs chroniques et persistantes après une opération. Ces douleurs peuvent être ré-activées épisodiquement, par exemple durant une période de stress. Les mécanismes mis en jeu dans cette sensibilisation latente à la douleur (SLD) sont notamment soupçonnés d'être impliqués dans l'installation et le maintien des douleurs chroniques. Ce phénomène a été modélisé chez le rat et chez la souris, ce qui a permis d'identifier certains acteurs mis en jeu tels que le système opioïdergique endogène, et le système dit anti-opioïdergique de la famille des récepteurs à peptides

RF-amide. Des résultats préliminaires montrent ainsi qu'un traitement avec des antagonistes (molécules bloquantes) d'un récepteur de cette famille, le NPFF1R, permet de réverser complètement la SLD, et empêche indéfiniment la réactivation de l'hyperalgésie induite par le stress ou par le blocage du système opioïdérique dans différents modèles de douleur chez la souris (inflammatoire ou neuropathique).

Ce projet sur 5 ans nécessitera 184 animaux, et vise à confirmer l'effet de deux antagonistes du récepteur NPFF1R dans le modèle de SLD chez le rats Sprague-Dawley. Après une étude comportementale confirmant l'induction de cette SLD, nous chercherons à décrypter les mécanismes moléculaires sous-jacents par une étude pharmacologique et électrophysiologique. Le modèle inflammatoire utilisé consistera en une injection de carragénine dans la patte des animaux, provoquant un œdème et une hyperalgésie mécanique et thermique au chaud. Dans une première partie, une fois l'hyperalgésie primaire résolue il s'agira de confirmer l'effet des antagonistes RF3286 et RF1359 sur l'hyperalgésie transitoire réactivée par l'injection d'un antagoniste opioïdérique (naltrexone NTX). Dans une deuxième partie, une étude électrophysiologique sera conduite afin de mieux comprendre l'intégration sensorispinale de l'information douloureuse dans ce modèle de SLD et si l'administration des deux antagonistes du récepteur NPFF1R a des conséquences fonctionnelles sur le codage de l'information douloureuse.

La règle des 3R sera mise en œuvre à travers les procédures suivantes : i) Raffinement par hébergement en cages collectives enrichies (frisure et bâton de bois) après sevrage et maintien des fratries selon les sexes dans le but de préserver les interactions sociales entre congénères, ii) Réduction par l'utilisation des animaux à la fois dans les études comportementales et électrophysiologique par un calcul d'effectif nous permettant d'avoir des résultats statistiquement significatifs et iii) Remplacement : le projet portant sur la nociception et les propriétés anti-hyperalgésiques des molécules d'intérêt, il est actuellement impossible de se passer de sujets vivants et dotés d'un cortex développé. Dans le modèle de douleur persistante induite par une inflammation aucune analgésie ne pourra être envisagée car elle remettrait en cause l'ensemble des conclusions de l'étude.

17540 Le cancer du pancréas est reconnu comme l'un des cancers les plus agressifs dans le monde. L'adénocarcinome pancréatique ductal (PDAC) est le plus répandu des cancers du pancréas. Il représente 85% des cancers de ce type, et possède un mauvais pronostic du fait d'un diagnostic souvent tardif, à un moment où la tumeur produit des métastases. L'espérance de vie moyenne est de 5 ans après diagnostic ce qui représente le taux le plus faible de survie (5%) de l'ensemble des cancers. Les patients sont traités par chirurgie et chimiothérapie, traitements à ce jour insuffisamment efficaces.

Malgré le développement de nouvelles thérapies anti-tumorales (nouvelles molécules de chimiothérapie, radiothérapie, immunothérapies, thérapies ciblées), la structure particulière du microenvironnement tumoral rend les PDAC peu accessibles à ces thérapies. En effet, les PDAC sont par exemple caractérisés par un défaut de distribution des médicaments dans la tumeur et une non-réponse aux immunothérapies, le tout lié à une vascularisation anarchique de ces tumeurs et un microenvironnement très rigide et fibrotique.

L'objectif de ce projet vise à réduire la rigidité du tissu tumoral pour favoriser l'infiltration des cellules immunitaires et améliorer la réponse immunitaire. En effet, la rigidité tumorale favorise la croissance, les métastases et inhibe la capacité des lymphocytes cytotoxiques d'atteindre le tissu tumoral. Pour cela, nous souhaitons tester un inhibiteur du collagène qui diminue la rigidité des tumeurs en combinaison avec une immunothérapie et étudier leur effet potentiellement inhibiteur sur la croissance des tumeurs pancréatiques dans des modèles murins.

Ces molécules seront testées sur des souris. Nous allons induire le développement de cellules tumorales sous la peau et dans le pancréas, et suivre leur évolution en présence de différentes molécules d'intérêt injectées par voie intrapéritonéale, seules et en combinaison.

Dans ce projet, nous envisageons d'utiliser 240 souris. Toutes les mesures ont été prises afin de diminuer le nombre d'animaux pour cette étude et respecter le principe de 3R.

L'efficacité des molécules anti-tumorales qui ciblent à la fois les cellules tumorales et les cellules immunitaires peut être testé in vitro sur des cellules isolées. Par contre les thérapies qui ciblent la rigidité tumorale ne peuvent être testées qu'in vivo sur des modèles animaux qui miment au mieux la maladie humaine.

Des analyses statistiques sont appliquées pour réduire le nombre d'animaux.

Afin de limiter la souffrance animale, nous avons établi des points limites pour chaque procédure. Un examen clinique des animaux sera effectué quotidiennement. Tout signe témoignant d'une souffrance, apathie, ou déshydratation des animaux conduira à l'interruption des expérimentations en cours.

17541 Le glioblastome (GB) est la forme la plus fréquente et la plus agressive des tumeurs cérébrales. En raison d'une absence de thérapie curative, la médiane de survie reste de 15 mois malgré le traitement conventionnel associant chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie adjuvante.

Dans notre laboratoire, focalisé sur le développement de nouveaux traitements locorégionaux, l'intérêt d'une radiothérapie interne nanovectorisée utilisant des nanocapsules de Rhénium 188 (188Re) a été démontré. Cette méthode permet d'irradier localement la tumeur, en minimisant les effets sur les organes voisins du site tumoral.

Le projet consiste ici à mettre en place une nouvelle stratégie thérapeutique basée sur la chimie de l'Astate 211 (211At) (demi-vie 7,2h ; 5,9-7,5 MeV), un émetteur alpha qui a déjà été testé en clinique, notamment pour le ciblage de la téna-scine-C et qui mérite une attention particulière pour des développements thérapeutiques pertinents. Il s'agit donc d'une particule de haute énergie et de faible portée, ce qui sous-entend une faible pénétration dans les tissus, ce qui permettrait de proposer une thérapie plus précise dont la toxicité auprès des tissus sains serait moindre. L'idée est de coupler ce radionucléide à des anticorps dirigés contre des marqueurs exprimés à la surface du glioblastome. Cette nouvelle stratégie sera comparée à l'efficacité in vivo des nanocapsules de 188Re (LNC-188Re-SSS).

La première cible que nous souhaitons tester est le récepteur CXCR4 (Chemokine Receptor-4) et surexprimé et associé à un mauvais pronostic chez le patient. CXCR4 est un récepteur de chimiokine activé par SDF-1alpha. Il participe à la survie, l'invasion et la prolifération des cellules tumorales.

CD138 (ou Syndecan-1), un marqueur connu du myélome multiple, est également un candidat intéressant pour la génération de radiopharmaceutiques ciblés. Son expression dans le glioblastome est moins décrite dans la littérature mais il constitue tout de même un marqueur de mauvais pronostic dans cette pathologie.

Ce projet sera développé chez la souris. La possibilité d'utiliser deux types cellulaires dans deux types de souris est envisagée afin d'investiguer les réponses dans un cadre de xénogreffe d'une part et dans un cadre syngénique d'autre part (permettant d'étudier le rôle de l'immunité). En effet, nous avons validé l'importance de la voie de signalisation SDF1alpha/CXCR4 dans les réponses aux radiations à partir de cellules humaines sur-exprimant le récepteur CXCR4 et la Red Fluorescent Protein (RFP) (cellules de niveau sécuritaire 1). Ce modèle sera utilisé chez la souris CB17-SCID. Par ailleurs la lignée cellulaire GL261 (modèle de GB de souris exprimant CD138) sera utilisée chez la souris C57BL/6JRj pour les études syngéniques. Un tri cellulaire de cette lignée, sélectionnant la population cellulaire CD138high, sera réalisé pour étudier l'impact de ce récepteur sur la croissance tumorale et la résistance aux traitements.

Les livrables de ce projet d'expérimentation animale sont :

- Validation des modèles de croissance tumorale (cellules U87MG CXCR4+ chez la souris CB17-SCID et GL261 chez la souris C57BL/6JRj)
- Efficacité pré-clinique des anticorps (211At)anti-CXCR4
- Efficacité pré-clinique des anticorps (211At)anti-CD138

Remplacer : Ce projet a déjà fait l'objet d'études in vitro ayant abouti à plusieurs publications. Sa mise en place nécessite désormais l'utilisation d'animaux pour valider les étapes de ciblage et

d'élimination des cellules tumorales. L'utilisation de deux modèles est indispensable pour obtenir des données interprétables, par la suite valorisables par la publication et transférables en clinique. Pour mener à bien ce projet, de nombreux paramètres seront étudiés au préalable via des modèles cellulaires pour limiter l'utilisation d'animaux (effets des radiopharmaceutiques sur la prolifération, la motilité, l'invasion, l'induction de la mort cellulaire ou encore le comportement des cellules immunocompétentes).

Réduire : Les groupes d'animaux ont été constitués dans le but d'obtenir des données valables statistiquement. Une marge de manœuvre a été prise en compte afin de conserver cette significativité en cas de perte d'un ou plusieurs animaux et d'éviter de répéter l'expérimentation avec un groupe complet. Pour les données échantillonnées (prélèvements et coupes : immunohistochimie, cytométrie, RTqPCR, RNAseq), des tests statistiques seront effectués à l'aide d'une analyse de variance à un ou deux facteurs (ANOVA). La significativité statistique des expériences de point limite sera déterminée à l'aide du test du log-rank.

Raffiner : Les animaux seront hébergés dans un environnement dont la température, l'humidité, le renouvellement de l'air ainsi que le cycle d'éclairage (12h de lumière, 12h d'obscurité) sont contrôlés selon les normes légales en vigueur. Toutes les procédures seront réalisées sous anesthésie générale avec un mélange kétamine (100mg/kg) / xylazine (13mg/kg) en intrapéritonéale. Les animaux seront également traités avec un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) 3 jours avant l'opération et en post-opératoire pendant 4 jours : kétoprofène à 5mg/kg, disposé dans l'eau de boisson. Une anesthésie gazeuse sera appliquée aux animaux lors du suivi IRM hebdomadaire : induction sous isoflurane 5% puis maintient à 2%. L'euthanasie des animaux sera réalisée par inhalation létale par gradient progressif de CO₂.

Nombre total d'animaux utilisés : 550 souris

17542 Le présent projet concerne l'évaluation d'un produit immunologique destiné à stimuler le système immunitaire des animaux d'élevage.

Il n'existe pas pour le moment de méthode d'évaluation de l'efficacité du produit immunostimulant concerné par la présente demande ; aussi l'efficacité de ce produit est-elle évaluée par un essai avec épreuve virulente chez la souris, qui n'est pas une des espèces de destination du produit.

La procédure est décrite dans le présent projet : essai d'activité sur souris dans le cadre strict du contrôle qualité pour la libération de chaque lot de fabrication de l'immunostimulant

Ce projet est conçu en accord avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement (3R), avec notamment :

Lorsque cela est possible, l'utilisation d'animaux témoins communs au test d'activité de plusieurs lots, de manière à réduire le nombre global d'animaux utilisés,

L'enrichissement apporté dans les cages des animaux,

La définition de points limites adaptés permettant la réduction de la souffrance chez les animaux.

Il n'existe pas pour le moment de méthode d'évaluation de l'efficacité du produit; aussi l'efficacité de ce produit est-elle évaluée par un essai avec épreuve virulente chez la souris, qui n'est pas une des espèces de destination du produit.

Le nombre de souris envisagé sera au maximum de 1200.

La procédure est classée en gravité sévère.

17543 Les anévrismes (AA) et dissections aortiques (DA) sont des pathologies fréquentes chez le sujet de plus de 65 ans et représentent une cause de morbi-mortalité importante. Les AA et DA se caractérisent par une atteinte de la paroi artérielle qui se traduit par une dégradation de la structure qui lie les cellules entre elles, ainsi qu'une baisse de la contraction de cellules au sein de la paroi de l'artère.

Le plasminogène est un enzyme qui intervient dans la coagulation du sang mais peut aussi traverser la paroi des artères. Des publications antérieures ont montré le rôle central du plasminogène dans l'évolution des anévrismes aortiques.

Nous souhaitons comprendre les mécanismes d'action du plasminogène dans un modèle de dissection aortique chez le rat. La maladie anévrysmale est une maladie complexe et lentement évolutive qu'il n'est pas possible de reproduire in vitro. L'apparition de la dissection aortique associe en effet des réactions physiologiques et des contraintes hémodynamiques impossibles à reproduire in vitro actuellement.

Dans un premier temps nous voulons donc valider un nouveau modèle de dissection aortique chez le rat. Ce modèle est obtenu à partir d'un traitement pharmacologique donné par voie orale bien décrit dans la littérature chez la souris. Ce traitement fragilise les artères et réalise une sensibilisation de l'artère. Dans un deuxième temps nous allons étudier l'effet du relâchement de la paroi de l'artère dans ce modèle (en testant différents vaso-dilatateurs) afin de confirmer l'effet du relâchement en favorisant le passage du plasminogène dans la paroi. Ces molécules seront administrées par voie orale mélangées à l'eau de boisson ainsi qu'à la nourriture.

Enfin nous testerons l'effet protecteur d'un « anti » plasminogène ayant pour but de diminuer l'agression de la paroi vasculaire dans les AA et DA.

Toutes les administrations de substances et les chirurgies seront faites dans un autre établissement utilisateur. Seules seront faites ici les examens d'imagerie. Ceux-ci seront des examens strictement non-invasifs. Echographies hebdomadaire afin de surveiller les diamètres aortiques

Imagerie par résonance magnétique: 1 seule par animale au cours du protocole.

les animaux seront déplacés entre les 2 établissements utilisateurs (distants de 100m) de la façon la moins stressante (au calme, sans stimulations auditives ou visuelles).

Dans ce projet, la règle des 3R sera respectée. Au total ce projet nécessitera 120 rats sur une durée de 3 ans. Nous raffinerons l'environnement des animaux par enrichissement de leur milieu de vie. Nous réduirons au maximum le nombre de rats utilisés, tout en assurant que les études réalisées nous permettent d'effectuer les analyses statistiques nécessaires. L'utilisation de techniques d'imagerie telles que l'échographie et l'IRM nous permettront d'obtenir un maximum d'information par rat. Tous les examens d'imagerie seront fait sous sédation (gaz anesthésiant) des animaux afin de réduire le stress.

17544 Dans le cerveau, l'information est transmise de neurones en neurones au niveau d'une structure spécialisée, la synapse. Afin que cette transmission ait lieu de manière efficace et adaptée, il est important de considérer le rôle d'une autre cellule, l'astrocyte. En effet, cette cellule gliale, idéalement positionnée entre les vaisseaux et les neurones est en mesure de fournir de l'énergie aux neurones, non pas sous la forme de glucose mais sous la forme d'un de ses métabolites, le lactate.

Le but de ce projet, est de mieux comprendre si, dans le cortex, selon l'activité des neurones, la source d'énergie des neurones est uniquement le glucose et/ou le lactate. Pour se faire, via une approche d'électrophysiologie, nous étudierons l'impact de l'inhibition 1) de la libération de lactate par les astrocytes, 2) de la recapture de lactate par les neurones et 3) de la recapture de glucose par les neurones, sur la transmission synaptique et la plasticité synaptique à long-terme.

L'ensemble de ce projet nécessite l'utilisation de 600 rats mâles Wistar Han adultes. Il n'existe actuellement pas de modèle in vitro et donc de méthode alternative permettant de REMPLACER les animaux. Afin de respecter la règle des 3R, nous avons REDUIT à 600 le nombre d'animaux que nous prévoyons d'utiliser pour une période de 5 ans. Il s'agit du nombre minimal d'animaux nécessaire à l'obtention de données de qualité exploitable et permettant une analyse statistique fiable. Des mesures de RAFFINEMENT seront mises en place durant toute la durée du projet. Les animaux seront hébergés au sein d'un établissement utilisateur agréé dans des conditions d'hébergement favorisant leur bien-être (enrichissement, suivi quotidien par du personnel qualifié). Enfin, des points-limites ont été établis entraînant une prise en charge de l'animal afin d'anticiper

toute souffrance et réduire au mieux l'inconfort des animaux suite à la chirurgie (anesthésie, analgésie, gel oculaire, tapis chauffant) jusqu'à leur récupération complète.

17545 Le diabète est considéré comme une véritable pandémie qui affecte près de 463 millions de personnes dans le monde et est responsable de 11% de la mortalité mondiale. Le diabète de type 2 survient lorsque les cellules β pancréatiques ne produisent pas suffisamment d'insuline. Il en résulte une élévation chronique et délétère de la concentration de glucose dans le sang (hyperglycémie). Malgré les progrès pharmacologiques récents, l'objectif thérapeutique du contrôle glycémique est difficile chez de nombreux patients. Mal traité, le diabète engendre des complications graves qui ont un retentissement majeur sur la qualité de vie, la mortalité ainsi que le coût global de la santé. L'amélioration de la prise en charge thérapeutique des diabétiques de type 2 constitue un objectif majeur de santé publique. Les β -arrestines 1 et 2 (ARRB1 et ARRB2) sont des protéines de signalisation jouant un rôle dans la capacité sécrétoire et la masse des cellules β pancréatiques. Leur niveau d'expression est altéré dans le diabète de type 2 ce qui pourrait être une explication de la non réponse aux traitements antidiabétiques.

Notre projet est d'étudier l'impact de l'altération du niveau d'expression des ARRB1 et/ou ARRB2 sur l'homéostasie glucidique et la réponse insulinaire au glucose in vivo. Afin de discriminer les rôles spécifiques de ARRB1 et ARRB2, nous comparerons les phénotypes des souris exprimant normalement ou partiellement ARRB1 et/ou ARRB2 ainsi que des souris dépourvues de ARRB1 ou de ARRB2.

Cette étude sera menée en conformité avec les recommandations de la règle des 3R :

- « Réduire » Pour notre expérimentation, nous avons estimé l'échantillonnage nécessaire pour chaque groupe afin d'observer une différence significative. A la fin de l'expérimentation, les animaux seront euthanasiés et le pancréas sera prélevé pour une étude supplémentaire portant sur la masse des cellules β pancréatiques.

- « Remplacer » A notre connaissance il n'existe pas d'études antérieures concernant les impacts d'un déficit de ARRB1 et de ARRB2 sur la tolérance au glucose et la réponse insulinaire in vivo. La régulation de la glycémie est régie par un système physiologique complexe faisant intervenir l'interaction de nombreux organes. Cette étude in vivo ne peut être remplacée par des tests in vitro ou in silico.

- « Raffiner » Après sevrage, les animaux seront élevés par groupe de 5 en zone EOPS dans un environnement enrichi (copeaux, cotons, protections plastique rouge) et sont surveillés quotidiennement. Si un mâle se retrouve dominant et attaque ses congénères, il sera isolé dans une cage individuelle. Bien que les souris ne présentent pas de phénotype dommageable, toute gêne ou souffrance (altération anormale du pelage, une perte de poids, une inactivité prolongée, des signes cliniques comme écoulement nasal ou oculaire, yeux exorbités ou fermés, augmentation de la fréquence respiratoire, dyspnée, convulsions / tremblements) entraîneront l'euthanasie.

Ce projet nécessitera l'utilisation de 120 souris (2 x 6 groupes de 10 animaux) sur une durée de 2 ans.

17546 Ce projet est centré sur l'étude des mécanismes de la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI), une maladie du poumon mortelle sans traitement disponible pour renverser ou stopper sa progression. La FPI est caractérisée par l'activation de cellules qui communiquent entre elles de façon aberrante et qui favorise l'apparition d'un tissu pulmonaire non fonctionnel. Nous étudions un système de communication intercellulaire appelé vésicules extracellulaires (EVs). Les EVs, incluant les exosomes, sont produites par les cellules et s'accumulent au niveau pulmonaire chez les patients atteints de FPI et dans les modèles animaux de fibrose pulmonaire. Cependant, le mécanisme d'action des EVs dans la FPI reste incompris. Nos données préliminaires suggèrent que les EVs favorisent les mécanismes de la fibrose. Une meilleure compréhension de la biologie des EVs lors de la fibrose pulmonaire est donc une étape importante pour le développement de potentielles thérapies.

Ce projet s'articule autour de 3 objectifs : 1) produire des EVs issues de modèles de fibrose (lavage broncho-alvéolaire et cellules primaires de souris avec fibrose pulmonaire et contrôle), 2) étudier le mode d'action des EVs au niveau pulmonaire et 3) identifier le(s) cellule(s) cible des EVs dans le poumon.

Notre modèle de fibrose pulmonaire sera basé sur l'injection d'un agent anti-cancéreux, la bléomycine chez la souris. Ce modèle est le plus utilisé et reconnu dans la communauté scientifique. Nous ajouterons dans ce modèle des injections d'EVs répétées par aspiration oro-pharyngée.

Ce projet nécessitera 1588 souris mâles (C57Bl/6 et lignée reportrice de l'activité Cre) sur les 5 ans du projet. Nous utiliserons une stratégie suivant la règle des 3R. La complexité du poumon et du phénomène de fibrose, qui fait intervenir plusieurs processus (inflammation, remodelage tissulaire), rend impossible le remplacement par des expériences sur des modèles in vitro (cultures primaires, culture de tissus pulmonaire). Nous réduirons le nombre d'animaux au minimum requis pour remplir les conditions des tests statistiques. Nous raffinerons nos expérimentations pour produire des données les plus pertinentes possibles tout en réduisant l'inconfort des animaux. Une attention particulière sera apportée au bien-être des animaux (supplémentation alimentaire, densité par cage, enrichissement de milieu). Les souris auront accès à une alimentation enrichie pour limiter la perte de poids et la déshydratation qui caractérisent le modèle. Nous utiliserons des points limites précoces permettant d'éviter une souffrance susceptible d'avoir une incidence grave sur l'état général des animaux. Le modèle de fibrose pulmonaire sera appliqué par du personnel qualifié et entraîné. Les modifications génétiques du modèle de souris n'ont pas d'impact sur la qualité de vie des animaux.

17547 Le trouble de stress post-traumatique (TSPT ou PTSD en anglais) est un trouble anxieux sévère qui se développe après l'exposition à un événement grave menaçant l'intégrité physique ou psychologique du patient ou celle de son entourage. Les patients ressentent un sentiment de désespoir ou d'horreur généralement associés à d'autres symptômes tels que des flash-backs, une amnésie partielle ou totale, des insomnies, etc... Ces symptômes caractéristiques sont considérés sévères dans les trois premiers mois suivants l'évènement, puis chroniques s'ils persistent au-delà de cette période. Dans le monde, plus de 70% des adultes ont déjà été confrontés à un événement traumatisant dont un certain nombre (jusqu'à 12% dans certains pays en difficultés) souffrent de TSPT. Le diagnostic d'un TSPT est généralement déterminé par un entretien clinique ou une auto-évaluation. Il existe à ce jour différents traitements (par psychothérapie ou médicamenteux) cependant il y a un réel besoin de développement de médicaments plus efficaces pour le traitement de cette maladie.

Le test de la peur conditionnée ("Fear conditioning") a pour but d'exposer l'animal à un événement marquant provoquant des symptômes semblables à ceux retrouvés chez les patients atteints d'un TSPT et ainsi permettre le développement et le screening de différentes molécules.

Le test de conditionnement de la peur est un paradigme comportemental dans lequel un signal initialement neutre, ici une tonalité, est associé à un stimulus aversif, ici un choc électrique, qui suscite une réaction de peur sans condition, ici le « freezing » des souris.

Le « freezing » se manifeste par une incapacité à initier un mouvement ou un arrêt temporaire du mouvement en cours.

Le protocole comprend plusieurs étapes: une session de conditionnement, un test de rétention de contexte et quatre tests de peur conditionnée par une tonalité. Toutes les séances se déroulent dans une boîte insonorisée contenant deux haut-parleurs, une grille en acier inoxydable reliée à un générateur électrique et une lampe ajustable suspendue au plafond (intensité lumineuse: 30 Lux). L'appareil diffère entre la session de conditionnement et le test de rétention de contexte d'une part, et les tests de peur conditionnés d'autre part.

Les données enregistrées sont le temps d'immobilité définie par l'absence de mouvement autre que celui requis pour la respiration. Le test est réalisé sur la souris.

Une étude standard comprend 60 animaux répartis en 6 groupes de 10 souris:

- 1 groupe controle non stressé
- 1 groupe controle stressé
- 1 groupe qui reçoit le produit de référence
- 1 groupe qui reçoit le produit testé à 3 doses

Des études peuvent comprendre un nombre plus élevé ou plus faible d'animaux (par exemple pour l'étude d'un nombre de doses supérieur ou inférieur).

Le nombre maximum de produits testés par an est de 10.

Le nombre total maximum d'animaux utilisées sur 5 ans est de $3\ 000 = 60 \text{ animaux/étude} \times 10 \text{ études/an} \times 5 \text{ ans}$.

Respect de la règle des 3R :

- Réduire. Le nombre total d'animaux utilisés pour une étude est fonction du nombre de groupes et du nombre d'animaux par groupe nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement interprétables.

- Justification du nombre de groupes: 1) Le groupe témoin est nécessaire à chaque expérience compte tenu des variations de performances entre lots d'animaux. 2) Le groupe produit de référence est nécessaire pour valider l'expérience et pour comparer l'efficacité du produit testé à un produit de référence. Selon les études le produit de référence est soit un médicament sympatholytique soit un antidépresseur qui appartient à la famille des inhibiteurs de la recapture de la sérotonine. Ils sont utilisés dans le traitement de l'anxiété et les attaques de paniques. 3) Il est généralement nécessaire de tester le produit à trois doses pour mesurer la relation dose-effet mais un nombre de doses inférieur ou supérieur peut être justifié en fonction de l'état de connaissance du produit. . L'effet attendu du produit testé est une diminution « du temps de freezing ».

Le produit de référence, le produit testé et son placebo sont administrés par voies orale (gavage), intrapéritonéale, sous-cutanée ou intraveineuse avant le test (le temps étant fonction des résultats d'études pharmacinétiques réalisées au préalable). L'administration de ces produits est répétée (4 jours).

- Justification du nombre d'animaux par groupe. Compte tenu de la variabilité interindividuelle des variables mesurées dans ce test, ce nombre a été fixé à 10 animaux par groupe. L'utilisation d'un nombre inférieur d'animaux a une probabilité importante d'entraîner la non-validité de l'étude, conduisant à la refaire, et par conséquent à utiliser un nombre d'animaux plus élevé.

- Raffiner. Des animaux présentant des signes de souffrance sont euthanasiés. Outre la motivation éthique conduisant à cette euthanasie, celle-ci est requise pour des raisons expérimentales, la souffrance d'un animal biaisant les variables comportementales mesurées. L'utilisation de traitements pour pallier à cette souffrance est exclue, ces types de traitement étant susceptibles de modifier le comportement des animaux et l'action pharmacologique des produits étudiés.

Pour l'évaluation de la souffrance, de la détresse et de l'inconfort des animaux: 1) Les animaux sont d'abord attentivement observés sans être dérangés: l'observation des différentes postures permettent d'évaluer un comportement normal ou anormal. La réaction des animaux à un stimulus externe peut être également vérifiée (ex: bruit léger) avant de s'approcher directement de la cage pour manipuler les animaux. 2) Ensuite, les animaux sont manipulés pour l'examen clinique. Durant celui-ci, les signes et des mesures (dont celle du poids de l'animal) sont notés dans une grille de scoring (définie ci-dessous).

- Remplacer. Il n'existe pas à ce jour de modèle n'utilisant pas d'animaux ou nécessitant un nombre plus réduit d'animaux ou ayant un degré de sévérité inférieur permettant d'obtenir des informations équivalentes à celles obtenues par le présent modèle.

17548 Objectifs

Le projet a pour but d'évaluer l'efficacité par épreuve de candidats médicaments destinés aux espèces aviaires.

Pour qu'un médicament soit commercialisé, il faut démontrer que celui-ci apporte un effet bénéfique sur l'animal pour la ou les pathologies considérées.

Les études sont réalisées sur l'espèce cible du produit développé (ici les volailles) ou sensible à la (aux) souche(s) utilisée(s), pour s'approcher au maximum, des conditions réelles d'utilisation ; conformément à la Pharmacopée Européenne et aux réglementations des pays destinataires.

Pour démontrer l'efficacité d'un vaccin contre une pathologie, une phase d'épreuve suit la phase d'administration de ce vaccin.

L'épreuve correspond à l'administration de l'agent pathogène pour reproduire de manière expérimentale et le plus fidèlement possible, les conditions réelles de développement de la pathologie.

Pour certaines pathologies, une étude d'amplification in vivo de la souche d'épreuve chez les volailles peut être nécessaire pour obtenir une souche utilisable dans une épreuve expérimentale.

Avantages/dommages

Le développement de la maladie peut donner lieu à des signes cliniques sévères provoquant une douleur chez l'animal. C'est pourquoi, des points limites spécifiques aux pathologies sont appliqués. De plus, l'administration du pathogène et les prélèvements peuvent également générer du stress et une gêne. Pour limiter les contraintes induites par ces actes, les procédures sont réalisées par des opérateurs hautement qualifiés.

La finalité de ces études est de permettre le développement de médicaments efficaces contre les maladies ciblées. Ceux-ci sont essentiels en élevage afin de protéger les animaux contre les maladies infectieuses et garantir les performances zootechniques et économiques.

Informations sur les espèces utilisées

En se basant sur l'historique des produits testés, sur les exigences réglementaires et les projets de Recherche et Développement (R&D) à venir, le nombre d'animaux utilisés sur 5 ans est estimé, au plus, à 13050 poules (comprenant les poules pondeuses et les poulets), et à 950 dindes.

Mise en œuvre des 3R's

Remplacement : Lorsque cela est possible, une première étape dans le projet de développement d'un médicament consiste à tester in vitro différents candidats. Ceci permet une première sélection de ces derniers, réduisant ainsi le nombre d'animaux utilisés. Un recueil d'informations est également apporté par la bibliographie lorsque cela est possible.

Le recours à l'espèce cible est à l'heure actuelle, une exigence réglementaire et est indispensable, afin d'observer le plus fidèlement possible, les effets sur les espèces concernées.

Réduction : Concernant les études réglementaires, le nombre minimal d'animaux à inclure est fixé par les textes. En amont, lors des phases recherche, les effectifs sont évalués au plus juste (historique, définition des objectifs, tests statistiques de puissance...) de façon à limiter le nombre d'animaux utilisés et les études non conclusives.

Raffinement : Des points limites spécifiques aux pathologies ont été définis afin de limiter le plus précocement possible une dégradation de l'état général des animaux. Ces critères sont en constante évolution de manière à ce qu'ils reflètent au mieux l'expérience du terrain et l'état actuel des connaissances vétérinaires.

Le personnel est également formé et compétent pour identifier les cas pour lesquels l'animal n'est plus dans son état physiologique optimal. Les conditions d'hébergement sont adaptées à l'espèce et à l'âge des animaux afin de maximiser leur confort et leur bien-être. Les animaux sont hébergés en groupe et des enrichissements du milieu sont installés dans les hébergements. La Structure en charge du Bien-Etre Animal (SBEA) garantit l'amélioration des techniques de soins et des conditions de vie pour les animaux.

17549 Face à la diminution importante de la biodiversité, de nombreux programmes de conservation proposent de renforcer les populations naturelles par la mise en nature d'individus nés et élevés en captivité. Cependant, il apparaît, que pour beaucoup d'entre eux, le taux de survie des individus

lâchés est faible, rendant inefficaces les efforts de conservation. Ce faible taux de survie peut être expliqué notamment par une altération des comportements adaptatifs chez les animaux nés en captivité. Les études en Ethologie ont mis en évidence que les caractéristiques comportementales d'un individu sont fortement influencées par ses parents. Ainsi, outre la transmission d'une partie de leur patrimoine génétique, les parents influencent également le développement de leur descendance de façon non génétique, à la fois par les interactions qu'ils ont avec leurs jeunes lors de la phase d'élevage (comme par exemple la transmission par apprentissage) mais aussi par l'environnement prénatal qu'ils leur procurent. Ainsi, chez l'oiseau, les conditions de vie de la femelle pendant la phase de ponte affectent la croissance et le développement comportemental de l'oisillon via des modifications de la composition hormonale de ses œufs. Ces influences maternelles prénatales permettraient de préparer les jeunes à un environnement postnatal particulier et donc, d'augmenter leurs chances de survie. Ainsi, les influences parentales, prénatales et postnatales, jouent un rôle fondamental dans les processus d'adaptation au milieu et pourraient donc être des outils majeurs de conservation permettant d'améliorer, chez les animaux nés et élevés en captivité, leurs capacités de survie en nature.

Dans ce contexte, notre projet vise à analyser l'impact des effets parentaux sur le développement comportemental des jeunes, et notamment sur des traits majeurs pour la survie en nature (émotivité /comportement anti-prédateur ; capacité d'exploration du milieu, capacité d'apprentissage). Pour cela, deux études complémentaires seront réalisées sur deux espèces proches phylogénétiquement. D'une part, chez la caille japonaise, nous analyserons l'effet d'un milieu de vie complexe (mimant certains paramètres environnementaux naturels) sur le comportement de femelles adultes pondeuses et de leurs descendants. Il s'agira ainsi de voir si les conditions de vie maternelles pourraient favoriser le développement de comportements adaptatifs chez les jeunes. Nous suivrons les effets de ce traitement sur plusieurs générations afin d'identifier des mécanismes de transmission transgénérationnelle. Une seconde étude sera réalisée sur la perdrix rouge, espèce à fort enjeux de conservation en France, présente en nature sur le territoire mais élevée également pour des raisons économiques. Chez la perdrix rouge, nous analyserons les effets à la fois des influences parentales prénatales et postnatales en complexifiant le milieu de vie des parents mais aussi celui des jeunes. Enfin, les perdreaux seront lâchés en nature sur 3 sites expérimentaux afin d'analyser leurs capacités de survie et de reproduction en nature.

La procédure sur la caille japonaise implique l'utilisation de 528 cailles, réparties en 48 cailles fondatrices (génération F0), et 3 fois 160 cailliteaux (générations F1, F2, F3 avec 80 individus par lot (2 lots)). Celle sur la perdrix rouge impliquera l'utilisation de 4320 perdrix rouges, réparties en 320 perdrix fondatrices (160 couples F0) ; 4000 perdreaux (F1, F2 avec 500 individus par lot (4 lots) par génération).

Cette procédure a été élaborée en adéquation avec la règle des 3R :

- Remplacement : l'objet de cette étude étant de comprendre le développement du comportement animal, nous ne pouvons pas avoir recours à des méthodes d'analyse in vitro.
- Réduction : le nombre d'oiseaux prévu tient compte de la forte variabilité comportementale qui est observée chez l'animal. En effet, pour pouvoir mettre en évidence des différences significatives entre les lots, un minimum de 80 individus par lot doit être testé (soit 160 par génération). De plus, le sexe des cailliteaux/perdreaux ne pouvant être déterminés à l'éclosion, nous devons analyser les effets sexe à postériori, avec comme prévision un sexe-ratio de 50/50, soit avec 40 individus par sexe et par lot. De plus, notre étude visant également à analyser la survie des perdrix lâchées en nature, 300 perdrix par lot par génération seront lâchées, cet effectif permettant d'assurer des données de survie à 1 an fiables.
- Raffinement : les oiseaux sont élevés et maintenus dans des conditions adaptées à leur âge : en groupe au jeune âge et en logette individuelle à l'âge adulte. Les animaux en logette individuelle peuvent toujours avoir des contacts visuels, auditifs et tactiles avec des congénères.

17550 La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie auto-immune articulaire inflammatoire chronique qui affecte surtout les femmes, avec un ratio de trois femmes pour un homme. La plupart des

patients ont des gènes HLA-DRB1*04:01, *04:04, dits gènes de susceptibilité à la maladie et ont très rarement les gènes HLA-DRB1*04:02, dits gènes de non-susceptibilité. Le risque le plus élevé de développer la maladie est d'avoir deux gènes de susceptibilité différents et notamment la combinaison portée par le génotype HLA-DRB1*04:01/*04:04. Pendant la grossesse, les cellules fœtales passent la paroi placentaire, vont vers la circulation maternelle et y persistent à long terme, créant un microchimérisme (Mc) fœtal chez la mère. Ce phénomène pourrait, dans un contexte génétique particulier, avoir un rôle dans le développement de certaines maladies auto-immunes chez les femmes. Les femmes atteintes de PR, qui n'ont pas les gènes de susceptibilité ont de grandes quantités de cellules fœtales microchimériques portant cette susceptibilité, dans leur sang, comparées aux femmes en bonne santé. Ceci suggère que le Mc fœtal peut contribuer au développement de la maladie. Il n'est pas possible d'utiliser des modèles *in silico* ou *in vitro* pour étudier le développement de l'auto-immunité chez la femelle post gestante microchimérique. Les souris sont un modèle idéal pour démontrer ce phénomène puisqu'elles ont le même type de placentation que les Hommes et leur cycle de gestation est très court (21 jours). Pour prouver que les cellules fœtales peuvent contribuer au développement de la maladie, nous allons utiliser un marqueur très spécifique de la maladie, utilisé comme outil diagnostique : la présence d'anticorps spécifiques des protéines citrullinées, appelés ACPAs. Ces anticorps protéines citrullinées apparaissent avant les signes cliniques de la maladie et en seraient peut-être la cause. La citrullination est une conversion d'une arginine en citrulline sur les protéines et se fait grâce aux enzymes PADs (peptidyl arginine deiminases). Nous allons également utiliser les résultats d'expériences animales précédemment validées APAFIS, pour lesquelles nous avons prouvé qu'en immunisant des souris portant la susceptibilité (C3H,KO/KI*04:04) avec les enzymes PAD, celles-ci développaient non seulement des anticorps contre la PAD, mais aussi contre les protéines que la PAD fixe et citrulline (ACPA). Par contre les souris non susceptibles (DBA/2, BALB/c) ne produisaient pas d'ACPA. L'objet de cette nouvelle demande est d'évaluer l'apport du Mc fœtal dans le développement des ACPA chez des souris femelles DBA/2 ou BALB/c non susceptibles et donc incapables d'en produire. Nous voulons montrer qu'elles peuvent en produire après avoir été croisées avec des mâles portant la susceptibilité génétique. La présence de cellules fœtales portant les gènes de susceptibilité chez les femelles non susceptibles devrait permettre le développement d'ACPA et possiblement d'arthrite. Les mâles portant la susceptibilité seront soit des souris sauvages C3H, soit des souris KOKI*04:01 ou *04:04, soit des souris KOKI*04:01/*04:04. Les tests contrôles seront réalisés en croisant de femelles qui ne portent pas la susceptibilité (incapables de développer des ACPA) avec des mâles qui ne portent pas non plus la susceptibilité. L'immunisation contre PAD, le suivi de la réponse immune et les prélèvements sanguins se feront à l'identique des demandes APAFIS précédentes. La seule différence est que les souris femelles auront été accouplées et seront immunisées après la mise-bas. Un prélèvement de sang sera réalisé avant l'accouplement (contrôle de non présence de Mc fœtal), pendant la gestation (contrôle de grossesse), post gestation avant la première immunisation et 4 fois après la première immunisation avec un intervalle de quinze jours. Une anesthésie gazeuse à l'isoflurane sera réalisée pour chaque prélèvement de sang des souris femelles. A la fin du protocole pour analyser leur réponse immune, les souris femelles seront euthanasiées par dioxyde de carbone. Les souriceaux seront euthanasiés par décapitation ou dioxyde de carbone.

Dans un but de réduction du nombre d'animaux utilisés, les mêmes mâles pourront servir pour plusieurs croisements dans la mesure du possible (appariement poids et âge avec les femelles), ils seront euthanasiés par dioxyde de carbone. Selon les combinaisons d'immunisation et les croisements, le nombre final de femelles effectivement immunisées en 5 ans est estimé à 1080 maximum. Les mâles mis en croisement le seront selon le ratio de 1 mâle pour 2 femelles par cage et pourront être utilisés deux fois (leur nombre sera donc de 270 au lieu de 540). Nous estimons le nombre maximum de souriceaux à 400 (5 souriceaux en moyenne par mère) correspondant à une expérience complète avec une seule protéine évaluée et deux accouplements différents avec des femelles d'un seul fond génétique. Le nombre total d'animaux est donc estimé à 1750 maximum. Cependant, si les femelles immunisées après les premiers croisements et les premières conditions d'immunisation donnent les résultats escomptés, nous ne testerons pas toutes les conditions de croisements puisque notre preuve de concept sera démontrée. Le nombre d'animaux sera donc

systématiquement revu à la baisse, selon la règle des 3R (Réduction, Remplacement, Raffinement), dès lors que nous aurons des résultats nous permettant d'éliminer des conditions d'immunisations et de croisements. Enfin selon cette même règle des 3R, chaque cage sera pourvue d'un enrichissement, rouleau en coton/ dôme en cellulose/ papier de Kraft pour satisfaire l'instinct naturel de nidification et améliorer l'habitat des souris pendant le protocole. Le bien être des souris sera évalué par le responsable du projet et les zootechniciens. Une grille d'évaluation de la souffrance de l'animal sera faite pendant la durée du protocole.

17551 Notre entreprise développe, fabrique et commercialise des tests de diagnostic pour la quantification de marqueurs biologiques dans le domaine de la biologie clinique humaine.

Le projet doit permettre de poursuivre la production d'anticorps monoclonaux générés à partir de nos propres lignées de cellules en utilisant des souris comme bio-réacteurs. Environ 80 anticorps monoclonaux sont produits en routine, ils constituent la matière première spécifique et essentielle à la fabrication de kits de Diagnostic In Vitro.

La production en ascite de souris permet d'obtenir des quantités importantes d'anticorps avec un niveau de qualité très élevé (spécificité, reproductibilité, stabilité. . .).

Le modèle souris représente le bioréacteur idéal et non égalé pour la multiplication de nos lignées d'hybridomes productrice d'anticorps, nous permettant d'obtenir des anticorps avec un niveau de qualité très élevé (spécificité, concentration, reproductibilité, stabilité. . .) et permettant de garantir la qualité analytique attendue par nos clients (laboratoire de biologie clinique humaine).

Les souris utilisées sont élevées par un fournisseur agréé sur prévisionnel de manière à répondre à nos stricts besoins; un modèle hybride de souris a été spécialement conçu par notre fournisseur pour une production optimale et raisonnée permettant de réduire au strict minimum le nombre d'animaux utilisé pour ces productions.

Le projet devrait utiliser un maximum de 7000 souris/an, sur la période de 5 ans, soit un maximum de 35000 animaux sur 5 ans, la quantité stricte nécessaire étant ajustée chaque année. Ce nombre d'animaux permet de produire annuellement 7 à 800 grammes d'anticorps.

Par ailleurs, nos déclarations annuelles de nombre d'animaux utilisés prouvent notre extrême vigilance à l'utilisation du nombre d'animaux le plus faible possible (en 2019, nous avons utilisé 23% d'animaux en moins par rapport à 2016 et la baisse du nombre d'animaux utilisés a été constante d'une année sur l'autre).

La règle des 3R est respectée de la manière suivante :

REDUIRE :

Le choix de nos hybridomes (bonne productivité), l'optimisation de nos protocoles de fabrication des kits et le choix du type de souris nous permettent de limiter l'utilisation d'animaux à nos stricts besoins en anticorps. Un suivi statistique de nos productions nous permet d'optimiser en continu le nombre d'animaux utilisé.

RAFFINER :

Les souris sont hébergées dans des conditions conformes à la réglementation en vigueur, une observation quotidienne est réalisée par du personnel compétent et les litières sont changées hebdomadairement.

Un planning précis est édité, détaillant les jours de réalisation de chacune des opérations du protocole de production.

La méthode d'euthanasie utilisée est en conformité avec la réglementation en vigueur.

Un enrichissement par apport de buchette en bois (1 par cage) a été mis en place. Par ailleurs, un élément d'enrichissement en polycarbonate "tunnel carré rat" qui sert de jeu, nid, perchoir, est également présent dans chaque cage.

REMPLETER :

Nous avons mis en place une étude pour permettre une substitution progressive de cette méthode de production in-vivo par des méthodes in-vitro qui devrait diminuer la quantité de souris utilisée au

fil des ans. Certains clones ont déjà pu être transférés en production in vitro, permettant de contribuer à diminuer le nombre d'animaux utilisés annuellement.

17552 La radiothérapie est, après la chirurgie, le traitement actuellement le plus utilisé pour combattre le cancer. La radiobiologie cherche à potentialiser les effets des rayonnements ionisants (RI), utilisés en radiothérapie, sur les tissus tumoraux, et de minimiser au maximum l'impact de ces derniers sur les tissus sains. Effectivement, la difficulté à délimiter exactement une tumeur et les marges nécessaires à prendre au niveau de sa périphérie font que les RI traversent aussi les tissus sains. Les effets secondaires à court terme de l'interaction tissus sains - RI peuvent se manifester entre autre sous forme d'erythème cutané, de desquamations, de xerostomie, d'agueusie/dysgueusie, de pharyngite, de laryngite, d'oesophagite, de dysacousie, d'otalgie, d'osteoradionecrose, de stomatite/mucite buccale (inflammation de la muqueuse), d'alopécie, etc. .

La radiothérapie joue un rôle important dans la prise en charge des cancers du sein. Parmi les effets secondaires, il faut savoir que plus de 95% des patientes traitées pour un cancer du sein par radiothérapie vont développer une forme plus ou moins sévère de radiodermite (érythème cutané). Ceci est à l'origine d'une altération de la qualité de vie pour les patientes, mais cela peut aussi conduire à des arrêts de traitement et donc de manière indirecte réduire l'espérance de vie des patientes.

L'objectif du projet que nous souhaitons mener, est de tester, sur un modèle murin, une application locale d'une solution contenant une molécule possédant des propriétés vasoconstrictrices. Une vasoconstriction soutenue dans le temps au niveau de la peau malencontreusement irradiée permettrait de réduire les effets nocifs des rayons à cet endroit-là. Il est donc fort probable qu'une application répétée de la solution thérapeutique empêche le développement de la radio-dermite.

Pour ce faire, le projet nécessite l'utilisation d'organisme vivant, disposant d'un système immunitaire, la dermatite étant une réaction inflammatoire. En effet, il n'existe pas à l'heure actuelle de modèle in vitro permettant de simuler de telles réactions. De plus, la radiothérapie entraîne des modifications conséquentes dans les tissus humains, ainsi qu'au niveau du système immunitaire, ce qui ne peut être reproduit in vitro. Enfin, l'intégration de ce traitement dans un organisme complexe et complet permet de se rapprocher au mieux des conditions réelles de traitement observées chez les patients, en gardant à l'esprit que nous sommes dans le cadre d'un modèle animal.

Pour mener à bien ce projet et avoir une idée précise du potentiel en thérapeutique humaine de ce nouveau produit, 318 souris seront nécessaires à son évaluation sur 4 années d'étude. Cette estimation se base sur des analyses statistiques qui permettent de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés dans cette étude. Diverses stratégies permettront de limiter un maximum le stress et la souffrance des animaux, notamment l'anesthésie pendant l'irradiation, au lieu de la contention. Des points limites stricts ont été élaborés. Les conditions de vie des animaux seront par ailleurs toujours les plus apaisantes possible, avec de l'enrichissement comme des nids ou des rouleaux en carton. Les animaux seront observés quotidiennement pour détecter tout signe éventuel de souffrance ou de toxicité des traitements.

17553 Notre projet de recherche translationnelle et appliquée concerne les maladies musculaires humaines d'origine génétique (myopathies congénitales). L'objectif est de valider et de caractériser un nouveau gène candidat impliqué dans une myopathie congénitale. Les résultats auront un impact direct pour le diagnostic moléculaire des patients atteints de myopathies congénitales, pour leur prise en charge, et ouvriront de nouvelles perspectives thérapeutiques. Nous avons identifié chez des patients souffrant de Myopathies Centro Nucléaire (CNM) des variations génétiques sur le gène BTBD1 et nous souhaitons poursuivre la caractérisation de ce gène sur un modèle animal.

En effet, après avoir réalisé des tests in vitro, sur cellules, qui nous ont permis de partiellement valider la pathogénicité des variations identifiées dans ce gène, il nous est indispensable de poursuivre la caractérisation de ces variations par un modèle murin qui nous permettra de comprendre l'impact de ces variations sur un organisme entier (REMPACEMENT).

Afin de réduire le nombre de souris nécessaire, chaque souris sera suivie et testée via plusieurs analyses, de plus, le nombre d'animaux sera réduit au maximum pour obtenir une puissance statistique suffisante. Ainsi nous pouvons avancer que 20 souris au maximum par groupe seront nécessaires pour conclure sur le projet (RÉDUCTION).

Cette maladie peut entraîner des difficultés pour se déplacer, de la nourriture sera placée dans la cage. Afin de s'assurer que les animaux ne souffrent pas, un contrôle quotidien sera effectué. Tout signe de douleur sera pris en charge en prenant les mesures appropriées en fonction du niveau de douleur observé. Pour le nouveau-né, la douleur sera évaluée visuellement : capacité à se retourner, couleur de la peau, capacité à se mouvoir. À partir du sevrage, une perte de poids de 20% en une semaine conduira à la mise à mort (RAFFINEMENT).

Pour cette étude, un maximum de 223 souris seront nécessaires, 60 souris pour les expériences et 163 pour la génération de la cohorte, le maintien de la lignée et la cryo préservation.

17554 Les virus influenza A et B (IAV et IBV respectivement) sont des agents pathogènes responsables de la mort de près de 500 000 personnes par an dans le monde. L'organisation mondiale de la santé (OMS) a classé la possibilité de survenue d'une nouvelle pandémie grippale dans les 10 plus importantes menaces pour la santé humaine en 2019. Actuellement, des stratégies vaccinales préventives existent pour contrôler l'infection par les souches saisonnières d'influenza et seuls deux traitements thérapeutiques, présentant des problèmes de résistance, sont approuvés en Europe. Ainsi, une meilleure compréhension de la multiplication du virus Influenza, de sa propagation dans les hôtes infectés et de son inhibition par le système immunitaire est essentielle dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. L'objectif de ce projet est de développer un modèle d'infection virale qui servira dans d'autres projets pour comprendre les mécanismes de propagation virale et de défense de l'hôte.

Afin d'étudier au mieux la propagation du virus dans l'hôte, l'utilisation d'une souche d'IAV rapportrice, qui permet de visualiser le virus dans les organes par imagerie optique, est envisagée. L'utilisation d'une activité rapportrice de l'expression virale représente un outil précis, et reproductible. Cet outil permet non seulement de suivre la multiplication du virus mais aussi de visualiser l'évolution de la charge virale après infection directement in vivo, par imagerie non invasive, limitant ainsi le nombre d'animaux à utiliser. Le but de ce projet est ainsi de déterminer les conditions d'infection de cette souche d'IAV afin d'obtenir une dose sub létale (c'est-à-dire qui la dose de virus la plus forte qui puisse être utilisée, sans qu'un animal n'atteigne un point limite). Une fois développé, ce modèle d'infection virale pourra être étudié par imagerie non invasive dans d'autres projets.

Ce projet se divise en trois procédures :

- la procédure 1 vise à s'assurer que les souris sont susceptibles à l'infection par la souche d'IAV utilisée dans le cadre de l'activité rapportrice et, au besoin, d'optimiser cette souche pour faciliter l'infection des cellules cibles murines. Pour cela, des groupes d'animaux seront infectés par la souche d'IAV originale ou modifiée et seront mis à mort 10 jours (pic de l'infection) ou 6 semaines (phase mémoire) afin d'étudier la mise en place des réponses immunes de l'hôte.

- la procédure 2 vise à déterminer la dose virale optimale de ce virus et de son équivalent rapporteur, à utiliser pour une infection sub létale. Pour cela, des groupes d'animaux seront infectés par les différentes souches d'IAV et les animaux feront l'objet d'une surveillance quotidienne (suivi du poids et de l'aspect général des animaux).

- La procédure 3 vise à déterminer l'évolution de la charge virale et des cinétiques de réponses immunes générées par les doses sublétales d'IAV et de son équivalent rapporteur, déterminées dans la procédure 2. Pour cela, des groupes d'animaux seront infectés par une dose sub létale d'IAV ou de son équivalent rapporteur, et seront mis à mort différents temps post-infection afin d'étudier les cinétiques de charge virale et des réponses immunes de l'hôte.

Aucun dommage n'est attendu pour l'ensemble de ces procédures.

Le projet nécessitera l'utilisation de 150 souris maximum. Le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum sans toutefois compromettre l'analyse statistique des résultats.

Le choix du modèle souris est imposé par la nécessité de pouvoir utiliser des animaux génétiquement modifiés. De plus, les mécanismes mis en place au cours de la réponse immunitaire représentent des phénomènes biologiques complexes et dynamiques, faisant intervenir de multiples types cellulaires et dont l'organisation spatiale rend impossible son étude dans des tests in vitro.

Les conditions d'élevage (hébergement, soins), d'anesthésie ainsi que les procédures et points limites adaptés ont été définis afin de réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage que pourraient ressentir les animaux.

17555 Les maladies lysosomales sont des maladies génétiques dues à des défauts d'un compartiment interne de la cellule, le lysosome. Sur le plan clinique, elles se caractérisent par l'apparition de troubles graves et irréversibles de multiples organes. Les symptômes, souvent absents à la naissance, apparaissent dans la petite enfance, l'enfance ou l'adolescence, voire à l'âge adulte, selon les maladies. Au sein d'une maladie, il existe souvent diverses formes cliniques. En l'absence de traitements, ces troubles évoluent irrémédiablement vers un polyhandicap, des troubles neurologiques sévères et une mort précoce.

Lors de l'étude d'une maladie lysosomale particulière, nous avons découvert l'existence d'une interaction génétique forte entre la protéine lysosomale défectueuse dans cette maladie et une autre protéine lysosomale. Cette interaction se manifeste dans un modèle murin par une létalité embryonnaire et des défauts sévères de développement cérébral lorsque les deux protéines lysosomales sont inactivées. Des résultats préliminaires ont permis de formuler une hypothèse sur le lieu de cette interaction sous-jacente au phénomène de létalité embryonnaire.

Notre projet a pour but d'élucider le mécanisme de cette interaction afin de mieux comprendre et mieux traiter la maladie associée, voire d'autres maladies lysosomales.

Nous chercherons dans un premier temps à savoir si nous pouvons corriger la létalité prénatale en changeant la nutrition des souris femelles gravides ou en les traitant par des médicaments incorporés dans l'eau de boisson. Nous regarderons aussi l'effet de la réintroduction des protéines absentes dans l'embryon ou le sac vitellin qui l'entoure. Par ailleurs, afin d'évaluer si le phénotype de létalité synthétique observé est spécifique d'un couple de protéines lysosomales ou s'il s'agit d'un phénomène plus général, nous croiserons des souris déficientes en l'une des protéines impliquées avec d'autres modèles murins de maladies lysosomales.

Nous étudierons également les embryons de souris à différents stades (10,5e et 16e jours embryonnaires) ainsi que le sac vitellin les entourant. Nous utiliserons des approches biochimiques, histologiques, et fonctionnelles à différentes échelles (organisme, tissus, cellules) pour caractériser ces défauts embryonnaires.

Dans ce projet, nous nous efforçons de respecter au mieux la « règle des 3R ».

- Réduire. Le nombre d'animaux utilisés est choisi comme le minimum permettant d'établir la significativité statistique

des mécanismes étudiés. Quand cela est possible, une même souris sera utilisée pour obtenir plusieurs résultats (exemple : plusieurs embryons d'une même souris femelle seront étudiés).

- Raffiner. Dans tous les cas, un suivi précis du stress ou de l'inconfort ressenti par les animaux est effectué afin de les supprimer au maximum. Des tests systématiques et des critères objectifs sont mis en place pour évaluer l'état des animaux et détecter toute souffrance. Seules des personnes entraînées réalisent les manipulations d'animaux afin de suivre les règles de bonnes pratiques.

- Remplacer. Une partie de l'analyse des mécanismes impliqués sera faite sur des cellules in vitro, quand cela est possible, afin de limiter le nombre d'animaux utilisés.

Dans ce projet, nous utiliserons 555 souris.

Ce projet permettra de mieux comprendre le rôle des lysosomes au cours du développement, un domaine de recherche insuffisamment étudié malgré ses conséquences importantes sur la santé humaine, bien au-delà du cas particulier des maladies lysosomales. En effet, de nombreuses

pathologies (maladies neurodégénératives, cancer, maladies infectieuses...) mettent en jeu des altérations des lysosomes et des facteurs environnementaux, telles que certaines nanoparticules, affectent aussi cet acteur essentiel de la cellule.

17556 Les pesticides sont largement utilisés dans les secteurs agricoles et industriels, mais aussi par les particuliers, conduisant à des concentrations non négligeables de pesticides dans les rivières et les sols. Parmi ces pesticides, la famille d'herbicide des phénylurées comporte diverses molécules, dont le mode d'action est l'inhibition de la photosynthèse. Le diuron (IUPAC : 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-diméthylurea), étudié dans notre projet, appartient à cette famille. Il entre dans la composition de plusieurs dizaines de produits phytosanitaires. Malgré son interdiction en France fin 2008, le diuron fait toujours parti des 15 pesticides les plus détectés dans les cours d'eau Français.

L'exposition aux pesticides augmente, en outre, la sensibilité des hommes aux infections bactériennes et virales et peut conduire à des maladies cardiovasculaires, neurodégénératives ou des cancers. Nous pensons donc que les pesticides altèrent les capacités de réponse des cellules immunitaires et augmentent ainsi la sensibilité des hommes aux maladies. En effet, quelque soit la voie d'entrée des pesticides (respiratoire, cutanée et oculaire), les cellules immunitaires y seront exposées, de par leur large distribution à travers l'organisme.

Pour être mis sur le marché, les pesticides ne doivent pas être génotoxiques, nous pensons donc qu'ils pourraient exercer leurs effets néfastes sur les cellules immunitaires via des mécanismes épigénétiques. Parmi les mécanismes épigénétiques, nous nous intéressons plus particulièrement aux petits ARNs non codants, appelés micro-ARNs (miARNs) et ce pour plusieurs raisons : 1) plus de 60% des gènes humains sont régulés par au moins un miARNs ; 2) un seul miARN peut réguler plusieurs dizaines de gènes et 3) les miARNs sont stables dans les fluides biologiques et peuvent donc facilement passer d'une cellule à une autre, pour y exercer leurs effets parfois à très longue distance.

In vitro, nous avons montré que les lymphocytes T CD8+ exposés au diuron présentait une réponse immune anti-tumorale (mélanome et mésothéliome) et antivirale (grippe) diminuée, avec notamment une diminution de la sécrétion de cytokines clés telles que l'IFN γ et le TNF α , et une diminution de l'activité cytotoxique de ces cellules (diminution de la sécrétion du granzyme B et de leur capacité de lyse des cellules tumorales). Nous avons également observé une dérégulation des miARNs exprimés dans les cellules exposées au diuron et ce, de façon dose-dépendante. De façon intéressante, certains miARNs dérégulés sont également impliqués dans la régulation de la réponse T. Les expérimentations animales décrites ci-dessous visent à étudier l'impact du diuron sur la réponse anti-tumorale, in vivo, dans un modèle de mésothéliome.

Une attention toute particulière sera donnée à la réduction du nombre de souris utilisées par des études statistiques a priori. Les méthodologies utilisées prendront en compte le suivi des points limites pour interrompre l'expérimentation le plus tôt possible et minimiser douleur et détresse des animaux. Le milieu d'hébergement des souris sera par ailleurs enrichi (lambeaux de papier, copeaux de litière) et les animaux seront surveillés quotidiennement.

La réalisation du projet nécessitera sur 1 an l'utilisation de 48 souris NSG (mâles et femelles) de 8 à 10 semaines.

17557 Le trouble déficitaire de l'attention avec hyperactivité (TDAH) est un syndrome dont le diagnostic nécessite (selon le DSM-IV) d'avoir trois composantes principales qui doivent persister pendant au moins six mois consécutifs: l'inattention, l'hyperactivité et l'impulsivité.

Le test du labyrinthe en T qui sollicite la capacité à attendre, permet d'étudier l'impulsivité (incapacité à attendre) et de mesurer les effets d'agents pharmacologiques sur ce comportement.

L'impulsivité est un trait comportemental caractéristique de plusieurs pathologies, dont l'un des aspects est l'incapacité à tolérer l'attente. De plus, l'impulsivité est fréquemment associée aux conduites violentes, délictueuses, boulimiques ou suicidaires.

De nombreuses données cliniques suggèrent l'existence d'une diminution de l'activité des neurones monoaminergiques centraux, et plus particulièrement des neurones sérotoninergiques chez des sujets présentant ces types de conduites.

Les médicaments principalement prescrits sont des stimulants, tels que le méthylphénidate et l'amphétamine et un inhibiteur de la recapture de la noradrénaline, l'atomoxétine. Ces médicaments sont utilisés comme molécules de référence dans ce projet.

L'efficacité de certains traitements médicamenteux est réelle. Elle reste néanmoins très perfectibles, certains patients répondant mal aux traitements. Par ailleurs, ces composés présentent des effets secondaires chez certains patients, notamment sur le plan du métabolisme, sur le plan cardiaque ou d'ordre psychiatrique. La recherche de traitements plus efficaces et présentant moins d'effets secondaires est donc une nécessité.

Il y a une vingtaine d'années, un test a été mis au point chez le rat afin d'étudier la capacité à attendre.

Le principe est de soumettre l'animal à un choix entre une faible récompense obtenue immédiatement et une forte récompense obtenue après un délai d'attente.

Une augmentation ou une diminution du nombre de choix pour la forte récompense différée sont interprétées, respectivement, comme une augmentation ou une diminution de la capacité à attendre.

Le labyrinthe en T est composé de trois branches (tubes en PVC) : une branche de départ, 2 branches latérales menant à des boîtes d'arrivée. Des récompenses alimentaires sont disposées dans les boîtes d'arrivée. L'une des boîtes (gauche ou droite selon le rat) est pourvue d'une forte récompense, l'autre d'une faible récompense. Des portes amovibles sont utilisées pour maintenir le rat dans l'une ou l'autre branche du labyrinthe.

Une étude standard comprend 84 animaux :

- 60 animaux sont répartis en 5 groupes de 12 rats, qui reçoivent le produit testé à 3 doses, un produit de référence (selon les protocoles soit méthylphénidate soit l'amphétamine soit l'atomoxétine) et un placebo.

- 24 animaux satellites qui sont utilisés uniquement pour des prélèvements qui sont répartis en 4 groupes de 6 rats ; qui reçoivent le produit testés à 3 doses et le placebo.

Des études peuvent comprendre un nombre plus élevés ou plus faible d'animaux (par exemple pour l'étude d'un nombre de doses supérieur ou inférieur).

Le nombre de produits testés par an est de 10.

Le nombre total maximum de rats utilisés sur 5 ans est de 4200. (84 animaux/étude x études/an x 5 ans)

Respect de la règle des 3 R :

- Réduire. Le nombre total d'animaux utilisés pour une étude est fonction du nombre de groupes et du nombre d'animaux par groupe nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement interprétables.

- Justification du nombre de groupes : 1) Le groupe témoin est nécessaire à chaque expérience compte tenu des variations de performances entre lots d'animaux ; 2) Le groupe produit de référence est nécessaire pour valider l'expérience et pour comparer l'efficacité du produit testé à un produit de référence. Selon les études, le produit de référence est soit un stimulant, tels que le méthylphénidate ou l'amphétamine soit un inhibiteur de la recapture de la noradrénaline, l'atomoxétine. ; 3) Il est généralement nécessaire de tester le produit à 3 doses pour mesurer la relation dose-effet, mais un nombre de doses inférieur ou supérieur peut être justifié en fonction de l'état de connaissance du produit.

- Justification du nombre d'animaux par groupe. Compte tenu de la variabilité interindividuelle des variables mesurées dans ce test, ce nombre a été fixé à 12 animaux par groupe. L'utilisation d'un nombre inférieur d'animaux a une probabilité importante d'entraîner la non-validité de l'étude, conduisant à la refaire, et par conséquent à utiliser un nombre d'animaux plus élevé.

-Justification de la restriction alimentaire. Le test consistant à délivrer des récompenses après des réponses de l'animal, la restriction alimentaire est nécessaire pour que les animaux présentent des performances optimales de réalisation de la tâche. Cette restriction est fonction de l'âge. Elle est calculée de façon, à la fois, à permettre un niveau de motivation élevé pour réaliser la tâche et n'entraîner aucune détérioration de l'état physique de l'animal. Cet état physique est évalué tous les jours : contrôle de l'état sanitaire général de l'animal et si celui-ci présente une activité normale dans la cage d'élevage.

-Raffiner. Des animaux présentant des signes de souffrances sont euthanasiés. Outre la motivation éthique conduisant à cette euthanasie, celle-ci est requise pour des raisons expérimentales; la souffrance d'un animal biaisant les variables comportementales mesurées. L'utilisation de traitements pour pallier à cette souffrance est exclue, ces types de traitement étant susceptibles de modifier le comportement des animaux et l'action pharmacologique des produits étudiés. Dans ce test, le pourcentage potentiel d'animaux pouvant « souffrir » (souffrance induite par le régime alimentaire et induite par les produits administrés) est inférieur à 1%.

L'évaluation de la souffrance, de la détresse et de l'inconfort des animaux est réalisée tous les jours: 1) Les animaux sont d'abord attentivement observés sans être dérangés: l'observation des différentes postures permettent d'évaluer un comportement normal ou anormal. La réaction des animaux à un stimulus externe peut être également vérifiée (ex: bruit léger) avant de s'approcher directement de la cage pour manipuler les animaux. 2) Ensuite, les animaux sont manipulés pour l'examen clinique. Durant celui-ci, les signes et des mesures (dont celle du poids de l'animal) sont notés dans une grille de scoring détaillée un peu plus loin.

-Remplacer. Il n'existe pas à ce jour de modèle n'utilisant pas d'animaux ou ayant un degré de sévérité inférieur permettant d'obtenir des informations équivalentes à celles obtenues par le présent modèle.

17558 La greffe de moelle osseuse est le seul traitement permettant d'obtenir la guérison de certains cancers du sang (leucémies, lymphomes...). La greffe permet que le système immunitaire du donneur reconnaisse comme étrangères les cellules cancéreuses du receveur et ainsi les tue : c'est ce qu'on appelle l'effet anti-tumoral du greffon (ou GVT « greffon versus tumeur »). Toutefois, les cellules du système immunitaire du donneur sont incapables de faire la différence entre une cellule cancéreuse et une cellule saine du receveur. L'attaque des cellules saines du receveur par le système immunitaire du donneur s'appelle la maladie du greffon contre l'hôte (GVH pour « greffon versus tumeur »). Cette complication se développe chez 50% des patients greffés et elle est à l'origine de dysfonctionnements sévères d'organes pouvant conduire au décès des patients. Tous les médicaments développés pour contrôler la GVH diminuent l'effet GVT (et donc augmentent la rechute du cancer). La seule stratégie qui permettrait de moduler la GVH sans altérer l'effet GVT est la thérapie cellulaire. La modulation du système immunitaire du donneur pourrait se faire en enrichissant ou en éliminant certaines cellules immunitaires régulatrices du donneur. Les cellules myéloïdes suppressives (MDSCs) sont des candidates extrêmement intéressantes, puisqu'elles ont été décrites in vitro chez la souris comme capables de moduler le système immunitaire du donneur. Toutefois, le métabolisme de ces cellules varie très rapidement en fonction du contexte clinique dans lequel elles se trouvent (inflammation, maladie cancéreuse résiduelle, flore microbienne du tube digestif....). Envisagées comme thérapie cellulaire dans des modèles murins de GVH (avec des MDSC murines), elles pourraient rapidement perdre leur fonction et disparaître in vivo. Nous avons largement étudié les MDSCs humaines in vitro. Nous savons : les produire, les faire se multiplier, les moduler dans leur métabolisme, les inhiber dans leurs propriétés immunosuppressives et les dépléter. Nous souhaitons maintenant vérifier in vivo leur utilité et leur innocuité dans la greffe de moelle osseuse, avant de les proposer en tant que thérapie cellulaire en clinique. Le modèle murin utilisé est le seul mondialement reconnu et indispensable pour valider toute étude pré-clinique de thérapie cellulaire dans l'allogreffe de moelle osseuse : la souris NSG-S : NOD. Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl Tg(CMV-IL3,CSF2,KITLG)1Eav/MloySzJ. Ces souris, dépourvues de système immunitaire murin (excepté quelques mono-macrophages et quelques cellules dendritiques), et sécrétant des cytokines humaines, sont capables d'accepter des cellules

sanguines normales et cancéreuses humaines. Aucun remplacement de cette étape pré-clinique n'est possible. Ce projet a trois principaux objectifs, dont l'utilisation d'un modèle animal est indispensable, sans remplacement possible: -Etudier la biodispersion des MDSCs en fonction du contexte clinique : combien de temps les MDSCs persistent après injection in vivo, où se localisent elles (dans le microenvironnement tumoral, dans les sites de GVH...) ?. -Etudier les interactions des MDSCs vis-à-vis des cellules de l'immunité du donneur et des cellules leucémiques du receveur : est-ce que les MDSCs sont capables d'atténuer la réponse immunitaire du donneur (efficacité contre la GVH)? Ne risquent-elles pas de promouvoir la pousse de cellules leucémiques (innocuité vis-à-vis de l'effet GVT)? -Enfin, observer l'impact pré-clinique de l'injection de MDSCs au moment de la greffe de moelle osseuse, sur la GVH et l'effet GVT Ce projet est donc construit autour de 3 grands types d'expérimentations. Les procédures utilisées sont : l'irradiation par une source de rayon X, l'injection intra-veineuse de cellules humaines, les prélèvements sanguins pour le suivi immunologique et le suivi par imagerie Page 2 3. Informations Administratives et Réglementaires 3. 1. L'Etablissement Utilisateur 3. 1. 1. Agrément de l'Etablissement Utilisateur (EU) où seront utilisés les animaux A noter, que pour les expérimentations de biodispersion, et de fonctionnalité/interaction in vivo des MDSCs avec le système immunitaire et les cellules leucémiques, les expérimentations seront de quelques jours et s'arrêteront au maximum 15 jours après la greffe, avant que l'installation des signes cliniques de GVH ne puisse se voir. En effet, nous savons que les cellules de l'immunité du donneur s'éduque, interagit, communique dans son nouvel environnement receveur dans les 15 premiers jours qui suivent l'injection. Ce n'est qu'à partir de 15 jours après la greffe que le système immunitaire du donneur migre vers les organes cibles et donc que les premiers signes cliniques de GVH s'observent. Les points limites pour ce type d'expérimentation seront basés sur une observation quotidienne des souris avec une évaluation de la douleur jugée sévère selon le "Mouse Grimace Scale" et une perte de poids supérieure ou égale à 20% observée sur 2 jours consécutifs. L'atteinte de ces points limites ou tout effet indésirable inattendu entraînera systématiquement une mise à mort par asphyxie au CO2. Pour les expérimentations avec suivi clinique des souris greffées, le suivi clinique quotidien est de 2 mois maximum (incidence cumulée de GVH, score de GVH, progression tumorale). Les points limites sont : un score de GVH supérieur ou égal à trois, une évaluation de la douleur jugée sévère selon le "Mouse Grimace Scale" et une perte de poids supérieure ou égale à 20% observée sur 2 jours consécutifs. L'atteinte de ces points limites ou tout effet indésirable inattendu entraînera systématiquement une mise à mort par asphyxie au CO2. Raffinement : Toutes les souris seront observées quotidiennement en terme de respect du bien-être ; elles seront hébergées en portoir ventilé, cage avec capot et filtre HEPA® à 6 souris par cage de 500 cm², alimentation irradiée et eau stérile avec un enrichissement du milieu par du papier préalablement autoclavé à l'intérieur de chaque cage. Réduction : Le projet estime après calcul "a priori" statistique de l'utilisation nécessaire maximale de 204 souris sur 3 ans. En effet, pour les expérimentations de biodispersion et de fonctionnalité/interaction des MDSCs avec son environnement, un minimum de 4 à 6 souris par groupe est nécessaire, avec une procédure qui peut se répéter 3 fois pour analyser la reproductibilité de l'effet de MDSCs produites à partir de 3 donneurs différents. Pour les expérimentations de suivi clinique, selon la littérature, il a été observé que l'administration de cellules régulatrices de la GVH, améliore de façon statistiquement significative l'incidence cumulée et la sévérité de la GVH lorsque les groupes contrôles et expérimentaux sont suffisamment dimensionnés (allant de 6 à 12 souris receveuses par groupe). L'expérimentation s'arrêtera dès l'obtention d'une différence significative entre les groupes (minimum 6 souris par groupe), et ne sera pas poursuivie en l'absence de différence statistiquement significative observée au-delà de 12 souris receveuses par groupe.

17559 Une fonte musculaire sévère est associée à de nombreuses pathologies chroniques comme le cancer, les myopathies et le vieillissement. Cette perte de masse musculaire est très délétère pour le patient, affectant sa qualité de vie mais aussi réduisant la réponse aux traitements et la survie. La compréhension de cette atrophie musculaire et le développement de traitements efficaces représentent un réel enjeu clinique. Des molécules de l'inflammation, appelées cytokines, produites notamment par les cellules immunitaires, les tumeurs ou le muscle lui-même, induisent un

programme cellulaire conduisant à une fonte du muscle (diminution de la synthèse des protéines musculaires et une augmentation de leur dégradation) et une perte de force musculaire.

Nous avons développé un nouveau modèle de souris génétiquement modifiées exprimant dans le muscle squelettique un gène impliqué dans la régulation de la masse musculaire. Cette modification est induite chez l'animal adulte, après la phase de croissance post-natale du muscle. Les animaux présentent alors une perte de masse musculaire progressive récapitulant l'atteinte musculaire observée dans les maladies chroniques. Cette demande d'autorisation est une demande complémentaire de l'autorisation initiale obtenue pour l'étude de ce modèle génétique de perte de masse musculaire. Cette étude complémentaire est initiée suite à des données expérimentales récemment obtenues et a pour objectif de valider nos résultats par une exploration fonctionnelle du métabolisme chez l'animal.

La composition corporelle (masse musculaire et masse grasse), la dépense énergétique seront évaluées longitudinalement au cours du développement de l'atrophie musculaire par des techniques non invasives de RMN et de calorimétrie indirecte. Ce suivi sera réalisé sur plusieurs semaines, sur une période pendant laquelle le phénotype des animaux est bien connu et modéré.

A la fin du suivi longitudinal, les souris seront mises à mort et les muscles prélevés exploités pour des analyses biologiques, métaboliques et histologiques.

Ce projet permettra de compléter des données scientifiques existantes sur ce modèle et de mieux comprendre les dérégulations métaboliques associées à la fonte musculaire induite par la cachexie et d'identifier de nouvelles cibles moléculaires intéressantes pour le développement de nouveaux traitements.

Nous allons appliquer la règle des 3Rs:

Remplacement: Des expériences dans les cellules seront réalisées quand cela sera possible mais le modèle murin est essentiel pour étudier fonctionnellement le muscle et également étudier l'impact des défauts musculaires sur le reste de l'organisme.

Réduction: Nous utiliserons le nombre d'animaux minimal permettant d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. Le maximum de données pouvant être généré à partir d'un même groupe d'animaux sera recherché. Cependant, l'analyse de la physiologie musculaire et son impact sur le métabolisme de l'organisme ne peuvent être évalués à l'heure actuelle, sur des cultures cellulaires.

Raffinement: Un personnel qualifié s'assure du bien-être des animaux au quotidien, un personnel expérimenté pratiquera les interventions expérimentales sur les animaux. Une surveillance quotidienne des animaux sera réalisée. Nombre d'animaux : 64 souris.

17560 Un couple sur 7 souffre d'infertilité dans le monde, et 2 à 3% des enfants conçus en France sont issus d'une fécondation in vitro. Cependant, les traitements hormonaux utilisés ont une efficacité limitée et seulement 50% des couples traités pour une fécondation in vitro ont un enfant après 4 à 5 cycles de traitement.

Nous développons une nouvelle molécule capable d'améliorer l'efficacité de ces traitements. Son activité a été démontrée sur des modèles in vitro et in vivo. Avant l'entrée en phase clinique, cette molécule doit être modifiée par ingénierie moléculaire afin de pouvoir être injectée à l'homme. Dans ce processus, plusieurs variants humanisés seront produits et leur activité devra être testée dans des modèles animaux utilisés par la pharmacopée. Pour cela, nous utiliserons un bioessai chez le rat et un bioessai chez la rate. La règle des 3R est appliquée :

REMPACEMENT : La fonction de reproduction chez les mammifères est le résultat d'une communication hormonale étroite et complexe entre l'hypothalamus, l'hypophyse, et les gonades. Les modèles in vitro ne peuvent refléter une telle complexité.

REDUCTION : Le nombre total d'animaux a été calculé en fonction du nombre de molécules à tester que nous estimons pouvoir obtenir au cours de ce processus. Mille cent (1100) mâles et mille cent (1100) femelles seront utilisés au maximum. Le nombre d'animaux nécessaire a été estimé grâce à des expériences antérieures et des tests statistiques.

RAFFINEMENT : Les conditions d'hébergement des animaux ne seront pas modifiées. Il y aura un enrichissement du milieu par ajout de copeaux et de jouets. En cas d'isolement ou de prostration, l'expérimentation sur cet animal sera immédiatement interrompue et l'animal sera euthanasié.

17561 Ce protocole s'inscrit dans une stratégie de vectorisation vers les protéoglycanes du cartilage in vivo, d'agents diagnostiques appelés radiopharmaceutiques pour le suivi fonctionnel des pathologies articulaires en médecine nucléaire par imagerie TEP (Tomographie d'Emission de Positons).

L'objet de ce projet sera de sélectionner sur 4 candidats, la molécule radiomarquée au gallium 68 et ciblant les protéoglycanes, dont la distribution in vivo sera la plus favorable à l'obtention d'une imagerie hautement contrastée du cartilage, dans un délai de 1 à 2 heures après administration intraveineuse.

Ce projet consistera donc en une étude de distribution in vivo par imagerie TEP de 4 molécules radiomarquées au gallium 68 et prélèvements d'organes chez le rat sain.

La règle des 3R sera scrupuleusement respectée.

Remplacement : la validation préclinique du ciblage in vivo du cartilage est absolument nécessaire et les études sur cellules ne peuvent se substituer aux études sur un organisme entier. Il n'y a donc pas d'alternatives.

Raffinement : le modèle animal choisi est le rat sain. La surveillance quotidienne des animaux permettra de déceler les premiers signaux de stress, de douleurs ou d'inconfort pour l'animal qui pourront être améliorés par l'administration d'antalgiques. En cas d'apparition de points limites défini, le protocole sera stoppé et l'animal mis à port selon la réglementation en vigueur. Les conditions d'hébergement seront optimisées (portoirs ventilés, température, hygrométrie, luminosité, densité animale, enrichissement de milieu avec coton pour la nidification, bâtonnet de bois pour ronger et cabane de cachette).

Réduire : Le nombre d'animaux par groupe (3) a été réduit au maximum tout en permettant l'exploitation des résultats.

Ce projet inclura un nombre total de 60 rats sains sur une période de 5 ans.

17562 Le cancer du poumon et de la prostate sont les cause principales de décès par cancer dans les pays développés. Le décès par cancer est invariablement dû à la progression métastatique. Les cellules tumorales circulantes (CTC) sont des sous-populations très rares retrouvées dans le sang de patients et elles sont considérées comme le vecteur de la métastase. Il est indispensable de comprendre les bases du potentiel métastatique de ces cellules pour pouvoir les cibler avec de nouvelles stratégies thérapeutiques. Dans ce projet, nous utiliserons des lignées cellulaires établies à partir de CTC de cancer du poumon et de la prostate, qui sont très proches aux niveaux génétique et phénotypique des CTC de patients.

Nos cellules CTC exprimant GFP ou mCherry et luciférase (exprimant à la fois marqueur fluorescent et bioluminescent) seront administrées chez les souris immunodéprimées par la voie intraveineuse pour mimer l'environnement naturel de CTC (circulation sanguine). Ensuite les souris sous anesthésie générale seront analysées régulièrement par le système d'imagerie 3D dans le but de détecter d'éventuelles tumeurs/métastases. L'objectif du projet est de mettre en évidence le potentiel métastatique de CTCs (aucune publication à ce jour sur ce sujet), que nous avons bien caractérisées aux niveaux génétique et moléculaire. La procédure permettra de suivre le même animal à différentes temps du développement tumoral sans le sacrifier. En plus les souris seront traités avec différent molécules thérapeutiques et ses effets seront observés par la réduction de l'intensité de fluorescence ou bioluminescence.

La procédure décrite dans ce projet a un caractère de stricte nécessité pour la détection de métastases pendant l'évolution tumorale et ne peut pas être remplacée par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants. Les analyses préliminaires ont été

fait en utilisant la méthode alternative CAM d'embryon de poulet qui réponds que partiellement à la problématique d'évolution métastatique.

Nous avons prévus un seul groupe contrôle commun pour les plusieurs groupes étudiés, et nous planifierons analyse statistique minutieuse pour réduire au minimum le nombre des animaux dans ce projet tout en préservant la validité statistique de l'étude. Au total 364 animaux seront utilisés.

Les animaux seront hébergés dans les conditions établies pour les souris immunodéprimées, les portoirs ventilés seront utilisées. Les animaux seront suivis régulièrement et l'enrichissement du milieu sera ajouté, ce qui favorise leur bien-être. Toutes les procédures seront faites sous anesthésie et une analgésie sera donnée en cas d'apparition de métastases.

L'utilisation de système d'imagerie 3D permettra de suivre l'animal régulièrement et éviter a temps la moindre douleur à cause de développement de la métastase. La procédure avec utilisation de système d'imagerie 3D permettra de suivre le même animal à différentes temps du développement tumoral sans le sacrifier à chaque temps d'estimation du développement métastatique. Nous avons choisis cette méthode de suivi longitudinal aussi pour réduire le nombre des animaux et préserver la significativité interprétable de resultats. Le but final de projet est de mettre en évidence le potentiel métastatique de CTCs, mais aussi obtenir le matériel (l'ADN et l'ARN) à partir de métastases, qui sera utilisé pour l'étude génomique et transcriptomique de haut débit (Whole Exome Sequencing and RNASeq) et comparaison avec le matériel à partir de lignées cellulaires de CTC et CTCs de patients. Les lignée CTC après la charcterisation moleculaire seront utilisée pour tester de molecules therapeutiques.

17563 L'objectif de ce projet est de concevoir, expérimenter et évaluer des systèmes d'élevages herbagers biologiques produisant de la viande à l'herbe, en combinant de manière optimale un niveau élevé de productivité pondérale animale (kg de viande produite par mère et par hectare), un faible niveau d'intrants en concentrés et en médicaments de synthèse et une faible empreinte environnementale (réduction des pollutions et préservation de la biodiversité). En particulier, nous chercherons à valoriser la mixité d'espèces animales (ovins et bovins allaitant) pour augmenter l'efficacité des systèmes herbagers tout en limitant les risques pour l'environnement et la santé animale. Les deux questions de recherche identifiées sont les suivantes : 'Comment produire de la viande à partir de l'herbe?' et 'Quels avantages agroécologiques à la mixité d'espèces?'. Afin de répondre à ces questions, nous mettons en place une expérimentation pluridisciplinaire à l'échelle du système d'élevage. Pour cela, 3 systèmes d'élevage allaitant herbagers seront évalués en fonction de leurs performances techniques, économiques et environnementales, en fonction de la charge de travail et de la santé animale par une approche multicritère : un système d'élevage mixte ovin/bovin (14 vaches et 65 brebis) et deux systèmes d'élevage spécialisés, l'un ovin (156 brebis), l'autre bovin (24 vaches). Les animaux seront soumis à différents types de prélèvements durant la période d'expérimentation : prélèvements vaginaux (écouvillons), castration, prélèvements sanguins, prélèvements de fèces et prélèvements de tissu adipeux (adipocytes). À noter que ces 3 systèmes seront conduits en Agriculture Biologique.

Ce projet s'attache à respecter la règle des 3R :

- Remplacement : il n'existe aucune méthode alternative permettant de traiter ces questions.
- Réduction : 38 vaches allaitantes et leurs veaux qui seront engraisés jusqu'à l'âge de 12-14 mois, 221 brebis et leurs agneaux.

Pour le renouvellement des troupeaux : 2 taureaux, 8 béliers, 4 génisses de 2 ans et 40 agnelles de 1 à 2 ans soit 313 animaux au total.

Ce nombre d'animaux est nécessaire et suffisant pour permettre l'obtention de résultats statistiquement fiables. Des comparaisons statistiques étant prévues entre les 3 systèmes, les effectifs ont été calculés de manière à contenir le même nombre d'UGB (Unités Gros Bovins) chacun.

- Raffinement : La conduite en Agriculture Biologique ainsi que l'enrichissement du milieu de vie des animaux devrait permettre de leur assurer des conditions de vie optimales. Une évaluation du

bien-être animal selon la méthode Welfare Quality® est prévue 2 fois par an pour chacun des systèmes.

17564 Le projet consiste à étudier les habitats sélectionnés par des serpents dans leur milieu naturel. En raison de la nature discrète des reptiles, le suivi télémétrique (radio-tracking) permet d'acquérir des données sur les déplacements et l'activité. Ces données sont nécessaires non seulement pour la conservation des espèces mais également pour améliorer les connaissances sur l'écologie spatiale. Nous allons pouvoir examiner les effets du paysage sur les patrons de déplacement et l'utilisation des haies (rôle corridor). Les informations fournies permettront de formuler des recommandations de gestion de l'habitat pour cette faune sauvage protégée.

Afin de réaliser des suivis individuels, 3 espèces de serpents vont être étudiées: la couleuvre helvétique (*Natrix helvetica*), la couleuvre d'esculape (*Zamenis longissimus*) et la couleuvre verte et jaune (*Hierophis viridiflavus*). Les individus sont capturés manuellement dans leur milieu naturel. Suite à la capture, ils seront conditionnés individuellement dans des sacs numérotés en toile respirante. L'implantation de l'émetteur est effectuée dans la cavité générale sous anesthésie générale et analgésie. L'intervention chirurgicale dure environ 1 heure pour chaque individu (anesthésie, opération et reprise de tonicité). La masse de l'émetteur (3,6 g) représente au maximum 2,5 % de la masse corporelle des individus ce qui correspond aux recommandations pour les reptiles (<5%). Chaque individu sera maintenu en observation 24h00, avant d'être relâché sur le site de capture. La durée du suivi sera d'environ 6 mois. A la fin du suivi les individus seront recapturés et les émetteurs retirés.

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

- le Remplacement des animaux n'est pas possible puisque l'objectif du projet est de mieux connaître et décrire le comportement d'espèces sauvages à préserver, il est donc indispensable de suivre des animaux de ces espèces dans leur milieu naturel.

- La Réduction est réalisée par le choix de capture d'un maximum de 10 individus par espèce et par sexe. Cet effectif permet de décrire la variabilité inter-individuelle et tout en minimisant le nombre d'individus équipés.

- Le Raffinement des procédures est réalisé par une diminution des sources de stress lors de la capture (absence de gestes brusques, maintien dans des sacs respirant), par l'utilisation d'analgésique et d'anesthésique lors de l'implantation des émetteurs et le choix d'émetteurs de petite taille. Enfin chaque individu sera suivi pendant l'intégralité de la procédure, jusqu'à son réveil et son retour dans le milieu naturel. Le projet concerne au maximum 10 individus par espèce et par sexe, soit un total maximal de 60 serpents.

17565 Les formations spécifiques en expérimentation animale constituent une obligation réglementaire à laquelle doivent se soumettre tous les acteurs de la recherche in vivo afin d'acquérir les outils nécessaires à la mise en place d'une démarche éthique prenant en considération la sensibilité animale. Ces formations internes ont aussi pour objectif de sensibiliser chaque personne impliquée dans un projet expérimental afin de minimiser les contraintes imposées durant les procédures expérimentales et diminuer le stress de l'animal. Cette démarche implique un enseignement pratique des techniques de manipulation, tranquillisation et contention de l'animal. S'ajoute l'apprentissage de geste peu invasifs et courant tels que les prélèvements sanguin et les injections. Le projet soumis concerne une formation dispensée aux personnes réalisant les procédures expérimentales sur animaux qui s'inscrit dans le cadre réglementaire et éthique et a été soumise à l'approbation du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Les animaux utilisés sont des souris adultes provenant de notre zone d'élevage et vouées à l'euthanasie car ne répondant pas aux critères de sélection des équipes (mauvais génotype, sexe etc.). Le sexe des animaux ainsi que leur souche n'ont pas d'incidence dans le projet. On utilisera 4 souris, soit une cage, pour chaque personne souhaitant bénéficier de cette formation. Celles ci se feront par groupe de 1 à 3 personnes suivant les besoins de chacun. On projette 2 sessions par mois pour 3 personnes, soit l'utilisation maximale de 288 souris par an, et 1440 sur 5 ans.

Moyens mis en oeuvre pour satisfaire aux exigences de remplacement réduction raffinement

Remplacement : les manipulations sur les animaux sont précédées d'une session de sensibilisation avec support photo et présentation technique du geste à accomplir.

Réduction : Les animaux utilisés pour ces formations sont des animaux sur numéraires de production interne. Cette ré utilisation évite l'euthanasie de ces animaux sans utilisation

Raffinement : Chaque technique présentée fera l'objet d'une présentation théorique par un opérateur expérimenté

Pour limiter tout stress de l'animal, celui qui aura été utilisé pour les démonstrations ne sera plus manipulé jusqu'à la fin des travaux pratiques. Ensuite, le même animal sera utilisé pour l'ensemble des techniques abordées, en commençant par les gestes les moins invasifs.

Les personnes encadrant les travaux pratiques seront particulièrement attentives à tout signe de douleur ou de détresse. Si un animal présente des signes de souffrance, la procédure en cours sera immédiatement interrompue et une personne compétente prendra la décision adéquate pour l'animal (euthanasie si nécessaire).

17566 Les infections par le protozoaire *Cryptosporidium parvum* ont une très forte prévalence à travers le monde, conduisent à des pertes économiques importantes chez les ruminants et affectent aussi la santé humaine. Ce parasite se développe dans les cellules intestinales des animaux et provoque des diarrhées pouvant conduire dans certains cas à la mort. Devant l'absence de vaccin (en santé humaine ou vétérinaire) et de traitement totalement efficace, il est nécessaire de rechercher de nouveaux moyens de contrôle. La transgénèse, technique permettant la modification du génome, est un prérequis pour le développement de souches parasitaires *C. parvum* avirulentes et pour la validation de nouvelles cibles thérapeutiques. Elle a été établie avec succès chez *C. parvum* en 2015 et récemment validée au sein de notre laboratoire. Cette méthode requiert une étape de sélection *in vivo* (en modèle murin) immédiatement après la transfection pour permettre aux parasites recombinants d'effectuer la fin de leur cycle de développement. De plus, seul le stade parasitaire 'sporozoïte' peut être efficacement transfecté. Or, les sporozoïtes libres sont fragiles et ne peuvent pas être inoculés par voie orale, ce qui impose de réinjecter ces parasites transfectés directement dans l'intestin de souris immunodéficientes à l'aide d'une technique simple de chirurgie abdominale.

Ce projet a pour objectifs de (i) construire des souches parasitaires de *C. parvum* recombinantes en utilisant la méthode de transfection-chirurgie abdominale décrite ci-dessus, et (ii) de maintenir par la suite ces souches parasitaires générées par multiplications *in vivo* successives. En effet, les souches parasitaires ne peuvent être congelées, et leur conservation à 4 °C ne permet pas leur utilisation au-delà de 3 mois. Les souches recombinantes générées pourront être utilisées pour de multiples applications telles que l'identification de facteurs de virulence, l'impact de la réponse immunitaire adaptative de l'hôte, ou le suivi du parasite dans les tissus infectés.

Ces expérimentations seront réalisées selon des protocoles déjà établis dans notre laboratoire, et dans le respect de la règle des 3R :

Remplacer : Il n'existe à ce jour aucune alternative *in vitro* permettant de reproduire entièrement et efficacement le cycle complet du parasite et ainsi d'obtenir un rendement en parasites suffisant pour nos travaux. En outre, la chirurgie pour inoculer les sporozoïtes reste indispensable pour conserver ces formes fragiles qui ne survivraient pas au passage dans l'estomac après une inoculation par voie orale. Jusqu'à présent, toutes les alternatives testées, moins invasives que la chirurgie abdominale, sont restées infructueuses (inoculation par voie orale ou rectale, inoculation sur la membrane d'œufs embryonnés, etc.).

Réduire : Nous avons déjà établi qu'un lot de 4 souris femelles était à la fois suffisant et nécessaire à la génération de chaque nouvelle souche transgénique. Un maximum de 3 transfusions par an sera réalisé dans le cadre du projet.

Transfection-chirurgie : 3 souches X 4 souris X 5 ans = 60 souris.

A cela s'ajoutent les animaux qui seront utilisés pour la multiplication des souches transgéniques. Nous avons précédemment établi que 12 souris infectées (mâles et femelles) sont nécessaires pour obtenir la quantité de parasites requise pour nos travaux.

Multiplication : 5 souches X 12 souris X 4 passages X 5 ans = 1200 souris.

Au total, le nombre maximum d'animaux utilisés pour ce projet sera de 1260 souris.

Ces nombres d'animaux ont été préalablement définis d'après notre expérience passée afin d'optimiser le nombre de parasites requis pour nos études au laboratoire tout en utilisant le moins d'animaux possible.

Raffiner : Les chirurgies seront réalisées sous anesthésie générale associée à un traitement analgésique approprié à la technique et à l'espèce. Nous resterons ensuite vigilants en ce qui concerne l'état de santé des animaux lors des visites quotidiennes réalisées dans la salle expérimentale afin de surveiller l'éventuelle apparition de symptômes liés à la maladie ou à une complication post-chirurgicale. Comme le prévoit la réglementation, les animaux sont hébergés en groupe (par quatre et avec présence de papier absorbant dans la cage), et ils sont visités une fois par jour (le matin avec les soins). Toutefois, afin d'améliorer l'environnement et la surveillance de l'état de santé des animaux, un enrichissement supplémentaire est ajouté dans chaque cage (maison/igloo/tunnel en polycarbonate) et une deuxième visite quotidienne est réalisée en fin de journée.

Pour ce projet d'une durée de 5 ans, nous estimons que 60 souris immunodéficientes (IFN γ -/-) seront utilisées pour la génération de nouvelles souches par transfection-chirurgie (soit 12 souris par an), ainsi que 1200 souris pour la multiplication des souches générées (soit 240 souris par an), soit 1260 souris au total sur la durée du projet.

17567 Les cancers représentent un problème de santé majeur en France et dans le monde. L'arrivée sur le marché de l'immunothérapie anti checkpoints immunitaire (ICI) a révolutionné la prise en charge de nombreux cancers. Ces anticorps monoclonaux ciblent des récepteurs inhibiteurs présents à la surface des lymphocytes ou leur ligands et permettent ainsi de lever certains mécanismes inhibiteurs du système immunitaire afin de lui permettre de s'activer plus efficacement pour qu'il s'attaque aux cellules tumorales. De nos jours, il existe plus de 200 traitements en essais cliniques de phase III chez l'homme afin de lutter contre cette maladie, soulignant ainsi le potentiel extrêmement prometteur de l'exploration du système immunitaire. Malheureusement, ces anticorps ne sont efficaces que dans un nombre limité de patients. Récemment, plusieurs études ont identifié le microbiome comme une composante importante de la réponse à certaines chimiothérapies et aux ICI.

L'objectif principal de ce projet sera d'identifier les bactéries localement présentes dans deux modèles de cancer à forte prévalence chez l'homme, de déterminer leur origine et d'explorer leur fonction dans la réponse aux ICI.

Ainsi, afin de réaliser l'ensemble de nos expériences, 1492 souris sont demandées sur une période de 5 ans.

Dans le respect des règles des 3R:

-Des expériences réalisées en prospectif chez l'homme ont été mises en place afin de remplacer au possible l'utilisation d'animaux pour répondre à certaines questions spécifiques à ce projet. Cependant, seul un modèle murin qui modélise la physiopathologie du cancer et qui réunit tous les acteurs de l'immunité innée et adaptative permettra d'explorer notre hypothèse selon laquelle le microbiome local des tumeurs joue un rôle majeur dans la réponse aux ICI.

-Les expériences seront combinées dans la mesure du possible tout en gardant un nombre nécessaire et suffisant d'animaux pour obtenir une puissance statistique raisonnable dans l'analyse des résultats.

-Les animaux seront suivis quotidiennement par le personnel zootechnique expérimenté et des mesures visant à stopper toute souffrance ou inconfort seront prises, allant de la prise d'analgésique au sacrifice de l'animal. Les points limites seront fixés notamment basés sur la perte du poids des

animaux et des modifications de leur état global (prostration, isolement, pelage hirsute, etc.) afin de stopper l'expérimentation avant une induction de douleur ou souffrance des animaux. Enfin, les souris seront hébergées dans un milieu enrichi leur permettant de retrouver leur comportement primaire de nidification.

17568 Avec une incidence de 120000 nouveaux cas par en France, l'infarctus du myocarde est la situation clinique la plus fréquente illustrant l'ischémie-reperfusion myocardique. Si la diminution des apports en nutriments et oxygène entraîne une cascade de mécanismes moléculaires aboutissant à la mort cellulaire, la phase de reperfusion est tout aussi délétère. La cardioprotection dans le cadre de l'ischémie reperfusion myocardique correspond à l'ensemble des techniques destinées à protéger les cardiomyocytes de la mort cellulaire pour diminuer les tailles d'infarctus et améliorer le pronostic des patients.

La régulation de la vie et de la mort du cardiomyocyte en ischémie-reperfusion est un phénomène complexe fait intervenir de nombreux types cellulaires (fibroblastes, cellules endothéliales, cellules de l'immunité), toutes ayant des récepteurs membranaires communs aux bases purines (ATP, ADP, UTP, UDP).

Nos travaux *in vitro* suggèrent qu'une modulation de ces récepteurs dans le contexte de l'ischémie-reperfusion myocardique pourrait permettre :

- de diminuer la mort cellulaire des cardiomyocytes, diminuant ainsi la taille d'infarctus
- de diminuer la prolifération des cardiofibroblastes, limitant ainsi le degré de fibrose secondaire à un phénomène d'ischémie myocardique
- de faire adopter aux cellules dendritiques un phénotype plus anti-inflammatoire dans le but de réduire l'impact de la réponse inflammatoire locale.

Nos travaux suggèrent que parmi les différents récepteurs purinergiques existant, le récepteur P2Y11 serait le candidat alliant tous ces effets.

Le travail consistera en 3 étapes successives :

- 1- mettre au point le modèle animal murin d'infarctus du myocarde reperfusé
- 2- évaluer l'impact de la modulation des récepteurs purinergiques d'intérêt (dont P2Y11) sur la taille d'infarctus, la fonction cardiaque post-infarctus, les voies de signalisation de survie cellulaire, la fibrose myocardique post-infarctus, la réponse inflammatoire locale et systémique avec notamment étude phénotypique des différentes cellules intervenant dans l'immunité stérile post-infarctus et leur production cytokinique. Nous procéderons ainsi à des analyses fonctionnelles cardiaques en échocardiographie, analyse des lésions tissulaires par mesures des marqueurs de nécrose myocardique circulants et sur cœur explanté (nécrose, apoptose, infiltration et différenciation leucocytaire, analyse de la maturation phénotypique des cellules dendritiques résidentes et circulantes, étude de la fonction mitochondriale, i. e. respiration, capacité de rétention calcique, production de ROS, sur mitochondries isolées en zone ischémique et non ischémique) sur une population de 300 souris C57BL/6Rj.
- 3- participer au développement pré-clinique de molécules visant à moduler cette signalisation purinergique.

La "Règle des 3R" a été respectée:

-Remplacement: des travaux *in vitro* ont précédé cette étude et nous ont permis de préciser notre champ d'investigation. Ces procédures expérimentales ont un caractère de stricte nécessité et ne peuvent être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information.

-Réduction: Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet (n=300 souris mâles) est réduit à son minimum sans compromettre les objectifs. A cet effet, pour accélérer la courbe d'apprentissage liée à la mise en place du modèle, l'opérateur principal bénéficie d'une formation auprès d'équipes maîtrisant déjà ce modèle.

-Raffinement: Les conditions d'élevage, d'hébergement (groupes de 5), de soins (visite quotidienne avec contact tactile et verbal, environnement sonore musical) et les méthodes utilisées sont les plus

appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les souris. L'intervention chirurgicale se déroule sous anesthésie générale avec les analgésiques appropriés à la procédure (anesthésique local, anti-inflammatoire non stéroïdien). Un matelas chauffant permet de prévenir l'hypothermie per opératoire. Un scoring de douleur sera réalisé les 3 heures suivant l'intervention puis toutes les 8 heures.

17569 Aigue, la douleur est physiologique, nécessaire à notre survie. Chronique ou persistante, par suite d'une inflammation (douleur inflammatoire) ou d'une lésion nerveuse (douleur neuropathique), la douleur n'offre plus aucun avantage mais provoque au contraire détresse et souffrance. Les traitements ne sont souvent que partiellement efficaces et peuvent s'accompagner d'effets secondaires importants. Il faut donc découvrir de nouveaux antalgiques.

Etonnamment, si notre connaissance des mécanismes de la douleur s'est considérablement accrue, cette avancée ne s'est accompagnée d'aucun progrès thérapeutique majeur. Une des raisons à cet échec est qu'il n'existe pas un mais des symptômes douloureux. En effet, inflammatoire ou neuropathique, les douleurs chroniques se manifestent par plusieurs symptômes douloureux : douleurs spontanées et/ou provoquées, par une stimulation normalement douloureuse (exacerbation de la douleur ou hyperalgésie) ou non (allodynie). Or, chacun de ces symptômes dépend de mécanismes distincts, nécessitant donc un traitement spécifique.

L'allodynie mécanique est un symptôme très fréquent, observé chez 20-50% des patients neuropathiques et 60-80% des migraineux chroniques. On sait maintenant que son apparition est liée à l'activation d'un circuit neuronal local—dans la corne dorsale (CD) de la moelle épinière ou le sous-noyau caudal du Trijumeau (Sp5C)— transmettant l'information tactile aux voies de la douleur. Or, bien qu'anatomiquement toujours présent, ce circuit ne devient fonctionnel qu'en conditions pathologiques. Ce processus nécessite l'activation d'enzymes dans la CD/Sp5C dont la p38 mitogen-activating kinase (p38). La p38 semble donc une cible pertinente pour le développement de nouveaux médicaments anti-allodyniens. L'inhibition de cette kinase diminue bien le comportement douloureux spontané et l'allodynie mécanique chez l'animal en conditions inflammatoires et neuropathiques.

Nous avons synthétisé de nouveaux inhibiteurs de la kinase p38. L'un d'eux produit une inhibition immédiate, constante (sur la durée du test) et quasi complète (99%) de l'allodynie mécanique dans un modèle inflammatoire chez le rat. Comparé aux inhibiteurs connus de la p38 (sképinone, SB203580), ce composé exerce une activité antalgique plus puissante et beaucoup plus longue, en conditions neuropathiques comme inflammatoires, chez le mâle comme chez la femelle. Notre but est maintenant d'explorer les mécanismes de cet effet par des études comportementales, électrophysiologiques (in-vivo, ex-vivo), immunohistochimiques, de biologie moléculaire et de toxicologie préliminaire sur différents modèles murins d'allodynie mécanique, avant passage au stade clinique.

Pour appliquer la règle des 3Rs, le nombre d'animaux est réduit au maximum. Cependant, il doit tenir compte des animaux qui ne répondraient pas aux tests et être suffisant pour discriminer un effet statistiquement significatif entre traitements (analyse de variance et tests post-hoc paramétriques ou non paramétriques). Par contre il n'est pas possible de remplacer ce modèle in vivo. En effet, la douleur est une expérience globale qui implique l'ensemble du système nerveux, périphérique et central. Et, à l'heure actuelle, aucun modèle in vitro ou "in silico" n'est validé pour mesurer cette expérience. Au total, 680 rats seront utilisés, avec mise à mort à la fin des procédures par overdose anesthésique et prélèvement d'organes (études immunohistochimiques et en biologie moléculaire).

Toutes les injections (sous-cutanées, intracisternales) seront pratiquées sous anesthésie. Malheureusement, on ne peut pas réduire la douleur due à l'injection sous-cutanée de substance inflammatoire puisqu'on désire justement mesurer le comportement douloureux. Cependant, tout sera fait pour diminuer l'anxiété des animaux due au nouvel environnement (hébergement en environnement enrichi dans l'animalerie pendant une semaine avant toutes interventions) et à l'expérimentateur (habituation pendant 4 jours avant intervention).

17570 L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre du développement d'un composé d'intérêt thérapeutique, destinés à l'amélioration des troubles métaboliques, notamment l'obésité.

L'objectif de la présente étude sera d'évaluer l'impact de ce composé sur la prise alimentaire, le poids corporel et la régulation glycémique chez des souris rendues obèses par un régime hyperlipidique (45% de l'énergie issue des graisses) pendant 12 semaines. Le traitement sera administré par voie orale pendant les 12 semaines de régime, pendant lesquelles les animaux seront soumis au même régime enrichi en graisse.

Au cours du traitement, les paramètres suivants seront mesurés: poids corporel et prise alimentaire, composition corporelle, glycémie à jeun et tolérance au glucose (OGTT). Le traitement sera administré à deux doses différentes. Un groupe d'animaux additionnel sera employé et traité avec un composé de référence.

La présente étude nécessitera l'emploi de 60 souris C57Bl/6 réparties en 5 groupes expérimentaux de 12 animaux.

La règle des 3Rs a été prise en compte dans l'élaboration du présent protocole:

- Raffinement: Le modèle animal qui sera utilisé est un modèle parfaitement caractérisé dans la littérature et couramment utilisé dans les études précliniques cherchant à mettre en évidence les effets bénéfiques de composés sur la prise alimentaire, le poids corporel et les troubles métaboliques. Le protocole a été planifié de façon à limiter au maximum tout stress et tout inconfort pour les animaux. Les animaux seront hébergés en cages individuelles du fait de la nécessité de mesurer précisément l'impact du composé sur la prise alimentaire individuelle des animaux. Néanmoins, les animaux conserveront des contacts visuels avec leurs congénères et un enrichissement des cages sera assuré par l'ajout d'igloos et de matériels de nidification. Enfin, un suivi journalier des animaux à l'aide d'une grille de score permettra une action rapide en cas d'atteinte des points limites établis.

- Réduction: Le nombre d'animaux utilisés a été rationalisé à partir de l'expérience acquise par notre laboratoire sur l'analyse des paramètres d'intérêt. Ainsi, le nombre d'animaux par groupe a été adapté en fonction des paramètres d'intérêt de façon à être en mesure de mettre en évidence une différence statistiquement significative sur les paramètres étudiés.

- Remplacement: L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe aucune méthode de substitution n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude de l'impact d'un composé sur le poids corporel, la prise alimentaire et les autres paramètres altérés dans le cadre des troubles métaboliques.

17571 Le cancer est une pathologie provenant du dérèglement des cellules dans un tissu de l'organisme conduisant à une division excessive et anarchique de celles-ci. Cela aboutit à la formation de tumeurs nocives. Afin de protéger l'organisme, les cellules saines disposent de mécanismes leur permettant de « se suicider » et prévenir la formation de ces tumeurs. Il y a quelques années, a été mis en évidence l'un de ces mécanismes, impliquant un nouveau type des récepteurs, des protéines à la surface des cellules, capables de transmettre un message au sein de la cellule après réception d'un signal externe. Ces nouveaux récepteurs transmettent un message de survie de la cellule quand ils reçoivent un signal, tandis que, lorsque ce signal est absent, ils poussent la cellule au suicide. La survie de la cellule dépend donc des signaux reçus par ceux-ci. Dans un contexte de dérèglement de la prolifération cellulaire, les cellules modulent les niveaux de signaux produits pour induire le suicide des cellules plutôt que leur survie, empêchant ainsi le développement de tumeurs. Cependant, les cancers apparaissent quand même car les cellules tumorales parviennent à contourner ce mécanisme de suicide cellulaire, notamment en augmentant la production du signal de survie. Une nouvelle thérapie ciblant ces récepteurs a été donc développée, permettant d'empêcher que ce signal de survie parvienne aux récepteurs, et rétablissant ainsi l'aptitude des cellules tumorales à engager leur suicide. Cette thérapie implique le développement d'un anticorps neutralisant dirigé contre un ligand de ces récepteurs.

Il a été montré sur des cellules en culture que le signal de survie de ces récepteurs est régulé par la protéine p53, surnommée « le gardien du génome », et normalement impliqué dans l'activation

du signal de suicide, nécessaire pour éliminer les cellules dérèglées, pour prévenir la formation des tumeurs. C'est pour cette raison que la protéine p53 est une des facteurs plus inactivés dans les cellules tumorales. Néanmoins, des études récentes ont montré que à la protéine p53 entière sont associés des protéines similaires, générés à partir du même gène, impliqué non seulement dans le suicide cellulaire, mais aussi dans le soutien de la progression tumorale. La régulation du signal de survie par une de ces protéines similaires à p53 pourra d'un côté expliquer le rôle pro-tumorale de cette protéine, mais aussi élargir la quantité des patients éligibles à la thérapie expérimentale utilisant l'anticorps neutralisant ciblant le signal de survie. Il est maintenant important de confirmer les effets antitumoraux de l'anticorps dans les tumeurs exprimant la protéine similaire à p53, en utilisant des modèles animaux afin de tenir compte du microenvironnement tumoral.

Dans ce projet, qui durera 5 ans, au maximum 90 souris et 480 œufs fécondés seront utilisés, réparties dans 2 procédures. La première procédure permettra d'évaluer l'effet de l'anticorps sur le développement de métastases. Les cellules seront injectées par voie intraveineuse et la dissémination métastatique dans les poumons de souris sera suivi par imagerie. Pour cette procédure, les précautions seront prises pour stresser au minimum l'animal. L'administration d'anesthésique, un suivi adapté des animaux et la définition précise des points limites précoces et prédictifs d'un mal être, permettent de limiter au maximum la souffrance animale. Le suivi longitudinal par imagerie de la progression des métastases permettra une réduction du nombre de souris. La deuxième procédure permettra de suivre l'effet antitumorale de l'anticorps sur des tumeurs greffées sur des embryons (entre jours 2 et 17 du développement) de poulet (poules domestiques). Le traitement avec l'anticorps et l'antibiotique, nécessaire pour induire la production de la protéine similaire à p53 dans notre système cellulaire, sera fait en injectant le tampon dans l'œuf, de façon de perturber le moins possible le développement de l'embryon. La durée de l'expérience sera de 15 jours et les embryons ne seront pas perturbés par les tumeurs greffées ou par la manipulation nécessaire au traitement. Pour cela, une fenêtre dans la coque des œufs sera créée, permettant l'ouverture de l'œufs pour la greffe et le traitement sans perturber le développement de l'embryon.

A l'issue de ce projet, si le traitement par l'anticorps induit une régression tumorale ainsi qu'une diminution des métastases, ceci devrait donc conduire à la confirmation que les patients présentant des niveaux élevés de la protéine similaire à p53 pourront être éligibles à la thérapie antitumorale ciblant le facteur de survie, actuellement en phase clinique II.

L'étude utilisera deux modèles animaux (la souris et le poulet), les deux s'approchant à la formation des tumeurs observé chez l'homme et permettant d'évaluer l'effet des composants antitumoraux. La souris est sûrement le modèle préférentiel, mais l'utilisation du modèle des embryons de poulet permettra de confirmer la sensibilité de la tumeur aux médicaments, en utilisant un modèle peu coûteux, facilement accessible et plus rapide que le modèle de la souris.

La quantité d'animaux utilisée dans cette étude sera maintenue plus faible possible, en limitant la répétition à une fois si nécessaire. Aussi la quantité d'animaux par chaque groupe sera limité, en gardant quand même une quantité suffisant pour obtenir des résultats significatifs. De plus plusieurs donnés seront exploités lors de l'expérimentation.

17572 L'exposition aux rayonnements ionisants suite à un accident d'irradiation peut engendrer des conséquences graves sur la santé des personnes exposées et impacter potentiellement un grand nombre de personnes (dans le cas d'un accident nucléaire ou d'un acte de malveillance). L'irradiation d'un large volume (beaucoup plus important que le volume irradié lors d'une radiothérapie) à des doses d'irradiation moyennes à fortes induit des lésions tissulaires multiples regroupées sous le nom de « syndrome aigu d'irradiation ». La rapidité d'apparition des premiers symptômes dépend de la vitesse de renouvellement des cellules constituant les tissus lésés mais aussi de la radiosensibilité des cellules souches. Chez l'homme, les doses supérieures à environ 6 Gy sur un large volume induisent principalement une destruction de la moelle osseuse et des lésions gastro-intestinales, entraînant diarrhée, déshydratation, septicémie, hémorragie intestinale avec une mortalité dans les 10 à 15 jours suivant l'exposition. Ces symptômes gastro-intestinaux sont collectivement connus sous le nom de « syndrome gastro-intestinal radio-induit » (SGI). Bien que

la recherche de contre-mesures médicales pour traiter le SGI ait été initiée il y a plus de 50 ans, l'efficacité et l'innocuité des traitements pharmacologiques envisageables restent insatisfaisantes. Sur la base d'études expérimentales, il est admis que la fenêtre temporelle d'intervention après exposition aux radiations est très courte, entre 24 à 48 heures seulement, et donc primordiale afin d'espérer une efficacité thérapeutique optimale et pérenne des traitements. Il existe donc un besoin crucial de mesures thérapeutiques efficaces et rapides pour la gestion du SGI avec l'éventualité d'un traitement d'un nombre très important de victimes militaires ou civiles. Aujourd'hui les médicaments en cours de développement sont exclusivement des agents pharmacologiques à potentiel radioprotectant ou radio-mitigateur. Nous avons démontré que l'injection d'un produit de thérapie cellulaire dérivé de la graisse la « stromal vascular fraction (SVF) » avait un bénéfice thérapeutique objectivé sur plusieurs paramètres (reprise de poids, restauration de la perméabilité intestinale) et une amélioration de la survie des souris traitées (70% de souris survivantes à 30 jours post-irradiation comparé à seulement 25% de souris survivantes après l'irradiation sans traitement). L'objectif de ce projet est d'établir la fenêtre d'injection après irradiation et la conservation des mêmes propriétés thérapeutiques de la graisse provenant d'un territoire irradié. Ces deux paramètres étant incontournables à considérer, l'optimisation du traitement par la SVF se fera par une approche qui consistera à combiner des molécules permettant de prolonger la fenêtre thérapeutique de la SVF et/ou d'en améliorer son action.

Pour l'ensemble du projet, le nombre estimé d'animaux est de 800 souris C57BL/6J. Dans le but d'évaluer les bénéfices thérapeutiques de produit cellulaires et particulièrement pour le passage en clinique, l'utilisation de l'animal s'avère indispensable. L'animal permet d'évaluer à l'échelle d'un organisme entier les effets bénéfiques du traitement par thérapie cellulaire suite à une exposition aux rayonnements ionisants en termes d'effets cliniques, physiologiques et histologiques. Le nombre de souris choisi pour ce protocole est nécessaire et suffisant pour exploiter d'un point de vue statistique les résultats obtenus. Les bénéfices de ce projet pré-clinique permettront une évaluation des modalités d'injection de la SVF en termes de temps, le nombre d'injection et l'association à des agents pharmacologiques pour un passage en clinique.

Etant donné que le syndrome gastro-intestinale implique plusieurs phénomènes tissulaires (dénudation de la barrière épithéliale, altération immunitaire et vasculaire) indissociables les uns des autres, il existe un vrai besoin de comprendre de manière intégrée et fiable l'efficacité thérapeutique de la SVF. Pour cela les modèles expérimentaux précliniques in vivo sont nécessaires et non remplaçables afin de démontrer des phénomènes à l'échelle de l'organisme entier. Le besoin d'études fonctionnelles, histologiques et moléculaires nécessite des groupes de 12 individus pour atteindre la pertinence statistique des différentes études. Dans le contexte du bien-être animal, le raffinement est assuré par des cages d'hébergement enrichies en objets favorisant le bien-être et par le suivi des préconisations des traitements administrés aux patients selon le consensus des «Vaux de Cernay» associant des antibiotiques à tous traitements pour le syndrome aigu d'irradiation. Une couverture antibiotique sera mise en place juste après l'irradiation et pendant toute la phase de suivi des animaux. Les animaux seront anesthésiés, prélevés et euthanasiés selon la réglementation en vigueur et les bonnes pratiques (anesthésie pour les irradiations et les prélèvements sanguins). Des points limites basés sur l'évolution pondérale, la mobilité et l'aspect des animaux et aussi sur l'expérience acquise sur ce modèle, seront définis et appliqués tout au long des procédures expérimentales constituant ce projet.

17573 Récemment, plusieurs cas de mutations dans un gène codant pour une casein kinase ont été liés de manière causale au trouble neurodéveloppemental de Okur-Chung (OCNDS).

Cette maladie est caractérisée par un retard de développement, une déficience intellectuelle et d'autres anomalies comportementales qui font la font entrer dans les troubles du spectre autistique. Malheureusement cette pathologie reste mal connue.

Notre objectif est de valider un modèle expérimental chez la souris de la maladie d'OCNDS qui possède la même mutation que 30% des patients.

Nous rechercherons chez des souris d'éventuelles anomalies comportementales s'apparentant aux symptômes de la pathologie humaine. Des études biochimiques seront ensuite réalisées sur les tissus cérébraux de souris issus de ces souris pour tenter d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans la maladie OCNDS. Ces études devraient permettre d'améliorer les connaissances sur cette pathologie dans le but de développer des thérapies pour aider les patients atteints d'OCNDS et du spectre de l'autisme.

Nous prévoyons d'utiliser un maximum de 1340 souris sur une durée de 3 ans. Ce projet mettra en jeu des procédures d'administration de substances pharmacologiques avant évaluation des conséquences biochimique et comportementales (fonctions motrices, cognitives, émotionnelles et sociales), suivi par perfusion transcardiaque pour analyse du tissu.

Cette étude qui nécessite une approche comportementale n'est possible qu'à l'échelle de l'organisme entier et ne peut être reproduite in vitro ni ex vivo.

Ce projet s'effectuera dans le respect de la règle des 3R, en veillant au bien-être des animaux et en limitant leur douleur.

Remplacement: Nous travaillons en parallèle en culture cellulaire où nous exprimons des protéines mutantes et in vitro en utilisant des protéines purifiées.

Pour réduire le nombre d'animaux, nous avons estimé la taille des échantillons permettant une analyse statistique efficace des résultats grâce aux données collectées au cours d'expériences précédentes. Les animaux seront observés quotidiennement et évalués à l'aide de points limites bien définis. Afin de réduire le nombre d'animaux, nous effectuons plusieurs expériences comportementales avec une cohorte d'animaux.

Raffinement: Nous utilisons des analgésiques et des anesthésiques où cela est indiqué. Nous observons les régularités des animaux et leur donnons des soins post-chirurgicaux.

En conclusion, notre travail vise à identifier les déficits neurobiologiques et comportementaux qui sont présents dans un modèle murin du syndrome d'OCNDS, permettant de futures études thérapeutiques de ce syndrome. Ce projet apportera des données anatomiques, biochimiques et fonctionnelles cruciales pour appréhender les mécanismes mis en jeu dans l'OCNDS et le spectre de l'autisme et pourrait ouvrir de nouvelles pistes thérapeutiques pour le traitement de ces pathologies.

17574 En Europe comme aux Etats-Unis, le cancer est actuellement la seconde cause de mortalité derrière les maladies cardiovasculaires. En France, cette pathologie provoque environ 33 % des décès chez les hommes et 23 % chez les femmes. Il est donc primordial de s'intéresser à cette maladie et de trouver de nouvelles thérapies.

Un enjeu majeur pour la recherche consiste donc à trouver de nouvelles thérapies ciblant spécifiquement les cellules cancéreuses tout en limitant les effets secondaires sur l'organisme.

Pour tester l'activité de nouveaux composés, des tests in-vitro sont systématiquement mis en place sur des cellules en culture.

Grâce à ces tests in vitro, seules les molécules présentant une activité sont pré-sélectionnées avant d'être testées, dans des modèles dits in vivo de souris ou de rats porteurs de tumeurs permettant de démontrer leur activité et leur efficacité antitumorale. Les modèles de rats, fréquemment utilisés en oncologie, sont déployés en deuxième intention, après avoir démontré une activité et une efficacité antitumorale de ces produits chez la souris. Au vu de leur physiologie et de leur métabolisme plus proche de l'homme, ces modèles sont utilisés pour confirmer et/ou compléter des résultats déjà obtenus chez la souris.

Ces modèles in vivo sont indispensables car c'est dans un organisme vivant complet que l'on peut évaluer les effets pharmacologiques d'une molécule anti-cancéreuse.

Pour permettre la greffe de cellules tumorales ou l'injection de cellules immunitaires d'origine humaine chez le rat, il est indispensable que ce dernier soit dépourvu de son propre système immunitaire pour éviter toute réaction de rejet du greffon. L'une des possibilités est d'avoir recours à l'irradiation. Cette technique, couramment utilisée depuis de nombreuses années dans les

laboratoires de recherche, permet de détruire le système immunitaire totalement ou partiellement, de manière temporaire ou permanente selon les conditions techniques choisies.

L'objectif de ce projet, situé en amont de nos projets de recherche de thérapies candidates, est de mettre au point les conditions expérimentales de l'irradiation pour obtenir une réduction suffisante et temporaire du système immunitaire des rats, tout en préservant leur bon état général. A terme, l'irradiation doit permettre :

- d'homogénéiser et d'optimiser les taux de réussite de prise de greffe de cellules tumorales humaines ou murines fonction des objectifs de recherche pour nos études de pharmacologie et ainsi contribuer à la réduction globale de la quantité d'animaux dans l'activité de recherche de thérapies candidates.

- d'optimiser les humanisations, méthodes qui consistent à « remplacer » le système immunitaire du rat par greffe de cellules immunitaires humaines afin d'évaluer ensuite l'activité anti-tumorale de composés et leurs interactions avec cet environnement immunitaire humain. La réduction du système immunitaire du rat par une irradiation va ainsi permettre la prise de greffe et la reconstitution d'un système hématolymphoïde humain en partie fonctionnel.

Avant tout démarrage des études de ce projet, une phase de recherche bibliographique permettra de sélectionner les doses d'irradiation à valider, spécifiques et différentes pour chaque souche de rat évalué. Afin de limiter au maximum les risques et réduire le nombre d'animaux utilisés, nous appliquerons un design expérimental défini avec le service biostatistique, c'est-à-dire une approche par étapes dans laquelle les doses d'irradiation seront testées par paliers progressifs et sur de très petits nombres d'animaux pour chaque palier. Les paramètres sanguins des animaux seront suivis au cours du temps.

Le système immunitaire des rats se trouvant complètement déficitaire en conséquence de l'irradiation, les rats seront logés et manipulés dans un secteur à confinement spécifique afin de les protéger de tout risque de contamination.

L'état général des rats irradiés fera l'objet d'une surveillance accrue, en particulier grâce à une grille de scoring biquotidien permettant de suivre l'état des animaux tout au long de l'étude et d'identifier tout signe de souffrance ou de dégradation le plus précocement possible. Les points limites prédéfinis seront mis en application si nécessaire.

Tout au long de l'étude, les rats seront logés en groupes sociaux et un enrichissement de milieu, sous forme de bandelettes de papier kraft et /ou de cubes en bois, sera apporté de manière à favoriser leur comportement de rongeurs. D'autre part, des précautions particulières aux soins de ces animaux fragilisés seront mises en place telles que compléments alimentaires, accès facilité à l'eau, etc...

Compte tenu de l'approche expérimentale prévue, du nombre de doses et de souches de rats à étudier, nous estimons à 200 le nombre de rats nécessaire à la conduite de ce projet : soit l'étude de 5 souches sur 5 ans, à raison de 40 rats par souche.

17575 Le système nerveux central (SNC), et en particulier le cerveau, est sujet au développement de pathologies graves comme les tumeurs malignes, les maladies neurodégénératives ou les accidents vasculaires cérébraux. Le système nerveux central étant le pilote des fonctions vitales (motricité, cognition, fonctions végétatives...), les conséquences physiopathologiques de ces atteintes ou les séquelles suite à un traitement peuvent entraîner des lésions et déficiences aux conséquences mortelles ou très invalidantes. L'efficacité de la prise en charge de ces pathologies repose sur un diagnostic précoce et sur des traitements efficaces et protecteurs pour le tissu nerveux. L'anatomie, la complexité et la sensibilité du SNC rendent difficile le développement de traitements efficaces. Les dispositifs médicaux et les techniques chirurgicales innovantes constituent des pistes très prometteuses pour améliorer le diagnostic et le traitement des pathologies du cerveau.

Le projet de recherche vise à développer des dispositifs médicaux et techniques chirurgicales innovantes, permettant de mieux traiter ou diagnostiquer les pathologies du système nerveux central et en particulier du cerveau. L'implantation du dispositif chez l'animal permet de respecter

les contraintes anatomiques trouvées chez l'homme et ainsi de valider dans ces conditions la tenue et le fonctionnement du dispositif. Le projet prévoit le recours à des modèles porcins (n=200) justifiés par une taille et une fonction cérébrales proche de ceux de l'homme et à modèles ovins (n=100) et canins (n=50) dont la boîte crânienne se rapproche dans certains sites de l'anatomie de la boîte crânienne de l'homme, avec au maximum 350 animaux pour la durée totale du projet. 1) Remplacer : Le cerveau est un organe complexe et intégré, pour lequel il n'existe à ce jour aucun modèle in vitro ou numérique adapté pour les besoins scientifiques du projet. L'expérimentation sur l'organisme entier, et donc sur animal vivant est incontournable. 2) Réduire : Le nombre d'animaux a été évalué et réduit au minimum nécessaire pour répondre aux besoins et objectifs scientifiques. Pour réduire le nombre d'animaux, des sélections par méthodes d'imagerie peu invasives pourront être mises en place (IRM, Scanner, RX ...), permettant par exemple une reconstruction 3D. 3) Raffiner : Les modèles animaux suivront exactement le cheminement d'un futur patient avec les mêmes exigences et techniques médicales mises en œuvre pour la réalisation des interventions (personnel hautement qualifié, plateau technique opératoire et d'imagerie de pointe). Les procédures expérimentales sont classées légères, modérées à sans réveil. Tous les actes de chirurgies et les mesures de prise en charge complète de la douleur ont été validées par une équipe de vétérinaires. Durant les interventions sous anesthésie, les paramètres vitaux sont enregistrés et contrôlés par des techniciens spécialisés en anesthésie afin d'adapter les perfusions, l'assistance respiratoire et les dosages d'anesthésiques et d'antalgiques. Les protocoles de réanimation sont standardisés et réalisés par des vétérinaires chirurgiens spécialisés. Les animaux sont hébergés systématiquement en groupe ou individuellement pour les besoins de l'étude et ont accès à un enrichissement environnemental multimodal (social, alimentaire, manipulation, physique).

17576 Notre laboratoire étudie les mécanismes moléculaires permettant aux astrocytes, cellules gliales majoritaires du cerveau, de se développer et d'exercer leur fonctions de régulation des fonctions synaptiques et vasculaires cérébrales. Dans ce cadre nous avons identifié un répertoire moléculaire de 20 gènes exprimés par les astrocytes dont nous souhaitons étudier le profil d'expression et la localisation dans le cerveau adulte, âgé, et au cours de son développement. Ces expériences sont cruciales pour comprendre le rôle de ces molécules et l'implication des astrocytes dans le cerveau.

Nos expérimentations se basent sur l'utilisation de lignées de souris sauvages commerciales ou générées par croisement au laboratoire. Nous réalisons pour chaque gène étudié une étude en hybridation in situ (détection des ARN), en immunofluorescence (détection des protéines), et en immunofluorescence en microscopie électronique (détection des protéines en ultrastructure). Ces expériences sont réalisées à plusieurs stades allant de 5 jours après la naissance (P5) à l'adulte âgé (1 an): P5, P15, P30, P60, 1an. Pour chaque animal nous réalisons une procédure de perfusion cardiaque qui nous permet de fixer les tissus cérébraux et de les conserver pour réaliser nos coupes histologiques et nos expériences de détection.

Le protocole de perfusion intracardiaque a été optimisé et raffiné à tous les stades étudiés permettant de réduire à son minimum le nombre d'animaux à utiliser.

Cette étude est menée sur la souris qui représente un très bon modèle d'étude du cerveau des mammifères. Il est irremplaçable pour notre étude car Il n'existe pas de système in vitro reproduisant la morphologie complexe des astrocytes et leurs interfaces périvasculaires et pérисynaptiques. Nous veillerons au bien être des animaux, afin de détecter tout indicateur de souffrance et déterminer si besoin l'arrêt de l'expérimentation. Ce projet nécessitera un total de 3600 souris. Il respecte les principes énoncés par les 3R (remplacement, réduction, raffinement). Cette étude permettra de comprendre les bases moléculaires de des fonctions astrocytaires.

17577 Ce projet concerne des travaux de recherche expérimentale à visée fondamentale. Parmi les stratégies de navigation spatiale, on distingue des stratégies égocentrées, dans lesquelles la localisation spatiale est codée par rapport au corps (par exemple à la librairie tourner à droite, puis au musée tourner à gauche) et des stratégies exocentrées dans lesquelles la localisation spatiale est codée par rapport à l'environnement lui-même (par exemple l'église est au sud de la ville). Alors

que les premières sont relativement préservées au cours du vieillissement, en revanche, les dernières sont plutôt altérées. Dans la perspective d'identification de cibles thérapeutiques, les récepteurs de la sérotonine, neuromédiateur impliqué de façon notoire dans les processus cognitifs, pourraient constituer de bons candidats. En particulier les récepteurs 5-HT7 sont localisés dans des structures cérébrales impliquées dans les stratégies de navigation exocentrées telles que l'hippocampe, et par ailleurs, leur expression diminue avec l'âge. Les objectifs de cette étude sont d'examiner l'implication des récepteurs 5-HT7 dans la navigation spatiale, à l'aide de modèles animaux murins de plusieurs souches (1836 souris sur 5 ans) dont l'une transgénique invalidée pour le gène d'un de ces récepteurs. A cette fin des études comparatives comportementales des stratégies utilisées à différents âges de la vie seront réalisées. Pour certains animaux, une étude des structures cérébrales activées sera envisagée. Les souris seront observées quotidiennement. Une grille précise d'évaluation des points limites sera utilisée. Tout signe de douleur ou de souffrance chez les animaux sera soulagé avec des analgésiques.

17578 L'obésité et le diabète de type 2 connaissent une croissance alarmante. Le diabète de type 2 est favorisé par une production de glucose par le foie excessive. Récemment, une voie de production de glucose impliquant des vésicules a été identifiée dans le foie.

L'objectif de ce projet est de déterminer si cette voie de production de glucose protège de l'obésité et du diabète en induisant une augmentation de la dépense énergétique par l'intermédiaire d'une modification de l'activité du système nerveux parasympathique.

Ces études seront réalisées dans des souris dont la voie vésiculaire de production de glucose sera invalidée spécifiquement dans le foie. Aucune modification qui pourrait diminuer le bien-être animal n'a été constatée dans ce modèle de souris. Par ailleurs, une diminution de production de glucose dans le foie n'induit pas de phénotype dommageable. Ces souris seront soumises à un régime riche en graisses et en sucres, connu pour induire une prise de poids et une altération de l'équilibre glycémique. Le temps de régime sera restreint à 8 semaines, ce qui permet d'observer des dérégulations métaboliques sans induire un phénotype diabétique.

La dépense énergétique sera mesurée par calorimétrie et l'activité des nerfs parasympathiques sera mesurée par électrophysiologie chez des animaux anesthésiés au cours d'une procédure sans réveil.

Les résultats de ce projet permettront de préciser les effets physiologiques de la voie vésiculaire de production de glucose et de déterminer son rôle dans la protection ou l'aggravation des maladies métaboliques.

Ce projet sera réalisé dans le respect de la règle des 3R:

Remplacement: Les études épidémiologiques montrent que la production hépatique de glucose exerce un contrôle de l'équilibre glycémique en modulant le fonctionnement de plusieurs organes. Comprendre comment les mécanismes cellulaires responsables de la production de glucose hépatique impactent la physiologie de l'organisme nécessite de conserver les communications inter-organes. Aucune méthode alternative ne peut se substituer à l'utilisation d'animaux pour ce projet car l'étude des fonctions métaboliques et nerveuses nécessite de prendre en compte le caractère systémique, ce qui ne peut être réalisé que par une approche intégrée in vivo.

Raffinement:

Toutes les mesures seront prises pour préserver le bien-être de l'animal. Toutes les souris seront remises dans leur cage d'origine après chaque série de mesures et en cas d'agressivité, des igloos seront ajoutés dans les cages. La procédure de mesure des activités nerveuses sera réalisée sous anesthésie avec un prétraitement analgésique, sans réveil des animaux. Des signes de maladie, de perte de poids, de souffrance, de lésions ou de détérioration de l'état de santé général constituent des points limites où les souris sont mises à mort.

Réduction: Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet a été calculé au plus juste afin d'être réduit à son minimum sans compromettre la significativité statistique de l'expérimentation, avec un maximum de 72 souris sur une période de 2 ans.

17579 L'évaluation et le développement des nouveaux dispositifs et techniques pour les affections cardiaques structurelles en chirurgie cardiaque et des gros vaisseaux par des méthodes de chirurgie et mini-invasives nécessite une phase de recherche pré-clinique et développement qui permet de mettre au point le dispositif et vérifier leur sécurité. La chirurgie cardiaque et des vaisseaux s'est développée depuis la deuxième moitié du XXème siècle, permettant de sauver des millions de personnes par an, avec l'avènement de nouvelles technologies comme la circulation extracorporelle (CEC) permettant la déviation du sang du cœur et des gros vaisseaux. Il est possible dès lors de travailler sur des cavités du cœur pendant que la machine cœur poumons assure la survie du patient durant l'intervention. Les techniques de chirurgie cardiaque s'intéressent à la réparation / remplacement de pathologies cardiovasculaire structurelles telles que par exemple les pathologies valvulaires, des cavités et parois cardiaques et des vaisseaux. La limite des techniques actuelles est leur invasivité, la nécessité de recours à la machine cœur poumons, ainsi que la durabilité des dispositifs / matériaux utilisés qui peuvent être « rejetés » par l'organisme. L'avantage escompté est une amélioration de la durabilité des implants (éviter le rejet et ainsi les ré-opérations parfois multiples des patients) et réduire le traumatisme tissulaire et éviter l'arrêt du cœur pendant la chirurgie. Les modèles animaux utilisés dans ce projet suivront exactement le cheminement d'un futur patient avec les mêmes exigences médicales mises en œuvre pour la réalisation des interventions (personnel hautement qualifié, et plateau technique de bloc opératoire et d'imagerie de pointe). La chronologie médicale inclura l'implantation et le suivi par imagerie de type échographique, angiographique, et scanner par exemple et de suivi clinique et examens complémentaires permettra d'assurer un cadre d'évaluation scientifique optimal mais aussi un suivi rapproché de l'évaluation de l'état de santé générale et du bien-être des animaux implantés. Des modèles animaux de grande tailles seront utilisés, avec environ 600 implantations par an sur une durée de 5 ans, sur des porcins (n. 500), ovins (n. 2500), bovins (n. 100) et canin (n. 100). Cela permettra sur 5 ans de valider les différents prototypes et réaliser les tests règlementaires de sécurité requis par les autorités. Il est donc indispensable d'avoir recours à la modélisation au préalable afin de vérifier le bon fonctionnement et la sécurité. Cela doit impérativement se faire sur des organes de taille identique aux organes de l'homme dans des conditions qui reproduisent la réalité de l'organe et de vérifier les effets secondaires néfastes sur l'ensemble de l'organisme. Les tests sur l'organisme entier sont donc incontournables. Cette phase de recherche pré-clinique est le filtre indispensable pour assurer la sécurité des futurs patients. Afin de réduire au maximum le nombre de modèles, des méthodes d'imagerie non douloureuses permettront de sélectionner au mieux les modèles avant leur entrée en procédure (screening échographique, angiographique, IRM, scanner / reconstruction 3D afin de simuler numériquement l'adéquation du prototype à l'anatomie (logiciel 3mensio) / scanner 3D logiciel 3mensio). L'ensemble des tests sera réalisé sous anesthésie générale, et 3 modes d'analgésie (locale et générales (morphiniques)) permettront de traiter la douleur. Ce projet permettra donc de développer des nouvelles techniques peu invasives dans le cadre des affections cardiaques.

17580 L'obésité et le diabète de type 2 connaissent une croissance alarmante. Le diabète de type 2 est favorisé par une production de glucose par le foie excessive. Récemment, une voie de production de glucose impliquant des vésicules a été identifiée dans le foie.

L'objectif de ce projet est de déterminer si cette voie de production de glucose protège de l'obésité et du diabète en induisant une augmentation de la dépense énergétique par l'intermédiaire d'une modification de l'activité du système nerveux parasymphatique.

Ces études seront réalisées dans des souris dont la voie vésiculaire de production de glucose sera invalidée spécifiquement dans le foie. Aucune modification qui pourrait diminuer le bien-être animal n'a été constatée dans ce modèle de souris. Par ailleurs, une diminution de production de glucose dans le foie n'induit pas de phénotype dommageable. Ces souris seront soumises à un régime riche en graisses et en sucres, connu pour induire une prise de poids et une altération de l'équilibre glycémique. Le temps de régime sera restreint à 8 semaines, ce qui permet d'observer des dérégulations métaboliques sans induire un phénotype diabétique.

La dépense énergétique sera mesurée par calorimétrie et l'activité des nerfs parasympathiques sera mesurée par électrophysiologie chez des animaux anesthésiés au cours d'une procédure sans réveil.

Les résultats de ce projet permettront de préciser les effets physiologiques de la voie vésiculaire de production de glucose et de déterminer son rôle dans la protection ou l'aggravation des maladies métaboliques.

Ce projet sera réalisé dans le respect de la règle des 3R:

Remplacement: Les études épidémiologiques montrent que la production hépatique de glucose exerce un contrôle de l'équilibre glycémique en modulant le fonctionnement de plusieurs organes. Comprendre comment les mécanismes cellulaires responsables de la production de glucose hépatique impactent la physiologie de l'organisme nécessite de conserver les communications inter-organes. Aucune méthode alternative ne peut se substituer à l'utilisation d'animaux pour ce projet car l'étude des fonctions métaboliques et nerveuses nécessite de prendre en compte le caractère systémique, ce qui ne peut être réalisé que par une approche intégrée in vivo.

Raffinement :

Toutes les mesures seront prises pour préserver le bien-être de l'animal. Toutes les souris seront remises dans leur cage d'origine après chaque série de mesures et en cas d'agressivité, des igloos seront ajoutés dans les cages. La procédure de mesure des activités nerveuses sera réalisée sous anesthésie avec un prétraitement analgésique, sans réveil des animaux. Des signes de maladie, de perte de poids, de souffrance, de lésions ou de détérioration de l'état de santé général constituent des points limites où les souris sont mises à mort.

Réduction: Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet a été calculé au plus juste afin d'être réduit à son minimum sans compromettre la significativité statistique de l'expérimentation, avec un maximum de 72 souris sur une période de 2 ans.

17581 Les études précliniques permettent d'acquérir les premières connaissances sur le comportement d'un candidat médicament, indispensable avant les essais chez l'homme. Le développement préclinique fait en particulier appel à l'expérimentation animale, qui est une étape indispensable à la connaissance d'un futur médicament avant de l'administrer à l'homme. Au cours du développement préclinique, un grand nombre d'études sont effectuées afin de qualifier le candidat médicament sur le plan de la pharmacologie, de la pharmacocinétique ou encore de la toxicologie. Ces études sont constitutives d'une partie du dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché (AMM) du futur médicament. Ce projet d'études précliniques a pour but d'étudier l'effet de différents traitements sur la thrombose veineuse et la coagulation chez la souris.

La coagulation est le processus normal de formation de caillots et est un processus physiologique visant à minimiser la perte de sang. Dans des conditions physiopathologiques, la formation d'un trop grand nombre de caillots ou l'accumulation trop rapide d'un gros caillot peut entraîner une thrombose. La thrombose peut survenir dans les artères ou dans les veines, dans ces dernières, on parle de thromboembolie veineuse. Le caillot dans les veines peut se développer soit dans la région de la jambe ou de l'aîne et est appelé thrombose veineuse profonde, ou dans les vaisseaux du poumon conduisant à une embolie pulmonaire. Les symptômes de la thrombose veineuse profonde comprennent des jambes enflées et douloureuses, des difficultés à marcher. Elle est associée à une mortalité accrue à long terme. De plus, elle peut conduire à l'embolie pulmonaire. Les symptômes de l'embolie pulmonaire comprennent l'essoufflement, la douleur et, à long terme, peuvent entraîner des maladies pulmonaires ou cardiaques congestives. La thromboembolie veineuse est la troisième cause de mortalité vasculaire la plus courante dans le monde.

Les facteurs de risque de thromboembolie veineuse comprennent par exemple une chirurgie lourde, une attaque cardiaque ou un cancer actif. Notamment, la thromboembolie veineuse est la deuxième cause de mortalité chez les patients cancéreux avec tumeurs solides (comme les tumeurs au pancréas, rein ou colon). De plus, les patients cancéreux ont un risque 4 à 7 fois plus élevé de développer une thromboembolie veineuse. Les options de traitements disponibles pour la thromboembolie veineuse peuvent induire des effets secondaires potentiellement mortels tels que

des saignements sévères (car ils agissent sur la cascade de coagulation) qui sont très problématiques pour les patients atteints de cancer sous chimiothérapie. C'est pourquoi il est important de trouver de nouvelles options thérapeutiques pour ces patients dits à haut risque.

Dans ce contexte, nous utiliserons deux modèles précliniques en lien avec la thrombose veineuse ou la coagulation chez la souris pour étudier l'efficacité ou la sécurité de nouvelles molécules en cours de développement pharmaceutique:

- le modèle de thrombose veineuse par ligature
- le « modèle de la queue qui saigne » (tail bleeding)

Pour ce projet nous pensons effectuer 15 études avec pour chaque étude, l'utilisation de 66 souris C57Bl/6 (groupes de 6 animaux pour le contrôle et de 12 animaux pour les tests d'efficacité), soit 990 souris sur 5 ans.

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

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

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

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

Toutes les procédures induisant une douleur chez l'animal seront réalisées sous anesthésie. Les procédures de chirurgie seront effectuées par une personne habilitée et formée. Un analgésique sera administré en phase pré- et post-opératoire. Pour le modèle du tail bleeding, non seulement les souris seront sous anesthésie lors de l'expérience pour éviter toute souffrance liée à l'expérimentation mais en plus l'expérience se terminera au bout de 20 minutes (mise à mort, classe sans réveil) afin d'éviter la létalité qui pourrait survenir pendant l'expérience.

De manière globale, les animaux seront sous surveillance rapprochée. Les animaux seront suivis quotidiennement pour pouvoir identifier les signes de souffrance caractérisés par le comportement de l'animal : les changements physiques (pelage, peau, yeux...), la mobilité, l'alimentation, l'agressivité, le poids du corps (mesuré 2 fois par semaine) limité à une perte de 20% maximum par rapport au poids initial, la consistance des fèces. Si les signes persistent au bout de 24h, l'animal sera sorti des procédures expérimentales et euthanasié.

- « Remplacer » les modèles animaux :

Notre projet se focalise sur des modèles expérimentaux nécessitant l'utilisation d'un modèle animal. Ces modèles in vivo permettent de reproduire la physiologie d'un organisme entier. Il n'existe pas de modèle cellulaire reproduisant nos procédures expérimentales.

17582 De nombreuses avancées récentes en imagerie interventionnelle résultent du développement de dispositifs médicaux innovants permettant un diagnostic plus fiable et un traitement moins invasif de nombreuses pathologies (tumeurs, arythmies cardiaques, troubles neurologiques). Les objectifs de ce projet sont :

- 1) de caractériser par imagerie (anatomique et fonctionnelle) l'étendue de la zone pathologique
- 2) de la traiter de manière ciblée (thermothérapie) et contrôlée en temps réel par imagerie. Ces dispositifs médicaux sont en effet de plus en plus guidés par imagerie multimodale (échographie, IRM, rayons X) pour améliorer le positionnement du ou des capteur(s) diagnostic et/ou thérapeutiques qui sont amenés en regard de la zone à traiter (au contact direct ou à distance via un accès extracorporel). L'imagerie peropératoire permet également de caractériser en temps réel l'avancée du traitement pendant le déroulement de la procédure thérapeutique.

L'utilisation chez le patient de ces nouveaux dispositifs médicaux est conditionnée à une évaluation préalable sur l'animal en conditions proches de la clinique afin d'évaluer leur ergonomie (manipulation, opérabilité), leurs fonctionnalités (précision de la balistique, qualité de l'imagerie,...),

leur efficacité (capacité à diagnostiquer précisément une région pathologique, capacité à induire une lésion contrôlée et reproductible) et de garantir l'absence de complications notables.

L'ensemble de ces données ne peut être acquis sur un système inerte ou un simulateur (REPLACEMENT). De par leurs caractéristiques anatomiques et leur métabolisme proche de ceux de l'homme, les espèces du porc et de l'ovin ont été identifiées comme les meilleurs modèles pour le projet. Une cohorte de 250 animaux est prévue sur 5 ans, en estimant que 5 dispositifs seront évalués par an incluant chacun 10 animaux. Ce nombre d'animaux est le nombre d'animal jugé nécessaire pour évaluer les points mentionnés ci-dessus tout en assurant un échantillonnage statistique suffisant (REDUCTION).

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

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

17583 La drépanocytose est la première maladie génétique au monde. Elle se traduit par la synthèse d'une hémoglobine anormale (HbS) qui, sous sa forme désoxygénée, polymérise et entraîne des modifications structurelles des globules rouges (GR) qui prennent alors la forme d'une faucille, deviennent plus fragiles, plus rigides et moins déformables. Chez les patients drépanocytaires (HbSS), la fragilité des GR falciformes entraîne leur destruction en excès, aboutissant à une anémie chronique (i. e. faible taux de GR dans le sang) associée à une faible oxygénation tissulaire. Plus rigides et moins déformables, les GR falciformes ont tendance à se bloquer dans les microvaisseaux, aboutissant à des crises vaso-occlusives (CVO) particulièrement douloureuses pouvant causer la défaillance de certains organes (rate, reins, cerveau, poumon, foie, os ...) et mettre en jeu le pronostic vital des patients. Des travaux que nous avons conduits chez des patients drépanocytaires et chez le modèle murin Townes ont permis de mettre en évidence de multiples conséquences de la maladie sur la structure musculaire (perte de masse, diminution de l'apport sanguin et en oxygène) et de la fonction musculaire (force maximale, montée en force, résistance à la fatigue). Les CVO, elles, entraînent une acidose intracellulaire et une augmentation de la consommation de phosphocréatine. Nos travaux conduits chez la souris Townes montrent, de plus, que l'entraînement en endurance permet de réduire l'acidose intracellulaire et le dysfonctionnement musculaire, dus à la drépanocytose. Bien qu'aucune étude scientifique ne l'ait montré, l'exercice physique est déconseillé aux patients drépanocytaires pour éviter de possibles crises vaso-occlusives. Ainsi, l'exploration in vivo des effets de l'exercice intense chez ces sujets est éthiquement inenvisageable. Avant cela, l'utilisation d'un modèle de souris drépanocytaires apparaît donc comme indispensable. Les combinaisons de traitements nécessitent aussi des essais sur le modèle murin avant de les effectuer chez l'Homme.

Design de l'étude

L'objectif de ce projet est de tester de nouvelles approches pharmacologiques et comportementales (activité physique régulière) dans le but d'améliorer le métabolisme énergétique et la fonction musculaire chez des souris Townes.

L'exploration du métabolisme énergétique sera réalisée au moyen de la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire du phosphore 31 (SRM du P31). Cette technique offre la possibilité de mesurer in vivo le pH intracellulaire et les concentrations des principaux composés phosphorylés (ATP, phosphocréatine, ADP, phosphate inorganique) impliqués dans le métabolisme énergétique. Ces mesures sont réalisées lors du protocole de repos-exercice-récupération.

3R : Remplacer, Réduire et Raffiner

Nos travaux se dérouleront donc dans le strict respect de la règle des 3R. En effet, l'utilisation de la SRM du P31 permettra de par son caractère non invasif et totalement indolore de réduire le stress des animaux. La SRM du P31 réduira également le nombre d'animaux utilisés car elle permet d'enregistrer des cinétiques métaboliques chez les mêmes individus, contrairement aux techniques classiques de biochimie qui auraient nécessité de sacrifier des cohortes d'animaux aux différents temps de la cinétique afin de réaliser des dosages métaboliques sur biopsies musculaires. De plus, nous n'utiliserons que le nombre de souris nécessaires pour l'exploitation statistique des données, à savoir 70 individus en tout (7 groupes de 10 souris). Ces expérimentations seront effectuées sous anesthésie générale, ainsi qu'avec du gel ophtalmique afin d'éviter le dessèchement oculaire. La température de la souris sera gardée stable à l'aide d'une couverture chauffante et observée à l'aide d'une sonde rectale insérée à l'aide de gel lubrifiant. Le réveil des souris sera effectué en cage individuelle sous lampe chauffante avant d'être remis avec ses congénères.

Par ailleurs, il est important de préciser que les critères métaboliques et fonctionnels que nous allons étudier sont de types physiologiques, et ne sont donc pas reproductibles avec des cultures de cellules musculaires ; c'est pourquoi nous ne pouvons pas remplacer l'étude chez l'animal vivant.

Toujours dans le respect de la règle des 3R, les procédures seront réalisées dans une pièce à l'écart de la salle d'hébergement. De plus, nous avons déterminé des points limites à ne pas franchir pour respecter le bien-être de l'animal : un contrôle quotidien de l'état clinique de nos animaux sera réalisé selon un système d'évaluation avec indices de 0 (normal ou léger) à 3 (changements importants par rapport à la normale) pour différents critères physiologiques et comportementaux (perte de poids, vocalisation importante, poils hérissés, prostration, blessures, infections cutanées). Le protocole sera arrêté pour tout animal obtenant un score supérieur ou égal à 2 dans deux de ces catégories. Les souris seront hébergées collectivement (4 à 5 animaux par cage) et le milieu sera enrichi par la présence dans chaque cage de matériel de nidation (coton), d'abris en plastique permettant aux animaux de se cacher, et de bûchettes de bois destinées à être rongées. La nourriture et l'eau de boisson seront fournies ad libitum. Le changement des litières aura lieu une fois par semaine.

17584 Contexte scientifique :

L'obésité est un problème majeur de santé publique dont la prévalence est en constante augmentation. On estime que près d'un tiers de la population mondiale est en surpoids. Récemment, l'inflammation associée à l'obésité est apparue comme un facteur clé dans le développement cette maladie. Cette inflammation est médiée par les cellules immunitaires (dites « globules blancs »). Parmi ces cellules, les monocytes sont connus pour jouer un rôle dans l'entretien des tissus (appelé maintien de l'homéostasie). Au cours de l'obésité, les monocytes sont recrutés vers le tissu adipeux (le tissu gras), dans lequel ils sont connus pour interagir avec les cellules adipeuses (adipocytes) et ainsi moduler la physiologie du tissu. Ces monocytes peuvent se différencier en cellules inflammatoires dont la présence au sein du tissu est associée à un mauvais fonctionnement de celui-ci. Toutefois, les interactions entre monocytes et adipocytes restent mal caractérisées. Ce projet vise à caractériser le rôle des monocytes dans le tissu adipeux. Nous émettons l'hypothèse que la production d'acides gras par les adipocytes est un mécanisme clé dans les interactions cellulaires régissant la physiologie du tissu.

Problématique :

Le dérèglement des cellules immunitaires est associé à la progression des maladies métaboliques. La nutrition joue un rôle clé dans la production des globules blancs, ainsi que dans leurs fonctions. Nos résultats préliminaires suggèrent qu'un manque de production d'acides gras par les adipocytes induit une inflammation affectant les monocytes sanguins, qui sont alors recrutés vers ce tissu. Les mécanismes d'interaction entre adipocytes, acides gras et monocytes restent inconnus.

Hypothèse de travail :

Nous allons tester l'hypothèse que le taux d'acides gras circulants impacte l'attraction des monocytes vers le tissu adipeux, et les fonctions de ces cellules au sein du tissu. Pour répondre à

cette question, nous utiliserons des souris génétiquement modifiées (OGM), dont le tissu adipeux est incapable de générer des acides gras. Ces souris seront comparées à des souris normales (dites « sauvages »). Nous utiliserons divers traitement (anticorps, inhibiteurs) visant à moduler le recrutement des monocytes vers le tissu adipeux et leur fonctionnement une fois qu'ils sont dans le tissu. En utilisant des modèles murins, nous chercherons à déterminer le rôle des lipides dans l'attraction des monocytes vers le tissu adipeux, et le rôle de ces cellules dans le maintien de l'homéostasie du tissu.

Justification du modèle et raffinement :

Les maladies métaboliques sont des pathologies complexes dans lesquelles de multiples voies nutritionnelles et physiologiques interviennent. Une approche in vitro de culture cellulaire n'est pas appropriée afin de répondre correctement aux demandes de cette problématique. Ainsi, des modèles murins génétiquement modifiés ont été développés par la communauté scientifique comme outils d'études intégrant la complexité de la problématique. Nous utiliserons des souris génétiquement modifiées dont le tissu gras présente un défaut de génération de lipides (souris « AdipoQCre-ERT2/+ ; Pnpla2fl/fl ») afin de déterminer le rôle que ces lipides jouent au sein des cellules immunitaires. Ces souris ne présentent aucun défaut de prise alimentaire, poids ou comportement, et n'ont donc aucun phénotype

Page 2

dommageable.

Les procédures proposées sont basées sur une justification scientifique et tiennent compte du bien-être animal. L'utilisation de modèles murins est régie par la règle des « 3R » :

- Réduction : afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, nous utiliserons une approche statistique nous permettant d'estimer le nombre d'animaux nécessaires pour répondre à notre question scientifique. De plus, nous incluons dans notre étude les facteurs « sexe » et « âge » en utilisant les souris mâles et femelles, et ce peu importe leur âge. L'élevage de nos souris se fait de manière à générer des souris correspondant à nos besoins expérimentaux, ce qui nous permet de générer peu de souris surnuméraire.

- Remplacement : comme décrit précédemment, aucune méthode alternative in vitro ou in silico n'est adaptée afin de remplacer totalement le modèle murin. Toutefois, nous avons mis en place une approche utilisant la technologie d'édition génétique CRISPR-Cas9 permettant de remplacer partiellement ces modèles murins. Plus précisément, nous utiliserons cette technologie afin de modifier le génome de cellules de moelle osseuse provenant de souris « sauvages ». Ces cellules seront modifiées in vitro et seront ensuite réimplantées dans des souris receveuses irradiées lors d'une procédure de greffe de moelle osseuse. Cette technique couramment utilisée permet de remplacer les cellules immunitaires de la souris receveuse par celles de la souris donneuse. Elle n'a pas d'incidence néfaste sur le comportement des animaux. Auparavant, nous aurions dû maintenir deux colonies de souris supplémentaires, ce qui aurait représenté plusieurs centaines d'animaux au cours du projet. La méthode CRISPR-Cas9 permettra donc de remplacer les souris déficientes pour LIPA ou CD36 par des outils in vitro et donc de grandement réduire le nombre d'animaux générés et utilisés.

-Raffinement : Les procédures que nous souhaitons mettre en place dans le cadre de ce projet sont pratiquées en routine au laboratoire. Les expérimentateurs disposent donc du savoir-faire adéquat afin de réaliser ces procédures tout en privilégiant le bien-être animal. Nous n'avons précédemment observé aucune incidence de ces procédures sur le bien être des souris en termes de poids, prise alimentaire, ou quelque forme de détresse. Les points limites régissent le déroulement des procédures et permet l'amélioration du bien-être animal afin de diminuer la détresse ou l'angoisse des animaux. Pour chaque procédure, nous avons prévu des mesures adaptées permettant la gestion de la souffrance, l'angoisse et la douleur pour nos animaux. Les cages contiennent de la litière permettant d'éviter le contact avec le plastique et sont enrichies avec un abri en plastique et du matériel de nidification. Les animaux auront libre accès à de l'eau et de la nourriture.

Perspectives :

Cette étude pourrait ouvrir de nouvelles perspectives de traitement visant à moduler l'inflammation du tissu adipeux au cours de pathologies métaboliques telles que l'obésité. Afin de pouvoir générer des résultats robustes, nous avons estimé que 800 souris devraient être utilisées sur une période de 5 ans. Les procédures proposées dans ce projet sont connues comme non remplaçables par des procédures ne faisant pas intervenir l'animal.

17585 L'hypothèse de la programmation, au cours du développement, du risque de maladie chronique à l'âge adulte (obésité, diabète de type 2) durant les périodes précoces de la vie (dénommée DOHaD) stipule qu'un environnement nutritionnel délétère, au cours de périodes critiques du développement (préconception, conception, gestation, lactation), prédispose l'individu aux maladies métaboliques et conduit à la mise en place d'une transmission à travers les générations de ces pathologies. Des modifications des marques épigénétiques chez la descendance, liées aux perturbations de l'environnement maternel, sont en partie responsables de la programmation nutritionnelle. Les objectifs de ce travail sont 1) de développer un modèle de surnutrition maternelle chez la souris en période préconceptionnelle, durant la gestation et la lactation. Ce modèle animal mime l'obésité maternelle en utilisant un régime « obésogène » (hyperlipidique hypercalorique) assez proche des régimes humains ; 2) d'étudier les mécanismes de programmation en focalisant sur les modifications transcriptomiques et épigénétiques du tissu adipeux et du pancréas (en particulier, les îlots pancréatiques), tissus clés de la régulation du métabolisme glucidique et lipidique, de la descendance adulte. L'avantage principal de ce projet est la possibilité de disposer de modèles animaux « non génétiques » de programmation développementale représentant une approche expérimentale pertinente et novatrice pour rechercher les signatures épigénétiques nutritionnelles susceptibles d'être utilisées comme marqueurs de diagnostic chez les individus à risque. Afin de mieux comprendre les mécanismes de transmission transgénérationnels de l'obésité et du diabète de type 2, le modèle souris semble le mieux adapté car il permet une analyse intégrée de maladies à phénotypes complexes et multi-tissulaires. Chez l'Homme, ces marques épigénétiques pourraient constituer une « archive », mais également un outil pour suivre l'effet d'une intervention nutritionnelle afin de « déprogrammer » la prédisposition à l'obésité et au diabète de type 2 de la descendance ayant subi un environnement nutritionnel maternel obésogène. Le protocole animal développé veille à respecter la législation qui régit l'expérimentation animale au niveau européen (directive UE 10/63 ; article 14 et 23). Les dommages de ce projet concernent principalement le stress métabolique plus ou moins important de l'animal ainsi que le nombre d'animaux utilisés. Concernant le stress métabolique, le protocole de surnutrition maternelle (régime hyperlipidique hypercalorique) utilisé conduit à une augmentation de la masse de la mère de l'ordre de 30% qui est considérée chez la souris comme un statut de surpoids (voire d'obésité). Par contre, cette augmentation de poids ne provoque aucune invalidité ni stress ou souffrance animale. De la même façon, la descendance placée sous régime « obésogène » jusqu'à l'âge adulte présentera une surcharge pondérale du même ordre de grandeur ne provoquant aucune invalidité ni souffrance animale à court et à long terme au cours de son développement. Les conditions d'élevage, d'hébergement et de soin ainsi que les méthodes utilisées sont les plus appropriées afin de garantir le bien-être des animaux pour réduire au maximum tout stress. Concernant le nombre d'animaux, tenant compte du taux de réussite de reproduction, de la taille des portées nécessaires et du fait que l'étude portera uniquement sur la descendance mâle, il est prévu d'utiliser 315 animaux dans le respect de la règle des 3R, bien qu'en physiologie, cette règle est plus complexe à mettre en œuvre. Remplacement - Le modèle animal est indispensable à ce projet de recherche. Il n'existe pas actuellement de système alternatif capable de reproduire un processus complexe de programmation « in vitro » hors animal. Réduction - Malgré les aléas de la reproduction animale, cela passe par l'utilisation d'un nombre minimal d'animaux pour obtenir des groupes permettant d'avoir des données statistiquement significatives. Raffinement - Aucune douleur ou souffrance n'est attendue et tous les protocoles expérimentaux ont été optimisés dans ce sens. Le personnel est formé et compétent pour identifier les cas dans lesquels l'animal n'est plus dans son état physiologique optimal. Les conditions d'hébergement sont adaptées à l'espèce et à l'âge des animaux afin d'optimiser leur confort et leur bien-être.

17586 Dans l'hémorragie méningée ou sous-arachnoïdienne (HSA), le taux de mortalité atteint 30% au cours de la première semaine alors que 50% des patients décèdent au cours des six premiers mois, la principale complication étant une ischémie cérébrale retardée due à un vasospasme cérébral (VSC) associé à des microthromboses cérébrales. Les dommages vasculaires peuvent résulter d'une inflammation vasculaire et méningée locale probablement à l'origine d'un pronostic neurologique défavorable pour le patient.

Des résultats préliminaires montrent que le peptide vasoactif urotensine II (Ull) constitue, chez les patients HSA, un marqueur diagnostique du VSC et qu'un ligand du récepteur Ull (récepteur UT) prévient le VSC dans un modèle de souris HSA. Nos objectifs sont : i) d'étudier l'impact du système urotensinergique sur la cascade d'évènements post-HSA, et en particulier sur l'inflammation méningée, le VSC, la neuroinflammation, les modifications vasculaires et les fonctions motrices et cognitives en utilisant un modèle de souris HSA exprimant l'UT sauvage (UT+/+), délétées du gène codant l'UT (souris UT-/-), ou exprimant le récepteur UT humain (UTh+/h+), et cela à différents délais post-HSA pour évaluer la cinétique d'apparition des évènements physiopathologiques (J1, J3, J5, J7 post-HSA) ; ii) d'étudier les effets sur l'inflammation et le VSC de ligands urotensinergiques nouvellement conçus et de les comparer aux ligands antagonistes déjà connus capables de bloquer les voies de signalisation dépendantes du récepteur UT, lorsqu'injectés par voie intracisternale au moment de l'induction de l'hémorragie. L'objectif est de pouvoir proposer de nouvelles molécules thérapeutiques ciblant l'UT permettant de prévenir les effets retardés post-HSA. De plus, les effets de plusieurs ligands nouvellement conçus de l'UT (4 ligands), administrés dans l'espace sous-arachnoïdien ou par voie intraveineuse seront évalués dans trois tests comportementaux chez les souris UTh+/h+ HSA et Sham à J7 post-HSA (16 souris/groupe). Les effets sur le VSC des ligands urotensinergiques seront également comparés et associés à ceux de la nimodipine, traitement standard du VSC en clinique qui semble améliorer la récupération neurologique des patients HSA. Des études comportementales seront réalisées chez ces souris (injection de sang dans l'espace sous-arachnoïdien) et leurs performances seront comparées à celles de souris Sham (recevant une solution saline). Trois tests comportementaux seront utilisés permettant d'évaluer l'activité spontanée, les capacités d'équilibre et de coordination motrice et la cognition (reconnaissance d'objet nouveau). Le nombre d'animaux est fixé à 16 par groupe pour les évaluations comportementales afin de tenir compte de la variabilité interindividuelle et de pouvoir réaliser des analyses statistiques. Ces études seront réalisées à partir du 7ème jour après la chirurgie. La distribution cérébrale de ligands (Ull, urantide, dab8-urantide) marqués par des traceurs fluorescents (8 souris/groupe) sera aussi étudiée chez des souris HSA ou sham, des 3 génotypes d'intérêt à différents temps (J1 et J7 post-HSA). Alors que des études préliminaires suggèrent que l'hypoxie est capable d'induire une surexpression du récepteur UT, nous testerons cette hypothèse en condition HSA. Pour cela, de la desoxyhémoglobine qui fixe l'oxygène ou un bloqueur ou un stabilisateur d'hypoxie sera injecté 2h avant une injection ou non d'Ull par voie intracisternale pendant la chirurgie d'induction de l'hémorragie chez des souris UT+/+ Sham et HSA. Les études immunohistochimiques seront réalisées à J1 (8 souris par groupe) et J7 post-HSA et les trois tests comportementaux à partir de J7 post-HSA (16 souris par groupe). Les anévrysmes cérébraux pré-hémorragiques montrant une prévalence plus importante chez les femmes, nous étudierons l'impact du système urotensinergique sur les complications associées à l'HSA chez des souris femelles. Pour cela, des études comportementales seront réalisées chez des souris UT+/+, UT-/- et UTh+/h+ femelles hémorragiques (injection de sang associée ou non à un ligand urotensinergique dans l'espace sous-arachnoïdien) et leurs performances seront comparées à celles de souris Sham. Trois tests comportementaux à partir de J7 (16 souris par groupe) seront utilisés permettant d'évaluer l'activité spontanée, les capacités d'équilibre et de coordination motrice, et la cognition (reconnaissance d'objet nouveau). Des études histologiques seront réalisées à J7 post-HSA sur ces mêmes souris. Pour l'ensemble de ces études comportementales et biologiques, un total de 2866 souris sera donc nécessaire. Tout au long du projet, la règle des 3R sera respectée. Remplacement : aucune méthode alternative n'existe. Des tests comportementaux sont utilisés et des études sur cerveaux sont effectuées, ce qui nécessite de travailler sur animal entier. Réduction : le nombre de souris par groupe nécessaire pour réaliser chaque expérience a été estimé en fonction de test de puissance se basant sur des données

préliminaires ou des résultats déjà publiés. Il tient compte de la variabilité inter-individuelle et afin de réduire le nombre d'animaux total utilisé, les animaux utilisés pour les tests comportementaux serviront également aux études neurobiologiques sur leurs cerveaux. Raffinement : Pendant les opérations, les souris seront anesthésiées. Une prise en charge de la douleur potentielle sera effectuée. Un suivi quotidien ou bi-quotidien (dans les 48h post-chirurgie) sera effectué par du personnel formé et expérimenté et permettra de détecter un éventuel signe de souffrance. L'hébergement des animaux sera conforme à la réglementation. La mise à mort des souris permettant le prélèvement des échantillons biologiques sera réalisée après anesthésie et en accord avec le cadre réglementaire.

17587 Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité et de morbidité dans le monde occidental et restent un problème majeur de santé publique.

L'amélioration de notre compréhension du système cardiovasculaire par l'identification de nouveaux régulateurs de l'homéostasie cardiovasculaire est importante pour le développement de nouvelles thérapies contre les maladies cardiovasculaires. Le but de ce projet est de générer des souris chimériques qui aideront à définir la régulation et la fonction des voies de signalisation récemment impliquées dans la régulation du débit et de la perméabilité du système microvasculaire et à révéler les effets du ciblage thérapeutique de ces voies.

Dans ce projet, nous générerons et caractériserons des modèles de souris chimériques qui serviront dans des protocoles expérimentaux distincts pour évaluer les rôles des composants des voies de signalisation des Récepteurs Couplés aux Protéines G (GPCR) dans les cellules vasculaires et hématopoïétiques.

Ce programme de recherche est développé dans le respect des règles éthiques des 3R:

Remplacement : Seuls des modèles in vivo nous permettent d'étudier des processus physiologiques et pathologiques impliquant les GPCR dans la régulation du débit et de la perméabilité du système microvasculaire. En effet celle-ci met en jeu des mécanismes à l'échelle de l'organisme entier et nécessite donc l'utilisation d'animaux vivants puisque l'étude des conséquences métaboliques de la fluctuation de ces paramètres, avec ou sans traitement, ne peut s'envisager que dans un organisme entier.

Réduction : Nous avons réduit le nombre d'animaux utilisées au minimum nécessaire et suffisant pour valider scientifiquement notre étude du point de vue de l'analyse statistique. Le choix s'est porté sur la souris qui est un modèle reconnu et efficace pour la production de souris génétiquement modifiées.

Raffinement : Bien que nous ne nous attendions pas à ce que le chimérisme en soi soit associé à la douleur et à la souffrance, nous fournirons une anesthésie pour toutes les procédures qui pourraient être associées à la douleur. Un suivi clinique et une surveillance des animaux seront réalisés par un personnel qualifié avec la mise en place de points limites. Tout animal présentant des signes de souffrance sera pris en charge et/ou euthanasié selon les procédures en vigueur.

À terme, les connaissances scientifiques de base fournies par ce projet devraient être précieuses pour le développement de nouveaux traitements contre les maladies cardiovasculaires. Ce projet devrait utiliser 2136 souris génétiquement modifiées.

17588 De nombreux protocoles de recherche actuels ont pour but d'arrêter ou de ralentir les processus dégénératifs touchant les photorécepteurs tels que ceux retrouvés dans les rétinopathies pigmentaires et les dégénérescences maculaires, la DMLA en chef de file. Cependant, une fois ces maladies arrivées à un stade avancé de leur processus évolutif, la cécité et le handicap visuel ne peuvent plus être évités et seules des prothèses rétiniennes pourraient restaurer l'information sensorielle sans avoir recours à la thérapie génique. La stratégie consiste à stimuler électriquement la rétine avec ces implants pour restaurer une vision partielle. Bien que des patients soient déjà implantés à l'heure actuelle, cette stratégie ne permet pas la restauration d'un niveau de vision suffisamment précis pour rendre ces patients autonomes. Ces dernières années notre connaissance des mécanismes neurophysiologiques à l'origine de la faible résolution des implants

a progressé ainsi que la technologie dédiée à ce type d'application. Le premier défi à l'heure actuelle consiste à stimuler électriquement et très localement certaines cellules de la rétine en évitant la diffusion passive des courants et l'activation des axones ou fibres nerveuses des neurones de la rétine. Le second consiste à déchiffrer le mode de communication des neurones de la rétine et des aires visuelles du cerveau pour injecter la bonne information via les implants rétiniens.

Pour ce faire, nous proposons de commencer nos travaux sur un modèle rongeur sain et pathologique (Brown Norway : max 50 rats sains et 50 rats porteurs d'une dégénérescence rétinienne progressive d'origine génétique) pour graduellement passer à un modèle primate non-humain (PNH : 3 macaques rhésus) pour se rapprocher du système visuel de l'Homme, soit 103 animaux au total pour 5 ans. Le passage au macaque permettra de travailler en fin d'étude sur un système visuel plus proche de l'Homme où la transversalité prend alors tout son sens. Ces travaux suivront une approche aigue, donc réalisés uniquement sous anesthésie générale et analgésie appropriée, à l'issue desquelles les animaux seront mis à mort. Ils consistent à implanter une rétine artificielle et à enregistrer l'activité de la rétine et des aires corticales visuelles suite à une stimulation visuelle naturelle comparée à une stimulation électrique de la rétine via les implants. Chez les mêmes animaux il nous sera possible de comparer l'activation naturelle et prothétique du cerveau et de modifier les paramètres de stimulation électrique pour se rapprocher d'un fonctionnement naturel. Dans une optique de « raffinement », nous débuterons sur un modèle rongeur sain permettant de mettre au point une nouvelle technique de stimulation électrique visant à activer uniquement les structures rétinienne désirées. Le modèle rongeur pathologique nous permettra d'adapter ces paramètres aux caractéristiques modifiées d'une rétine pathologique. Ce n'est qu'ensuite que s'effectuera le passage au modèle PNH dont le système visuel est très proche de l'homme avec un hébergement en groupe en milieu enrichi. Un effort particulier sera apporté au contrôle de l'anesthésie (monitoring de la profondeur à l'EEG), de la paralysie (électro-stimulation musculaire et ventilation contrôlée) et à la gestion de la douleur (analgésie morphinique). Le volet « remplacement » est impossible dans ce projet car trop invasif pour l'Homme et des études in silico sont inenvisageables. Enfin pour se conformer à l'aspect « réduction » de la règle des 3R, nous avons introduit un « go/no go » pour deux techniques novatrices de stimulation. Si des résultats non probants sont observés chez les rongeurs, ces protocoles ne seront pas utilisés chez les PNH. De plus, nous apporterons un soin particulier à inclure uniquement des PNH provenant d'autres projets, ceci pour éviter l'utilisation d'animaux naïfs.

17589 Contexte scientifique : Les maladies cardio-métaboliques (i. e, obésité, diabète, athérosclérose) représentent la première cause de décès dans le monde. Malgré les progrès récents et la mise en place de stratégies thérapeutiques visant à diminuer le mauvais cholestérol dans le sang, plus de 17 millions de patients décèdent de maladies cardiométaboliques chaque année. Bien que l'incidence de ces maladies entre les hommes et les femmes soit différent, les mécanismes sous-jacents restent mal compris. Récemment, l'inflammation est apparue comme une composante centrale contribuant au développement des maladies cardio-métaboliques mais les mécanismes qui régissent cette inflammation restent inconnus. Récemment, la sécrétion de mitochondries libres ou encapsulées dans des vésicules par les cellules inflammatoires a été identifiée dans des cultures cellulaires in vitro et pourrait donc être un nouveau biomarqueur inflammatoire des maladies cardio-métaboliques in vivo. Bien que le rôle des mitochondries dans les cellules inflammatoires commence à être appréhendé dans l'inflammation à bas bruit des maladies cardiométaboliques, l'importance et la pertinence de leur sécrétion reste à être validé in vivo. Ce projet vise donc à identifier l'importance de la sécrétion de mitochondries libres par les cellules inflammatoires dans les maladies cardiométaboliques, ainsi que les mécanismes cellulaires qui la gouverne.

Hypothèse de travail : Le nombre de mitochondries circulantes dans le sang pourraient représenter un nouveau marqueur de la composante inflammatoire des maladies cardio-métabolique. Ce projet a pour but d'identifier la régulation de ces sécrétions mitochondriales provenant des cellules immunitaires. Justification du modèle : En condition physiologique les souris sont naturellement protégées contre l'athérosclérose. Afin d'étudier cette pathologie nous devons donc utiliser des modèles génétiquement modifiés pour récapituler le profil cardio-métabolique humain, en particulier

les niveaux des lipides plasmatiques. Nous avons choisi ce modèle de souris car c'est un modèle standard, bien reconnu dans le domaine scientifique pour l'investigation de manipulations génétiques liées aux maladies cardiométaboliques. Toutefois, toutes les procédures menées avec ce modèle seront interrompues avant l'apparition de signes cliniques douloureux pour les animaux. Ce projet fait aussi appel à des lignées de souris génétiquement modifiées qui ne présentent pas de phénotype particulier. Ces souris permettent de suivre le nombre et la fonction des mitochondries in vivo.

Les 3R: Remplacement : Les maladies cardio-métaboliques sont des pathologies complexes dans lesquelles de multiples voies métaboliques et physiologiques interviennent. De ce fait, une approche in vivo reproduisant ces interactions nous est indispensable pour répondre à notre problématique. A ce jour, aucun modèle alternatif n'existe et permettrait de répondre à notre hypothèse. En effet, des modèles murins capable de développer de l'athérosclérose ont été développés et validés par la communauté scientifique comme outils d'études précliniques. L'ensemble des procédures proposées dans ce projet sont également connues comme non remplaçables, par des procédures ne faisant pas intervenir directement l'animal. **Réduction :** Notre approche statistique garantit l'obtention de résultats exploitables avec le plus petit nombre d'animaux possible. Dans le cadre de cette étude, et pour chaque groupe, nous utiliserons des souris mâles et femelles. Ceci permettra non seulement d'utiliser l'ensemble des animaux générés dans les élevages mais également d'identifier si des dimorphismes sexuels existent sachant que les maladies cardiométaboliques touchent différemment les hommes et les femmes. Ce projet prévoit l'utilisation de 650 souris sur 5 ans.

Raffinement : La mise en place de points limites précoces, prédictifs, adaptés et basés sur une observation détaillée des animaux au cours de chaque procédure permettront de limiter la sévérité de celles-ci. Les souris seront de plus hébergées en groupe (6 souris par cage, ou 5 souris par cage si une des souris fait 30g ou plus) dans des cages enrichies (igloos, ouate, baguettes de bois à ronger). **Perspectives :** La stratification des patients atteints de maladies cardio-métaboliques est d'un intérêt public dans une époque où la médecine personnalisée est en plein essor. Cette étude pourrait donc ouvrir de nouvelles perspectives de diagnostic et traitement visant à mieux appréhender l'inflammation à bas bruit dans les maladies cardiométaboliques.

17590 Les circuits neuronaux impliquant des interactions mutuelles entre le cortex cérébral et les noyaux gris centraux, dont le thalamus, jouent un rôle majeur dans la cognition et le comportement. Ils sont affectés dans de nombreuses maladies neurologiques et psychiatriques. Notre recherche sur des modèles animaux est dédiée à la compréhension des mécanismes physiopathologiques de troubles cognitifs similaires à ceux observés chez des patients atteints de maladies psychiatriques comme la schizophrénie. Notre but ultime est de développer une preuve de concept thérapeutique utilisant la modulation électrique de circuits neuronaux en vue de corriger de tel troubles. Plus précisément, nous mettons en œuvre, in vivo chez le rat, des explorations électrophysiologiques cellulaires et des modulations électriques au sein de circuits neuronaux intacts pour étudier, dans des conditions physiologiques et pathologiques, les mécanismes à l'origine des interactions cellulaires.

Tous les animaux subissent sous anesthésie générale une chirurgie stéréotaxique pour l'implantation d'électrodes intracérébrales d'enregistrement et de stimulation électrique. Les enregistrements et stimulations sont effectués sur des animaux sédatisés ou vigiles pour étudier les activités cérébrales spontanées en corrélation avec le comportement. Les explorations électrophysiologiques intracérébrales sont indolores. Les animaux reçoivent par ailleurs par voie sous-cutanée une injection subanesthésique de kétamine, une molécule connue pour produire chez l'homme un état psychotique (hallucinations, troubles de la cognition et de la pensée). Simuler un état de transition psychotique avec la kétamine permet de comprendre la physiopathologie de la schizophrénie et de développer des thérapies innovantes.

Remplacement : les explorations électrophysiologiques intracérébrales ne sont pas remplaçables ni par des approches in vitro, qui utilisent des systèmes neuronaux déafférentés, ni par des outils mathématiques.

Réduction : Au fil du temps, nous avons optimisé nos approches électrophysiologiques nous permettant d'augmenter leur taux de succès (>80%) et donc de réduire significativement le nombre d'animaux requis pour nos études. Nous n'utiliserons que le nombre d'animaux nécessaires à la validation des résultats scientifiques. Durant les cinq prochaines années.

Raffinement : Toutes les précautions sont prises pour respecter l'animal (bien-être physique et psychologique) : maintien en groupes sociaux, cages enrichies avec barreaux à ronger et tunnels, actes invasifs réalisés sous anesthésie générale et analgésie avec maintien automatisé de la température corporelle, suivi cardiologique et électroencéphalographique de la qualité de l'anesthésie. Et des points limites ont été établis, nous permettant de soustraire l'animal à la souffrance.

Un nombre de 168 rats est prévu pour ce projet.

17591 Les affections de l'appareil digestif sont nombreuses et très fréquentes chez les lagomorphes. Toutes sortes de stress, qu'ils soient liés au sevrage, à l'alimentation, ou à d'autres facteurs, favorisent le développement de ces affections, dont certaines peuvent se révéler mortelles en l'absence de soins. Même s'il est difficile de chiffrer précisément la prévalence de la pathologie digestive en élevage rationnel en France à ce jour, les pertes économiques des éleveurs sont parfois très importantes. Avec un traitement curatif efficace, l'impact des désordres digestifs sur la croissance des lapins ne peut être totalement endigué. La prévention de ces affections digestives non spécifiques, c'est-à-dire non liées à des agents pathogènes, est donc la meilleure stratégie pour limiter les impacts sur la croissance et l'état sanitaire.

L'objectif de ce projet est de tester plusieurs stratégies permettant de diminuer la prévalence des affections digestives et d'optimiser la croissance des animaux. Les stratégies mises en œuvre, sont l'incorporation d'additifs, de matières premières ou d'autres traitements, y compris non autorisés sur le marché, mais aussi de mettre en application différentes techniques d'élevage, comme le rationnement alimentaire par exemple. Afin de répondre au mieux à cet objectif, des essais en conditions d'élevage sont réalisés, reflétant ainsi les élevages de lapins de différents pays.

Dans le cadre de ce projet, les performances des lapins (gain de poids, mesures de consommation et d'efficacité alimentaire) et l'état sanitaire lors de l'engraissement (mortalité et morbidité) sont mesurés. Des prises de sang pourront être réalisées dans ce projet ; elles seront réalisées par un personnel compétent et formé à l'acte en lui-même, ainsi qu'à la contention, afin de maintenir les animaux dans des conditions rassurantes et sécuritaires.

Les conditions d'ambiance pourront être modulées pour représenter les conditions d'élevage de lapins dans différents pays, ceci dans le but de reproduire les problématiques rencontrées et y trouver des solutions efficaces. Dans ce cas, des mesures de consommation d'eau seront réalisées.

Les animaux sont placés en logement collectif ou individuel selon l'objectif de l'essai. En effet, un animal par cage permet une mesure très fine et très précise de la consommation alimentaire, alors que plusieurs animaux dans une cage permettent de mieux représenter l'élevage cunicole standard. Des chainettes seront disposées dans chaque logement, et peu importe le nombre de lapins, afin que les animaux puissent jouer avec quand ils le souhaitent.

L'état de santé des animaux sera vérifié quotidiennement par les techniciens animaliers de l'établissement utilisateur. Si un lapin présente des signes de stress ou de douleur comme une perte d'appétit ou des difficultés à se déplacer, il sera écarté de l'étude. Des points limites stricts et définis à l'avance sont appliqués tout au long du projet. Pour chaque acte pouvant engendrer une souffrance ou un stress (conditions environnementales, prélèvements de sang), le nombre d'animaux sera réduit au minimum permettant la démonstration statistique d'un effet du traitement.

La complexité des paramètres influant sur les besoins nutritionnels et leurs interactions ne permet pas d'une part d'utiliser uniquement des modèles alternatifs (modélisation, méthodes in vitro). D'autre part, la réponse à un régime alimentaire (digestion, absorption, utilisation, ...) est spécifique à chaque espèce. Les données de ce projet étant destinées à la filière cunicole, il est indispensable de pouvoir conduire les travaux sur des lapins en engraissement.

Le projet aura une durée de 5 ans, impliquant au total 9450 lapins, ce qui permettra de réaliser 15 essais, comportant chacun 630 lapins maximum. 85% des animaux inclus dans ce projet rejoindront le circuit de consommation de viande.

17592 La presbytie, qui survient systématiquement après 45 ans, concerne 1,8 milliard de personnes, dont 826 millions ne sont pas ou sont mal corrigés. Il est bien documenté qu'elle est causée par une rigidification du noyau du cristallin empêchant les muscles accrochés à la périphérie du cristallin de modifier d'épaisseur et de courbure nécessaires à l'accommodation.

Le cristallin est composé de cellules contenant des protéines appelées protéines cristallines, qui sont solubles et le rendent transparent en homogénéisant son indice de réfraction. En vieillissant, les agrégats de cristallines (création de ponts disulfures principalement), deviennent insolubles et rigidifient le noyau. L'hypothèse principale est qu'il est nécessaire de « ramollir » le noyau du cristallin en désagrégeant les protéines cristallines. Une des techniques les plus appropriées pourrait être le laser femtoseconde. Ce dernier permet d'envoyer de très courte impulsion d'énergie photonique avec précision dans le tissu sans dégagement d'énergie thermique.

Si ce traitement semble une alternative de choix pour traiter la presbytie, il faut au préalable s'assurer de l'absence d'effets secondaires dans les jours-mois qui suivent ce traitement laser femtoseconde. Le but de ce projet est donc d'évaluer le risque de développement d'une cataracte post traitement et de dommages aux autres tissus sur le trajet du laser chez le lapin New Zealand White. Un traitement au laser des cristallins sera mis en place et effectuée par une autre structure de recherche comme l'autorise le décret no 2020-274 du 17 mars 2020 modifiant certaines dispositions relatives à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques.

Au total, 6 lapins seront utilisés pour ce projet. Ils seront répartis dans 3 groupes de 2 animaux pour 3 délais de suivis postopératoire : 14 jours, 1 mois et 2 mois. Les animaux suivis 2 mois seront suivis avec précaution pour s'assurer qu'il n'y ai pas d'effets secondaires inattendus liés à la répétition de ces gestes.

Le nombre d'animaux est réduit au MINIMUM pour que les résultats soient représentatifs de la variation interindividuelle qui devrait être faible dans notre étude. Ce nombre doit OBLIGATOIREMENT ÊTRE MIS EN OEUVRE IN VIVO afin d'être au plus proche de la situation clinique chez l'homme. Tout est mis en œuvre pour LIMITER AU MAXIMUM LE STRESS ET LA DOULEUR DE L'ANIMAL (anesthésie générale pour les imageries). Le traitement laser, effectué d'un seul côté, est peu invasif (aucune incision débouchant vers l'extérieur) et ne devrait pas déclencher de douleur après le geste. Chaque animal bénéficiera d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les observations, mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. La douleur est rigoureusement contrôlée grâce à des points limites évalués en amont, et gérée grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (myorelaxant/anesthésie/analgésie).

Par ailleurs, les lapins seront hébergés en cage réglementaire (plateforme paroi transparente entre 2 cages), dans un environnement enrichi (jouet kong et autres jeux). Enfin, l'eau et la nourriture (granules et foin) sont mises à disposition "ad libitum" et de la musique est diffusée en salle d'hébergement pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux.

17593 Les androgènes, comme la testostérone, sont des hormones stéroïdes notamment impliquées dans le contrôle de la masse musculaire, le métabolisme, le développement des caractères sexuels et le comportement. Leurs effets sont relayés par le récepteur des androgènes (AR) qui va contrôler l'expression de gènes cibles. Afin de traiter certaines maladies, de nombreux composés pharmacologiques ciblant ce récepteur ont été élaborés, tels que les anti-androgènes pour le cancer de la prostate et les androgènes de synthèse pour la fonte musculaire. Cependant, leur utilisation est limitée en raison de nombreux effets secondaires comme le diabète de type 2, l'ostéoporose et la fonte musculaire pour les anti-androgènes, ou la prolifération des cellules épithéliales de la prostate pour les androgènes synthétiques. Ainsi, il est crucial de comprendre la spécificité tissulaire et les mécanismes moléculaires qui sous-tendent l'action de ces hormones.

Pour ce faire, nous étudierons chez des souris de type sauvage et des souris mutantes (souris dans lesquelles AR est invalidé), deux tissus cibles des androgènes, à savoir le muscle squelettique et la prostate. Des analyses post mortem de ces tissus seront ensuite réalisées. Elles permettront de déterminer quels mécanismes moléculaires permettent aux androgènes d'une part de contrôler la masse et la force musculaires et d'autre part de maintenir les caractères sexuels chez le mâle.

La compréhension de ces mécanismes permettra à terme de générer des composés plus sélectifs et avec moins d'effets secondaires pour le traitement des malades.

REMPACEMENT: Dans cette étude, l'utilisation de la souris comme modèle animal est nécessaire pour représenter le plus fidèlement possible l'organisme humain. En effet, les modèles actuels de culture cellulaire ne peuvent récapituler les différents types de fibres musculaires et l'anatomie complexe de la prostate. Or, l'histologie et la fonction du muscle et de la prostate de la souris sont semblables à ceux de l'homme. De plus, ils répondent de manière similaire aux divers facteurs auxquels ils sont exposés, tels que la stimulation nerveuse, le stress, l'état nutritionnel et certaines hormones dont les androgènes. Cette similarité anatomique couplée à l'ensemble des outils moléculaires à notre disposition et propres à la souris font de cet animal le modèle le plus pertinent pour mener à bien ces recherches.

RAFFINEMENT: Afin d'anticiper toute souffrance inutile, le traitement aux androgènes sera effectué sous anesthésie et sera complété par toutes les mesures nécessaires au soulagement de la douleur. Les souris seront placées sur un support chauffant pour prévenir la déperdition de chaleur causée par l'anesthésie et seront suivies dans les heures suivant leur réveil. Le risque d'infection sera pris en considération au niveau de la zone d'administration des androgènes. Si une des autres expériences devait avoir des conséquences sur le bien-être des souris, des mesures adaptées pour l'amélioration de la vie animale seront prises, comme l'utilisation d'analgésique, l'ajout de sel dans l'eau de boisson, le suivi du réveil et des points de chirurgie après anesthésie.

REDUCTION: De nombreuses études menées au laboratoire ont apporté une bonne connaissance du modèle et de la méthodologie à utiliser, permettant ainsi la mise en place d'expérimentations de qualité et raffinées sur un nombre limité de cohortes. Cela permettra l'utilisation d'un nombre d'animaux limité au strict minimum, tout en assurant une pertinence statistique et qualitative des résultats.

Ces études seront menées sur 1 lignée de souris ciblant la prostate et 2 lignées de souris ciblant le muscle squelettique, l'une pour la fibre en développement et l'autre pour la fibre à l'âge adulte. Afin d'effectuer des analyses statistiques solides, l'ensemble de ces études requerra ainsi 1176 animaux sur 5 ans.

17594 Chez l'homme, la stimulation de nerfs périphériques est utilisée pour le traitement de maladies du système nerveux central comme l'épilepsie ou la dépression. De nos jours, plus de 50000 patients dans le monde sont implantés avec des microstimulateurs.

On sait que la stimulation de certains nerfs périphériques agit également directement sur les cellules du système immunitaire en inhibant leur activité, ouvrant la voie au traitement des maladies autoimmunes par les techniques d'électrostimulation de nerfs périphériques chez l'humain (Chavan et al. *Immunity*, 2017, DOI:10. 1016/j. immuni. 2017. 06. 008). Il a été montré chez la souris que l'électrostimulation des nerfs périphériques et plus particulièrement le nerf de la rate (nerf splénique) diminue l'inflammation et l'activité des cellules immunitaires, notamment les lymphocytes B qui sont les cellules productrices d'anticorps. Ces études ont été à la base d'un essai clinique réalisé avec des patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde chez lesquels l'électrostimulation résulte en une amélioration significative des scores cliniques. L'électrostimulation de nerfs périphériques constitue donc une approche thérapeutique prometteuse pour le traitement chronique des maladies autoimmunes et notamment la sclérose en plaque. La sclérose en plaque multiple (MS) touche plus de 2. 3 millions de personnes dans le monde avec des atteintes neurologiques invalidantes. Différentes formes cliniques existent selon la progression de l'aggravation des attaques de ces fonctions neurologiques. Il s'agit de pathologies autoimmunes inflammatoires conduisant à des attaques des constituants de Système Nerveux Central (CNS). La forme la plus courante est

caractérisée par des poussées inflammatoires, espacées par des périodes de rémission. Les patients atteints de cette forme de MS ont une qualité de vie extrêmement altérée selon l'intensité et la fréquence des poussées et il n'existe pas à l'heure actuelle de traitements curatifs pour cette maladie. Une thérapie basée sur l'électrostimulation des nerfs périphériques est une approche thérapeutique innovante, présentant une toxicité potentielle moindre comparée aux molécules de type stéroïdien par exemple et pourrait apporter une nouvelle alternative thérapeutique pour les patients réfractaires aux traitements actuels. Le présent projet se propose ainsi d'étudier l'effet de l'électrostimulation nerveuse sur le développement de la MS.

Pour la MS, il existe un modèle *in vivo* largement utilisé, le modèle d'Encéphalite Autoimmune Expérimentale (EAE) induite chez la souris C57BL/6 par immunisation avec une protéine humaine exprimée au niveau du CNS, la Myeline Oligodendrocyte Glycoprotéine humaine (hMOG). Dans ce modèle dit chronique, les souris développent des signes d'atteintes neurologiques similaires à la MS conduisant à une paralysie progressive des membres postérieurs puis antérieurs. Ce modèle se caractérise également par la présence d'anticorps dirigés contre le CNS et plus particulièrement la protéine MOG de manière similaire à ce qui a été observé chez les patients atteints de MS. Contrairement à d'autres modèles d'EAE qui utilisent des antigènes sous forme de peptide, l'immunisation avec la protéine humaine MOG permet d'étudier un modèle expérimental de pathologie autoimmune dans lequel les lymphocytes B producteurs d'anticorps sont impliqués.

Notre démarche expérimentale consistera donc à électrostimuler le nerf de la rate chez des souris atteintes d'EAE. En tenant compte des mesures de réduction et de raffinement mises en place, les contraintes imposées aux animaux ont été évaluées et mises en balance avec les résultats escomptés et permettent d'envisager une balance dommage / avantage favorable à la réalisation de ce projet.

Remplacement : Ce type d'étude ne peut être envisagé que sur des organismes entiers préservant l'intégrité des interactions entre les systèmes immunitaires et nerveux dans un contexte pathologique et non pathologique.

Réduction : Le plan d'étude est conçu pour éviter une initiation non nécessaire des procédures en réalisant des tests statistiques pour chaque procédure. Ainsi, si les résultats obtenus lors de la procédure 1 ne sont pas validés, les procédures 2, 3 et 4 ne seront pas réalisées. Par conséquent, le nombre de souris indiqué est un nombre maximum.

Raffinement : Des mesures de raffinements seront mises en place afin de limiter au maximum les contraintes imposées aux animaux dans le contexte de cette étude : les interventions chirurgicales seront menées suivant un protocole d'anesthésie et d'analgésie en prenant soin de maintenir la température corporelle des animaux en les plaçant sur une couverture chauffante. Le suivi postopératoire inclura un traitement antalgique et une grille d'observation préétablie prévoyant des mesures correctives et la mise en œuvre le cas échéant de points limites précoces et adaptés.

L'ensemble du projet nécessitera au maximum l'utilisation de 270 souris.

17595 La cicatrisation et la réparation des blessures sont les processus biologiques les plus complexes qui se produisent dans la vie humaine. Après une blessure, de multiples voies biologiques sont activées. Une mauvaise cicatrisation des plaies, qui se produit chez les patients diabétiques par exemple, peut entraîner des résultats défavorables graves comme l'amputation. Aujourd'hui, 425 millions de personnes dans le monde sont atteintes de diabète, dont 3,3 millions en France. Il y a donc une impulsion croissante pour développer de nouveaux agents qui favorisent la cicatrisation des plaies.

Des études préliminaires *in vitro* et *ex-vivo* ont montrés un effet cicatrisant significatif de l'extrait de lin sur des plaies non diabétiques. Ces résultats laissent à penser que l'extrait de lin pourrait favoriser la cicatrisation chez les patients diabétiques. Chez le patient diabétique, le processus de cicatrisation est retardé. Pour le moment, le processus de cicatrisation chez le patient diabétique n'a pas pu être reproduit *in vitro*.

L'objectif de ce projet est donc l'étude de l'influence de l'extrait de lin sur la cicatrisation chez la souris diabétique. La souris diabétique, issue d'une mutation spontanée, est un modèle de diabète

de type II utilisé dans les études d'hyperglycémie, d'hyper-insulinémie, de l'insulinorésistance, de l'obésité liée au diabète, de pathologies associées au diabète (retard de cicatrisation, problème de fertilité, neuropathie périphérique, myocardiopathie...), des déficiences des glandes endocriniennes (défaut des cellules adipeuses, défaut de l'hypothalamus et de la glande pituitaire, défaut du pancréas). Un modèle murin de cicatrisation décrit dans la littérature et utilisé pour reproduire la cicatrisation chez le patient diabétique va être utilisé. Ce modèle permet de créer deux plaies de 6mm de diamètre sur le dos des animaux, de part et d'autre de la colonne vertébrale. Ce modèle est reproductible et est couramment utilisé dans le cadre de l'étude de la cicatrisation chez le patient diabétique. La création de deux plaies par animal, permet le suivi de deux conditions de traitement différentes par animal, réduisant de moitié le nombre d'animaux utilisés.

Les traitements testés sont l'extrait de lin à deux concentrations différentes, un contrôle négatif et le PDGF-BB un contrôle positif. Le PDGF-BB est actuellement le seul facteur de croissance ayant une autorisation des autorités de santé pour accélérer la cicatrisation chez l'Homme.

Une évaluation macroscopique des plaies, une mesure de la taille des plaies et des photographies seront réalisées 3 fois par semaine jusqu'à cicatrisation complète, en même temps que le renouvellement des traitements et le changement des pansements.

Au cours de cette étude, 25 souris seront utilisées.

Dans premier temps, 5 souris seront utilisées dans le cadre d'une étude pilote afin de transposer le modèle murin de cicatrisation décrit dans la littérature, et de s'assurer de la bonne application des différents paramètres d'évaluation, et la mise à disposition des ressources nécessaires pour la bonne application des paramètres d'étude.

Après validation de la phase pilote, 20 souris seront utilisées, permettant d'obtenir 40 plaies testées soit 10 plaies par produits testés, ce qui permettra d'obtenir des résultats significatifs.

L'ensemble des actes techniques seront réalisés sous anesthésie afin de limiter le stress des animaux. Un traitement analgésique pré et postopératoire sera administré pour la prise en charge de la douleur. Des points limites adaptés seront mis place afin d'éviter toute douleur ou souffrance inutile.

Les animaux seront hébergés individuellement afin d'éviter qu'ils s'arrachent les pansements entre eux. Un enrichissement adapté sera fourni, les animaux auront à disposition du coton supplémentaire et des maisons en carton seront mis à disposition pour permettre aux animaux de se cacher. Un change plus régulier des cages sera mis en place, les souris diabétiques pouvant avoir une production d'urine plus importante.

L'extrait de lin a montré des résultats encourageants in vitro, sur des cellules et sur des explants de peau. Le processus de cicatrisation chez le patient diabétique ne pouvant être reproduit in vitro, le recours à l'animal ne peut être remplacé.

17596 Ce projet fait partie d'un projet de recherche fondamentale pluridisciplinaire et centrée sur des questions paléanthropologiques liées à la bipédie habituelle, l'une des caractéristiques les plus frappantes de la lignée humaine. Les découvertes récentes (jusqu'à 7 Ma) mettent en évidence une diversité inattendue d'anatomies locomotrices chez les hominins qui conduisent les paléanthropologues à émettre l'hypothèse que la bipédie chez les hominins a pris des formes distinctes au cours de l'évolution humaine. Ces bipédies étaient ni transitoires ni inefficaces, mais constituaient probablement des modes positionnels efficaces et bien coordonnés. Un scénario beaucoup plus complexe d'évolution des hominins que celui proposé il y a quelques années émerge dans lequel les connaissances sur l'anatomie locomotrice jouent un rôle croissant.

Ce projet a pour but d'étudier et de simuler les marches bipèdes des hominins fossiles grâce à la collecte des données morphologiques précises (scanner) et biomécaniques (cinématique de la marche bipède notamment) afin d'estimer précisément les relations fonctionnelles entre une morphologie et un mouvement.

Dans ce projet, il est important de travailler sur des morphologies les plus proches de l'Homme possible et avec des espèces qui pratiquent naturellement la bipédie (occasionnellement). C'est pourquoi, l'espèce choisie pour ce projet est le babouin.

3 individus ont intégrés ce projet. Ce nombre a été choisi afin de réduire à son maximum le nombre d'animaux dans ce projet, tout en s'assurant de la répliquabilité de la procédure. A la fin de ce projet, les animaux réintégreront l'élevage dont ils sont issus.

Une partie de ce projet consiste à collecter des données morphologiques précises. C'est pourquoi, des scanners CT seront réalisés.

Pour cela, les animaux seront transportés entre leur lieu d'hébergement et l'imageur CT le matin des jours de scanner. En cas de besoin (animaux excités par le transport par exemple), une période d'acclimatation d'environ 1h sera réalisée. Les animaux seront anesthésiés pour le scanner et seront sous la surveillance constante d'un vétérinaire agréé. Tous les actes réalisés sur les animaux seront réalisés par du personnel formé et compétent et travaillant avec ces animaux. Après les scanners, une période de réveil d'environ 1h sera réalisée afin de s'assurer que les animaux aient bien récupéré de l'anesthésie avant d'être de nouveau transportés vers leur lieu d'hébergement.

17597 Notre équipe étudie l'effet du rythme circadien (un mécanisme moléculaire qui adapte le métabolisme de l'organisme en fonction des cycles jour/nuit) sur le développement des tumeurs et sur la capacité des cellules cancéreuses à migrer et former des métastases.

Nos études sur des cellules en culture ont montré que les cellules cancéreuses de sein ne se comportent pas de la même manière en fonction des phases du rythme circadien, une phase du cycle (correspondant à la phase nocturne) favorisant la migration des cellules cancéreuses et leurs propriétés souches et invasives. La perturbation du rythme circadien dans ces cellules par des mutations ou des agents chimiques peut ainsi modifier leurs propriétés et leur aptitudes à migrer et former des métastases.

Suite à ces études *in vitro*, nous devons valider nos résultats chez l'animal, en utilisant des croisements entre des lignées de souris transgéniques développant spontanément des tumeurs mammaires (MMTV-PyMT) et des lignées de souris mutantes pour le gène *Bmal1*, un régulateur majeur du rythme circadien.

Nous voulons évaluer si cette mutation affecte le développement de tumeurs mammaires et limitent ou augmentent la formation de métastases pulmonaires. Nous voulons aussi évaluer si cette mutation affecte la proportion de cellules souches cancéreuses dans les tumeurs primaires et dans les métastases dérivées de ces tumeurs primaires.

Notre projet prend en considération la règle des 3Rs:

Remplacer: La majeure partie de nos expérimentations sont réalisées *in vitro* sur des cultures cellulaires. Cependant le contexte biologique de la progression tumorale ne peut pas être réduit à ces systèmes d'étude car ils ne prennent pas en compte la complexité du contexte physiologique comme la vascularisation ou l'environnement tumoral. En complément des invalidations géniques réalisées *in vitro* sur les lignées cellulaires, le recours à l'animal est encore nécessaire pour valider l'importance des gènes contrôlant le rythme circadien dans la progression tumorale.

Réduire: nous avons défini nos plans d'expérience afin d'avoir un nombre d'animaux par condition expérimentale (30) permettant de réaliser des analyses statistiques discriminantes entre lots contrôles et lots expérimentaux.

Raffiner: les animaux seront hébergés dans une animalerie agréée et manipulés par des personnes formées. Les cages comprendront des éléments pour enrichir l'environnement des animaux et leur permettre de reproduire des comportements naturels (exploration, fouissement, nidification). Les animaux seront visités quotidiennement afin d'évaluer leur état de santé et leur comportement. Un traitement analgésique par injection sera appliqué à l'apparition des symptômes suivants : perte d'appétit, poil hérissé et terne, problème de motricité. Afin de limiter la souffrance des animaux, nous avons défini 4 points limites au-delà desquels les animaux seront sacrifiés : (1) état physiologique anormal (prostration, perte de poids supérieur à 10% par rapport à la mesure

antérieure ou de 20% par rapport à la pesée initiale), (2) taille des tumeurs primaires dépassant 1700mm³, (3) détection de micro-métastases pulmonaires par imagerie non invasive ou (4) âge des animaux dépassant la limite de 180 jours pour la lignée MMTV-PyMT.

L'ensemble de l'étude devrait nécessiter un maximum de 120 souris pour deux procédures expérimentales. La première procédure correspond à l'étude de souris MMTV-PyMT et mutée pour le gène Bmal1 et nécessite 60 souris (1 lot expérimental et 1 lot contrôle de 30 souris) et la deuxième procédure correspondant aux expérimentations de greffe nécessite 60 souris (1 lot expérimental et 1 lot contrôle de 30 souris).

17598 Le coronavirus SARS-CoV-2 est une menace pour la santé mondiale et la disponibilité d'un vaccin efficace induisant une réponse immunitaire spécifique, forte et durable contre ce pathogène est une urgence. Le vaccin candidat doit générer et maintenir une réponse à la fois humorale et cellulaire au niveau systémique et sur les surfaces muqueuses, portes d'entrée et site de multiplication initial du virus. Ce projet repose sur la collaboration et l'expertise développées par deux équipes de recherche dans le domaine de la vaccination et de l'étude de la réponse immunitaire. 1/ Développement et validation de VLP (Virus Like Particle) dans le domaine de la vaccination contre le papillomavirus. 2/ Développement et validation de vaccins sous-unitaires par voie muqueuse dans le domaine de la vaccination contre la toxoplasmose.

Dans le cadre du développement d'un vaccin muqueux anti-SARS-CoV-2, le pouvoir immunogène de nos candidats vaccins a d'ores et déjà été validé en modèle murin BALB/c. Des études sont actuellement en cours afin de déterminer la ou les stratégie(s) (parmi celles présentées ci-après) qui seront retenues pour l'évaluation de la protection en modèle infectieux. Le modèle d'infection de référence est établi depuis quelques mois sur des souris C57Bl/6 exprimant le récepteur humain ACE2, récepteur majeur de la protéine S du SARS-CoV-2 présent sur les cellules épithéliales (notamment pulmonaires). L'expérimentation décrite ici consistera à étudier la réponse des animaux à des injections vaccinales diverses afin de sélectionner un candidat vaccin le plus pertinent avant de s'engager dans un challenge infectieux sur les animaux.

Cette première étude nécessitera l'utilisation de 408 souris au maximum dans le respect de la règle des 3R.

- Remplacement : Pour ce projet, il n'existe pas de méthode de substitution qui pourrait restituer fidèlement un modèle de régulation complexe permettant la validation de notre stratégie.

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

- Raffinement : Les souris sont hébergées en accord avec la réglementation française et bénéficient d'un enrichissement social et physique (objets en cellulose pour faire un nid ou à ronger) dans la zone d'hébergement défini par la structure chargée du bien-être animal de l'établissement. Un suivi quotidien de l'état de santé des animaux sera réalisé avec une surveillance systématique de points limites.

17599 Les tumeurs cérébrales constituent la première cause de mortalité et de morbidité par cancer chez l'enfant et le jeune adulte. Actuellement, les taux de guérison restent très faibles pour certaines formes de cancer et notamment les gliomes diffus de la ligne médiane (ou DMG). Ces tumeurs qui représentent 10 à 15% des tumeurs cérébrales pédiatriques, sont les formes les plus graves et les plus mal connues sur le plan biologique. Ces tumeurs sont universellement incurables et constituent le plus grand défi thérapeutique de l'oncologie pédiatrique à ce jour.

Compte tenu de la rareté de modèles pertinents in vivo de DMG, le développement de modèles génétiquement modifiés reste décisif afin d'étudier la biologie de ces tumeurs et d'explorer de nouvelles thérapeutiques, notamment en immunothérapie. Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, nous utiliserons des constructions et des protocoles chirurgicaux déjà validés dans la littérature.

L'utilisation d'animaux est ici indispensable afin de pouvoir recréer un modèle tumoral infiltrant complexe avec des interactions intercellulaires, une activité du système immunitaire et la présence de la barrière hémato-encéphalique physiologique dans le cerveau qui limite le passage de médicaments.

Les procédures expérimentales mises en jeu respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement. Les groupes seront constitués d'un minimum d'animaux assurant la fiabilité des résultats en termes de statistiques. Les procédures seront réalisées sous anesthésie gazeuse ou injectable et une analgésie sera pratiquée en post-opératoire le cas échéant et dès l'apparition d'au moins un signe clinique pour éviter toute souffrance. Les points limites seront strictement appliqués. Les animaux seront hébergés en groupe et le milieu sera enrichi afin de leur apporter un maximum de confort. L'ensemble de ce projet comprend l'utilisation d'au maximum 181 souris.

17600 Les rhabdomyosarcomes (RMS) sont les sarcomes des tissus mous les plus fréquents chez l'enfant et sont issus des muscles. Les thérapies actuelles sont lourdes et associent une élimination chirurgicale de la tumeur, un traitement de chimiothérapie et des séances de radiothérapie. Ces traitements intensifs ne sont pas sans conséquence en termes de séquelles à long terme pour les enfants. De plus, le taux de survie des enfants et adolescents atteints de RMS est de 75%, et chute à 20% si des métastases sont présentes.

Le développement de modèles innovants, tels que les tumoroïdes (représentatifs de la tumeur de chaque patient), devient indispensable pour la caractérisation des tumeurs et la prise en charge des patients en conséquence.

En lien étroit avec les pédiatres, des mini-tumeurs cultivées en laboratoire, appelés tumoroïdes, ont été développées à partir de rhabdomyosarcomes pédiatriques. Ces tumoroïdes présentent l'avantage de pouvoir étudier de manière extrêmement précise les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement des tumeurs et d'identifier leur rôle dans la résistance aux traitements. Ils peuvent également servir de base pour des tests de thérapies en cours de développement.

Le test de tumorigénicité des tumoroïdes (formation de tumeurs suite à l'injection des cellules) est une étape indispensable à la validation de ces modèles. La méthode internationalement reconnue pour ce faire nécessite l'injection de cellules en sous-cutanée ou dans le lieu de prédilection des tumeurs, dans des souris immunodéprimées. De plus, la validation pré-clinique de composés thérapeutiques implique le recours à un modèle animal. Si la mise en place de ces tumoroïdes nécessite transitoirement l'utilisation de souris pour valider leurs caractéristiques, ils permettront néanmoins de réduire considérablement le recours aux modèles animaux en adéquation avec la règle des 3R.

Dans ce projet, 1020 souris au maximum (150 à 204 par an) seront utilisées. Ce nombre a été réduit au maximum pour permettre les analyses statistiques, la caractérisation des sous-populations souches, la validation du caractère tumoral des tumoroïdes (procédure 1 et 2), et les tests d'efficacité de candidats médicaments déjà sélectionnés sur les modèles tumoroïdes in vitro (procédure 3). Dans la procédure 1, la validation de la tumorigénicité des tumoroïdes sera déterminée par des injections de tumoroïdes réalisées en sous-cutanée. En cas d'échec de la procédure 1 (pas ou très peu de prise de greffe, moins de 50%), la procédure 2 sera mise en place. Cette dernière consiste à valider la tumorigénicité des tumoroïdes par injection des tumoroïdes dans le site de prédilection des tumeurs (dans le muscle de la patte, dans notre cas). Pour la procédure 3, il s'agira d'un test pré-clinique final de l'efficacité de traitements sur les tumoroïdes xéno greffés en orthotopique ou sous-cutané (selon les résultats de la procédure 1). L'administration d'anesthésique et d'analgésique sera respectée selon les recommandations en vigueur. Pour les greffes un suivi adapté des animaux et la définition précise des points limites précoces et prédictifs d'un mal être, permettront de limiter au maximum la souffrance animale afin de se conformer strictement à la règle des 3R.

A l'issue de ce projet de recherche, nous escomptons pouvoir valider ces nouveaux modèles de tumoroïdes de rhabdomyosarcomes pédiatriques, plus représentatifs des tumeurs d'origines. La

mise à disposition d'un tel modèle préclinique permettra d'améliorer les connaissances sur les RMS pédiatriques, en particulier sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance aux traitements. Enfin, ces tumeurs pourront être utilisés pour des criblages pharmacologiques dans des conditions se rapprochant le plus possible de l'évolution clinique du patient.

17601 Les odeurs jouent un rôle majeur dans le comportement social et alimentaire du jeune mammifère dès la naissance, voire avant la naissance. La connaissance de leur nature et de leur mode d'action est essentielle pour comprendre la perception que le nouveau-né et le jeune en développement ont de leur environnement olfactif, et l'utilisation qu'ils en font pour survivre et grandir (interaction avec la mère pour téter et être protégés, apprentissage d'informations nouvelles, préparation à la vie autonome), par exemple chez les espèces d'élevages. Cette connaissance est également bénéfique à l'Homme (optimisation du bien-être de l'enfant, né à terme ou prématuré).

Le projet que nous portons concerne une espèce modèle particulièrement intéressante sur le plan olfactif, le lapin. Le lapereau répond en effet dès la naissance à des odeurs émises par la mère qui l'aident à s'orienter vers elle, à localiser très rapidement les tétines et à téter. Il répond notamment à une phéromone émise par toute lapine dans son lait: la phéromone mammaire (PM). La PM est un outil exceptionnel pour la recherche (seule phéromone connue à ce jour pour contribuer à la relation mère-jeunes chez les mammifères) car elle déclenche de façon immédiate et spontanée (sans apprentissage préalable) le comportement de recherche-prise en bouche des tétines, clairement observable et quantifiable, du lapereau. En nature, elle n'est jamais perçue seule, mais au milieu d'autres odorants présents avec elle dans le lait ou sur le corps de la lapine, donc dans des contextes chimiques de mélanges de plusieurs odorants. De façon spectaculaire, elle permet par ailleurs au nouveau-né d'apprendre très rapidement (après une seule et très brève association) de nouvelles odeurs. Alors que nous étudions la PM et le modèle lapin sous différents angles depuis plus de 20 ans (interaction mère-jeunes, identification chimique des signaux pertinents, modulation des actions de la PM selon l'état prandial et l'âge du jeune animal, traitement cérébral, apprentissage d'odorants simples ou de mélanges, conséquences de ces apprentissages sur les préférences sociales et alimentaires...), l'objectif ici est de poursuivre certaines de nos volets d'études, complémentaires, afin de mieux connaître les mécanismes de perception et de mémoire qui sous-tendent les comportements guidés par les odeurs chez le nouveau-né. Pour cela, notre positionnement se situe à trois niveaux de traitement: la respiration et le flairage associé, qui permettent d'échantillonner les odeurs, la cavité nasale (muqueuse olfactive) site d'entrée et de début de leur traitement, et le comportement (attraction/évitement, tétée) exprimé ou non suite à la perception des odeurs. Nous comparerons ces processus entre des animaux naïfs et des animaux ayant appris une odeur grâce à la PM, et étudierons si ces processus changent au cours des premiers jours/premières semaines de vie postnatale.

Toutes les mesures envisagées ici seront effectuées selon des procédures standardisées.

Le comportement sera évalué en termes d'orientation spatiale et d'expression de comportements précis (mouvements de tête et de bouche impliqués dans la localisation des tétines/la tétée) comme déjà décrit dans la littérature. La respiration sera mesurée de façon non invasive dans une cage dévouée dans laquelle l'animal se déplace sans contrainte. Enfin, l'enregistrement de réponses électrophysiologiques au niveau de la muqueuse olfactive impliquera une procédure plus invasive (mais déjà établie, décrite et validée) nécessitant le prélèvement de cette muqueuse.

Dans tous les cas, les effectifs requis d'animaux seront réduits au minimum par groupes, tout en restant compatible avec l'analyse statistique et l'interprétation fiable des résultats. Au total, les travaux évoqués ici impliqueront 440 lapereaux par an provenant de 80 portées, soit environ 2200 animaux sur l'ensemble de la période concernée, longue (5 ans).

Notons que, comme la lapine ne vient de façon naturelle au contact de sa portée qu'une seule et brève fois par jour (5 min) pour allaiter (comportement conservé par la femelle domestique), la manipulation des lapereaux en dehors de l'allaitement n'engendre pas de stress lié à la séparation du jeune et de la mère. Par ailleurs, les présents travaux ne conduiront jamais à retirer une portée

entière à une lapine, donc n'engendreront chez elle pas de stress lié à l'absence soudaine des jeunes et à l'arrêt de la lactation.

17602 Les myopathies centronucléaires sont des maladies génétiques qui causent des faiblesses musculaires, une force diminuée et des difficultés respiratoires. Ces symptômes peuvent apparaître dès la plus jeune enfance et ce jusqu'à l'âge adulte à des degrés de sévérités variables; cette variabilité est encore mal comprise et est toujours en cours d'investigation. Les myopathies centronucléaires peuvent être causées par différentes mutations génétiques mais les mécanismes qui relient ces mutations aux symptômes sont encore mal connus. Au sein de notre équipe, nous possédons déjà quelques modèles souris mimiquant une forme légère et une forme grave de ces myopathies; cependant, beaucoup d'aspects des mécanismes et de la progression de la maladie restent à élucider malgré les avancées obtenues. Dans cet objectif, l'étude d'un modèle souris porteur d'une mutation responsable d'un phénotype intermédiaire pour ces myopathies centronucléaires a été généré. Le premier objectif de ce projet est donc d'évaluer si ce modèle souris reproduit fidèlement cette forme de la maladie. Le deuxième objectif de ce projet sera de proposer une approche thérapeutique pour ce modèle souris. Le but ultime de ce projet sera de proposer et de fournir des informations et des données sur cette maladie afin de pouvoir les prendre en considération pour une éventuelle thérapie dans des essais cliniques sur les patients.

Seul le modèle animal (souris) permettra d'étudier d'une part la physiologie et d'autre part l'amélioration des symptômes de la maladie (REPLACEMENT)

Afin de réduire le nombre d'animaux nécessaires à l'étude, plusieurs procédures expérimentales seront réalisées sur une même souris. Le nombre d'animaux sera réduit au maximum pour obtenir une puissance statistique suffisante; un nombre maximum de 10 souris par groupe seront nécessaires (REDUCTION)

Les myopathies sont des maladies qui affectent les muscles, pouvant entraîner diverses difficultés; afin de s'assurer que les animaux ne souffrent pas, ils seront surveillés quotidiennement. En cas de difficulté de déplacement dans la cage, de la nourriture gélatinifiée sera rajoutée dans la cage pour permettre à la souris de se nourrir correctement. Les souris seront anesthésiées pour la plupart des PE afin d'éviter toute souffrance. Nous utiliserons aussi de l'ocrygel pour la PE3 afin d'éviter tout inconfort des yeux ainsi qu'un tapis chauffant pour éviter tout inconfort au réveil après l'anesthésie. Tout signe de douleur sera pris en charge en prenant les mesures appropriées en fonction du niveau de douleur observé (soit un analgésique sera administré, soit les animaux seront euthanasiés prématurément si nécessaire) (RAFFINEMENT).

Pour cette étude, 159 souris seront nécessaires.

17603 La dénutrition, la perte de poids et l'atrophie musculaire (cachexie) sont des indices de pronostic létal chez les patients atteints de cancers. Ils sont causés notamment par les traitements anticancéreux, radio-thérapies et chimio-thérapies, qui ont pour effet secondaire général nausées et vomissements, qui réduisent chroniquement la prise alimentaire.

Le présent projet explore une nouvelle piste pour traiter la dénutrition et la perte de poids liées à la plupart des cancers. L'objectif est d'améliorer la qualité et l'espérance de vie des patients, selon une démarche préclinique chez la souris adulte comme modèle animal. Ce projet s'intéresse au rôle physiologique des cellules-souches neurales du complexe vagal dorsal du cerveau postérieur (CVD) dans la régulation du comportement alimentaire et l'activité orexigène de la ghréline chez le mammifère adulte. Il met en jeu des approches intégrées sur animal entier et des explorations fonctionnelles sur animal vigile qui ne peuvent pas être remplacées par des approches in vitro.

Nous testerons le rôle d'une nouvelle niche de cellules-souches neurales du cerveau adulte, dans la stimulation de l'appétit. La régulation de la prise alimentaire et du poids corporel chez les mammifères adultes repose sur 2 centres cérébraux: le complexe vagal dorsal et l'hypothalamus. Le foyer de cellules souches que nous étudions est localisé dans le centre nerveux du réflexe de la satiété et du vomissement: le complexe vagal dorsal du cerveau postérieur (CVD), et plus précisément l'area postrema (AP). L'objectif du projet consiste à caractériser l'action in vivo de la

ghréline, une hormone qui stimule fortement la prise alimentaire, comme médicament anti-cachexie. L'action de la ghréline sera testée suivant une irradiation de type radiothérapie anti-cancéreuse qui sera focalisée et restreinte sur le foyer de cellules souches du CVD.

Dans ce projet, nous évaluerons chez la souris adulte, avec ou sans ablation préalable des cellules souches neurales de notre région d'intérêt par irradiation in vivo, l'effet du traitement chronique par une molécule de synthèse qui mime les effets de la ghréline. Les effets thérapeutiques attendus seront i) la stimulation du comportement alimentaire et de la croissance pondérale des souris par la ghréline, ii) la formation de nouvelles cellules souches neurales (neurogénèse) dans la région étudiée mesurée par immunohistochimie post-mortem, chez les souris non irradiées, uniquement.

Notre stratégie maximise la probabilité d'obtenir des résultats positifs, tout en réduisant le nombre d'animaux expérimentaux à son minimum (réduction). D'autre part, les approches utilisent les derniers développements technologiques (notamment de lésion intracérébrale ciblée) pour réaliser des explorations fonctionnelles dans les conditions les moins invasives et les moins stressantes et limiter toute douleur (raffinement). Le nombre total de souris dans ce projet est de 160 et le nombre d'années est de 5 ans.

Afin de respecter la règle des 3R, le nombre de souris utilisées par expérience sera réduit au minimum permettant de déterminer de manière fiable, robuste et statistique l'effet thérapeutique des approches proposées (Réduction). De plus, des expériences in vitro compléteront les manipulations in vivo afin de mieux comprendre le mode d'action des composés utilisés quand cela est possible (Remplacement). Une attention particulière sera portée au respect du bien-être animal par le respect des conditions d'hébergement en accord avec la réglementation et par un suivi pluri-hebdomadaire des souris basé sur des points limites définis, entraînant si nécessaire, la mise à mort anticipée de l'animal (Raffinement).

A terme, les résultats de ce projet permettront d'établir le potentiel thérapeutique de médicaments qui pourraient être appliqués en clinique pour le traitement des patients cancéreux.

17604 L'accident de décompression (ADD) est un syndrome systémique survenant suite à la formation de bulles dans la circulation sanguine ou dans les tissus lors d'une réduction rapide de la pression environnementale. L'ADD est le syndrome le plus grave pouvant atteindre un plongeur subaquatique mais il peut également survenir chez des personnes exposées à des changements de pression ambiante comme les pilotes de hautes altitudes, les personnes travaillant en caisson hyperbare, les astronautes, les tunneliers... L'ADD se manifeste au travers d'une grande variété de symptômes pouvant aller d'un malaise général accompagné de douleurs et de symptômes cutanés à des accidents très graves avec des atteintes neurologiques, cardio-respiratoires pouvant conduire au décès.

Il est aujourd'hui admis que la formation de bulles d'air dans la circulation sanguine et dans les tissus est un facteur déclenchant de l'ADD. Les protocoles de décompression, qui sont utilisés en plongée, ont pour but de faire baisser cette formation de bulles en obligeant le plongeur à faire des paliers de décompression afin de permettre l'élimination des gaz accumulés. Toutefois, une partie non négligeable des ADD surviennent même lorsque toutes les procédures de décompression ont été respectées ce qui montre la nécessité de perfectionner davantage les protocoles de décompression.

Il est également bien reconnu qu'il existe une variabilité dans la susceptibilité à l'ADD et que seulement 13% de cette variabilité peut s'expliquer par la formation de bulles intravasculaires. L'apparition d'un ADD ne peut donc pas être expliquée uniquement par l'apparition de bulles dans l'organisme mais il semble y avoir d'autres mécanismes qui modulent la capacité de l'organisme à gérer ces corps étrangers. En utilisant un modèle murin, notre équipe a réalisé un programme d'élevage sélectif des individus résistants qui a permis la création d'une lignée résistante à l'ADD. Cette lignée est un très bon modèle pour l'étude des mécanismes de résistance à l'ADD.

L'objectif de ce projet est (i) : d'étudier la réponse de l'organisme suite à l'injection de microbulles d'air dans la circulation sanguine et (ii) : d'identifier les différences de réponse entre des rats résistants et non résistants afin de caractériser certains mécanismes de résistance.

Dans ce but, nous allons injecter, chez des rats anesthésiés, une solution saline (injectable à usage vétérinaire) contenant des microbulles d'air dans la circulation veineuse. Nous allons utiliser des rats résistants et non résistants à l'ADD. Suite à l'injection, nous réaliserons des prélèvements sanguins puis les animaux seront mis à mort et des analyses physiologiques seront réalisées. Ces analyses permettront de mieux comprendre l'impact des bulles sur l'organisme et d'étudier les différences entre les individus résistants et non résistants.

Pour ce projet, 26 rats (13 mâles et 13 femelles) de la lignée résistante à l'ADD ainsi que 26 rats (13 mâles et 13 femelles) de lignée « sauvage » seront utilisés soit au total 52 animaux.

Conformément à la règle des 3R,

- Remplacement : le remplacement n'est pas possible ici car notre objectif est d'étudier la réaction systémique de l'organisme face aux microbulles vasculaires.
- Réduction : sur la base d'études antérieures, le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum pour nous permettre d'avoir des résultats statistiques fiables.
- Raffinement : Les rats sont hébergés selon les normes de soins et d'hébergement (article R. 214-95 du code rural et de la pêche maritime). Ils sont disposés dans des cages réglementaires enrichies de tunnel en plexiglas. Ils observent une phase d'acclimatation de cinq jours minimum avant d'entrer dans une procédure et sont observés quotidiennement pour réduire le plus possible la douleur et/ou l'angoisse des animaux. Lorsque cela est nécessaire, des points limites ont été définis. De plus, les animaux seront anesthésiés/analgésés afin de limiter au maximum l'angoisse et la souffrance.

17605 Les tumeurs cérébrales gliales, ou gliomes, sont les tumeurs primitives les plus fréquentes du système nerveux central représentant la 3ème cause de mortalité chez les jeunes adultes. Des données épidémiologiques estiment que le nombre de cas de glioblastome, un gliome de haut grade très invasif, enregistré en France est de 3,34/100 000 adultes chaque année. Avec aucun traitement vraiment efficace, la médiane de survie est estimée à 14,6 mois après chirurgie puis traitement combiné (radiothérapie et chimiothérapie). Malgré l'arsenal thérapeutique potentiellement disponible, la survie des patients atteints de GB n'est pas significativement améliorée, les défis à relever pour améliorer cette survie et la qualité de vie des patients restent énormes. Une des causes de ces récurrences et échecs thérapeutiques, est que les cellules de GB sont extrêmement invasives et au moment du diagnostic et de la résection, de nombreuses cellules tumorales ont déjà infiltré le tissu cérébral sain. Ces cellules de GB expriment en effet des récepteurs qui sont activés par des chimiokines, capables de stimuler la migration et la résistance des GB aux traitements.

Comme il existe plusieurs types de récepteurs de chimiokines qui exercent les mêmes fonctions dans les GB, notre hypothèse porte plutôt sur des molécules de signalisation activées par ces récepteurs et qui contrôlent la migration cellulaire.

Pour vérifier leurs rôles, 3 lignées de GB seront modifiées pour diminuer ou augmenter l'expression de ces protéines de signalisation avant greffage intracérébral et évaluation de ces cellules, ou bien des petits peptides thérapeutiques ciblant ces protéines de signalisation seront testés sur la croissance tumorale après injection sanguine. Dans ce contexte, la croissance tumorale et la survie des animaux seront évalués. Cinq conditions différentes seront étudiées par lignée cellulaire. L'impact de la présence d'une tumeur cérébrale sera évalué lorsque la lignée sera i) modifiée ou non de manière génétique et par une construction plasmidique contrôlée, par des plasmides qui ciblent deux types protéines signalisantes différentes. Un peptidomimétique ciblant l'une des deux protéines signalisantes sera testé par voie intraveineuse. Ces 5 conditions seront évaluées sur 3 modèles de GB humains xenogreffés chez la souris, des modèles plus ou moins angiogéniques et invasifs.

Les cerveaux de ces souris seront prélevés et permettront d'étudier le caractère agressif de la tumeur, la croissance tumorale, le niveau de mort cellulaire ou de vascularisation tumorale quand les souris seront prélevées 15 jours à 3 semaines après implantation. Dans une 2ème série expérimentale, c'est la survie globale des animaux qui sera mesurée et correspondra au moment où apparaît un signe de souffrance (par exemple : perte de poids de plus de 15%, comportement anormal, ...). A l'apparition de l'un de ces signes, les souris seront mises à mort et leur cerveau

sera récupéré pour des études neurobiologiques. Et pour chaque étude, 3 lots de 10 cerveaux par lignée cellulaire et par condition seront nécessaires pour réaliser des études neurobiologiques sur coupes de cerveau ou cerveau entier. Un lot servira à des marquages sur coupes de cerveau, et 2 lots pour des marquages sur cerveau entier. Un total de 2700 animaux sera donc utilisé. La règle des 3R sera respectée. Le modèle murin est indispensable afin de pouvoir travailler sur une tumeur dont la croissance dépend de l'environnement cérébral. Pour l'injection des cellules, les souris seront anesthésiées. Une prise en charge de la douleur potentielle sera systématiquement effectuée. Un suivi bi-quotidien (dans les 48h post-chirurgie) puis quotidien sera effectué par du personnel formé et expérimenté et permettra de détecter l'apparition d'un éventuel signe de souffrance. L'ensemble des conditions d'hébergement des animaux (cages, enrichissement et environnement) sera conforme à la réglementation. La mise à mort des souris permettant le prélèvement des échantillons biologiques sera réalisée après anesthésie et en accord avec le cadre réglementaire.

17606 En raison de l'essor des nanotechnologies, une utilisation croissante de nanomatériaux dans des procédés industriels est observée. Cependant, les connaissances de leur toxicité, notamment leur capacité à induire des cancers, sont insuffisantes pour statuer sur le risque pour la santé des salariés exposés à ces substances. L'inhalation est la voie majeure d'exposition des salariés aux nanomatériaux et leur dépôt au niveau pulmonaire peut être à l'origine de pathologies. Ainsi l'évaluation du danger que représente de telles substances nécessite des études toxicologiques par inhalation chez le rat de laboratoire. L'utilisation de rats génétiquement modifiés représente un modèle alternatif au modèle expérimental de référence pour l'évaluation du potentiel cancérigène d'une substance. L'exposition de rats par inhalation permet un dépôt des particules dans l'ensemble de l'appareil respiratoire constituant ainsi un modèle de choix pour l'extrapolation des résultats à l'homme. Le développement de cancer est un processus long, par conséquent les animaux seront exposés par inhalation oro-nasale pendant 13 semaines puis suivis pendant 6 mois. Les points limites associés à ce type d'étude comprennent une perte de 20% du poids corporel, l'apparition d'une détresse respiratoire, de signes de souffrance (prostration, piloérection) et de lésions cutanées. Une attention particulière sera portée sur l'apparition de tumeurs avec une mise à mort des animaux dès leur détection. Cependant des points limites spécifiques s'appliqueront si nécessaire : une masse tumorale visible de 25 mm, des tumeurs internes palpables ou qui interfèrent avec la capacité de l'animal à se nourrir, s'hydrater et se déplacer ou qui induisent des vocalisations anormales, une distension abdominale supérieure à 20% par rapport au groupe témoin. Lors de la rédaction de ce projet, le respect de la règle des 3R a été pris en compte. Le principe de Remplacement est difficilement applicable au vu de la complexité des mécanismes physiologiques considérés dans le développement de tumeur. Le principe de Réduction est appliqué au travers de la sensibilité du modèle pour le développement de tumeur et qui requière l'usage d'un nombre réduit d'animaux par rapport au test conventionnel. Le principe de Raffinement est mis en œuvre en limitant au maximum le stress des animaux à la contention en les habituant préalablement à cette contrainte. Un total de 467 rats génétiquement modifiés et 394 rats «génétiquement normaux» Sprague Dawley femelles de 12 semaines sera nécessaire à l'ensemble du projet.

17607 La paraplégie spastique héréditaire (HSP) de type SPG11 est une forme précoce et très sévère d'affection neurologique se traduisant par une atteinte de la motricité des membres inférieurs et une atteinte mentale variablement associée à une atteinte cérébelleuse et du système nerveux périphérique. Des mutations de type perte de fonction ont été trouvées chez les patients dans le gène SPG11/KIAA1840 et rendent compte de 20% des cas de paraplégies spastiques transmises selon un mode autosomique récessif. A ce jour, aucun traitement effectif n'a encore été développé pour cette maladie. Nous souhaitons confirmer la preuve de concept, permettant de ralentir ou inverser le processus pathologique de cette maladie, de notre collaborateur via l'utilisation et l'étude des effets et de l'efficacité de nouvelles petites molécules dans un modèle de souris mimant la HSP de type SPG11. Ces nouvelles petites molécules sont actuellement soumises à des essais cliniques

pour d'autres pathologies et seraient donc rapidement disponibles pour les patients HSP si les essais sont approuvés.

REMPACEMENT : Nous voulons tester l'efficacité de petites molécules permettant l'amélioration du phénotype d'un modèle murin de la paraplégie spastique familiale. Les effets de cette étude ne peuvent être observés que sur un organisme vivant car ils dépendent du métabolisme d'un organisme complet. En effet, ces molécules sont d'abord assimilées par l'organisme suite à une prise orale et sont ensuite dirigées vers leur cible thérapeutique. C'est pourquoi nous utiliserons des souris. Aucune autre alternative n'existe.

REDUCTION: Nous avons sélectionnés un nombre minimal de molécules (3) et un nombre minimal de doses à tester (2) car d'autres études ont déjà été effectuées avec ces molécules pour d'autres applications thérapeutiques, les doses ayant démontré une efficacité sur leur cible sont donc déjà établies. Un nombre de 16 souris par groupe sera utilisé selon les procédures afin de garantir la validité scientifique de l'étude. Un nombre maximum de 112 souris sera utilisé pour l'ensemble du projet.

RAFFINEMENT : Afin d'améliorer le bien-être animal tout au long de sa vie, les conditions d'élevage et d'hébergement seront optimisées par un enrichissement dans toutes les cages (coton et frisure pour faire un nid, tunnel en cartons pour se réfugier, bâtons à ronger). Au cours de l'étude, tout signe d'inconfort sera pris en charge en prenant les mesures appropriées en fonction du niveau observé, limitant ainsi la souffrance à l'animal. Des points limites prédictifs seront établis permettant d'interrompre l'étude limitant ainsi la souffrance, la douleur et le stress pour l'animal.

17608 La progression des leucémies est associée à la perméabilité vasculaire dans la moelle osseuse. Néanmoins, il reste inconnu si l'efficacité de certains médicaments tels que le Dasatinib ou le Vorinostat dans le traitement des leucémies, passe par une amélioration de l'intégrité vasculaire. Nous avons trouvé in vitro qu'une dérégulation de la fonction de l'intégrine beta-1 impacte la perméabilité vasculaire. De plus nous avons trouvé que le Dasatinib influence la distribution de l'intégrine beta-1 et inhibe la perméabilité endothéliale induite par la cytokine inflammatoire TNF α in vitro. Nous avons trouvé qu'une modification post-traductionnelle de l'acétylation de l'intégrine beta-1 influence la perméabilité endothéliale.

Dans ce projet nous voulons étudier l'impact de certains traitements de la leucémie sur la perméabilité vasculaire chez la souris immunodéprimée NSG. Nous voulons transplanter ces souris avec des cellules humaines de leucémie aigüe lymphoblastique-B. Puis nous voulons traiter les souris transplantées avec des médicaments connus comme le Dasatinib, le Vorinostat et y ajouter des peptides mimétiques de l'acétylation de l'intégrine beta-1 afin d'évaluer également cette piste.

Ce protocole nécessite l'utilisation de 255 souris NSG. Il est conçu dans le respect de la règle des 3R. En effet, pour étudier la perméabilité vasculaire, nous n'avons d'autre choix que de faire ces expériences chez les animaux immunodéprimés. Il n'y a donc pas d'autres méthodes de remplacement adéquates in vitro. Le modèle utilisé dans cette étude est bien connu et maîtrisé au sein du laboratoire. Néanmoins, afin de réduire l'utilisation d'animaux, plusieurs conditions de traitements partagent les mêmes groupes contrôles. De même le choix de souris uniquement males permet de réduire la variabilité dans les résultats et ainsi l'utilisation inutile d'animaux supplémentaires. Par ailleurs nous avons pris de nombreuses dispositions afin de supprimer toute éventuelle douleur en suivant minutieusement les souris et en utilisant des analgésiques pendant l'hébergement des animaux suivant le protocole décrit. Pour le confort des animaux, ils sont hébergés 4 par cage. Les résultats de ce projet pourraient permettre de dégager de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le traitement des leucémies aiguës lymphoblastiques B qui seront basées sur le ciblage de la perméabilité vasculaire.

17609 Les infections bactériennes pulmonaires sont responsables de nombreuses pathologies associées à une mortalité majeure. Parmi ces infections, on peut citer la tuberculose (TB) qui est causée par inhalation de la bactérie *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) et qui est l'une des trois pathologies infectieuses à agent étiologique unique les plus meurtrières. On retrouve également des pathologies nosocomiales auxquelles sont associées de nombreux pathogènes dont *Pseudomonas aeruginosa*,

Klebsiella pneumoniae ou *Streptococcus pneumoniae*. La recherche de nouvelles cibles thérapeutiques (sur l'hôte ou la bactérie elle-même) et de nouveaux vaccins plus efficaces que les vaccins actuels (e. g. le BCG pour la TB) est primordiale afin de lutter contre la pathologie. Notre équipe contribue à ces axes de recherche en étudiant les mécanismes d'interaction entre ces bactéries pathogènes et l'immunité de l'hôte, ce qui implique l'utilisation de modèles cellulaires et animaux. Les macrophages alvéolaires jouent un rôle primordial dans la détection des pathogènes pulmonaires, dans la destruction de ces derniers, et dans le recrutement des cellules de l'immunité innée et adaptative. Notre travail a actuellement pour but de disséquer les mécanismes moléculaires régulant les fonctions effectrices des macrophages lors d'infections bactériennes pulmonaires. En particulier, nous étudions le rôle des sucres complexes (ou glycannes) dans la modulation de la réponse des macrophages à l'encontre des bactéries. Avant les études *in vivo* proposées ici, nous avons réalisé plusieurs expériences *in vitro* qui ont démontré que les macrophages humains et murins ont de l'acide polysialique (PolySia), synthétisé par la glycosyltransférase ST8SIA4, à leur surface et sécrètent le PolySia dans le milieu de culture après détection d'une bactérie pathogène. Cependant, l'absence de ST8SIA4 et de PolySia n'a aucun impact sur la réponse antimicrobienne des macrophages (mesure de la survie des bactéries, production des cytokines et du stress oxydative). En plus des macrophages, nous avons observé que d'autres cellules de l'immunité innée (eosinophiles, neutrophiles) expriment également ST8SIA4 et portent le PolySia à leurs surfaces. Nous soupçonnons donc que le PolySia participe au dialogue entre ces cellules immunitaires et/ou avec les cellules du microenvironnement tissulaire. Cette hypothèse ne peut être testée qu'en réalisant des expériences dans un modèle murin (souris déficientes ou non pour l'expression de ST8SIA4) reproduisant, notamment au niveau immunologique, de nombreuses observations faites chez l'homme.

En utilisant différentes lignées de souris (incluant des souris déficientes pour l'expression de ST8SIA4), nous souhaitons déterminer *in vivo* l'impact de ST8SIA4 et du PolySia sur la régulation de l'immunité pulmonaire au cours d'une inflammation, induite par des cytokines pro-inflammatoires et au cours d'une infection par des bactéries pathogènes pulmonaires (*Mtb*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* ou *Streptococcus pneumoniae*). Dans l'ensemble de ces études, les animaux stimulés/infectés seront utilisés pour déterminer des paramètres de sensibilité à l'infection (survie, charges bactériennes, histologie) ainsi que des paramètres immunologiques (moléculaires et cellulaires).

Le nombre maximal d'animaux utilisé sera de 6660 souris se répartissant 2258 souris C57BL/6 (CD45. 2), 53 C57BL/6 CD45. 1, 2309 souris C57BL/6 *St8sia4*-KO, 1020 souris RAG2-KO et 1020 souris RAG2/ST8SIA4-DKO. Afin de s'inscrire dans la logique des 3R, nous avons intégré 4 étapes dans notre raisonnement. Tout d'abord, les expériences réalisées font suite à des étapes de validation dans des modèles cellulaires : ainsi les expériences proposées sont réalisées au stade où les méthodes de remplacement de l'expérimentation animale ont été exploitées et s'avèrent suffisamment prometteuses pour utiliser le modèle intégré murin. Ensuite, certaines étapes de nos projets (clairement identifiées dans les procédures détaillées) pourront être suivies de décisions de poursuite ou d'arrêt de l'étude en fonction des promesses offertes par les résultats. De plus, nous avons développé des approches expérimentales permettant d'analyser sur un même lot d'animaux, des paramètres qui étaient avant mesurés sur des lots d'animaux séparés (exemple : préparation d'ARN, cytométrie de flux et charges bactériennes peuvent maintenant être réalisées sur le même échantillon). Finalement, l'expérience des années précédentes nous a fourni des indications sur la taille des lots d'animaux à respecter pour obtenir en première intention des résultats statistiquement significatifs. La souffrance et/ou le stress animal sont présents à trois niveaux dans nos expériences : i) lors de l'induction de l'inflammation pulmonaire (infection ou introduction de molécules) (sous anesthésie) ; ii) lors de l'inflammation pulmonaire induite par l'infection ; iii) lors de l'administration d'agent pharmacologiques (sous anesthésie). Ces trois niveaux de douleurs font l'objet d'une prise en charge spécifique indiquée dans les procédures respectives et déjà appliquées dans nos projets antérieurs.

17610 Les pathologies neurodégénératives sont une cause importante de mortalité et de morbidité. Pour la majorité d'entre elles, il n'existe pas de traitement efficace à l'heure actuelle. Une meilleure connaissance des mécanismes cellulaires et moléculaires qui se produisent dans le cerveau au cours de ces pathologies permettrait de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques et d'envisager le développement de nouveaux traitements.

Un point commun à de nombreuses maladies neurodégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la maladie de Huntington, sont des altérations des mitochondries. Ces organites cellulaires ont notamment le rôle essentiel de fournir l'énergie aux cellules nerveuses pour leur fonctionnement normal. Pour assurer cette fonction, les mitochondries ont besoin de fer qui cependant devient délétère lorsqu'il est en excès et peut mener à la mort des cellules. Des études en IRMf (IRM fonctionnelle) ont montré l'accumulation de fer dans les cerveaux de patients atteints de l'une des trois pathologies neurodégénératives pré-citées. D'où l'importance de comprendre comment la quantité de fer est régulée dans les cellules et les mitochondries, et d'identifier les causes des anomalies mitochondriales et de l'accumulation de fer. A ce jour, une nouvelle famille de protéines de la mitochondrie, les sidéroxines (SFXN), a été identifiée. Les quelques études qui ont été consacrées à ces protéines suggèrent leur rôle de transporteur de fer.

Le but de ce projet sera donc :

1/ d'étudier le rôle physiologique des sidéroxines 1 et 5 (SFXN1 et SFXN5) au niveau de la mitochondrie et des cellules nerveuses en passant par des approches de sur-expression et de sous-expression de cette protéine.

2/ d'étudier le rôle de SFXN1 et SFXN5 dans les maladies d'Alzheimer et de Parkinson en vérifiant si elles modulent la mortalité neuronale et les voies de signalisation de la mitochondrie et du métabolisme du fer.

Le recours à l'animal reste indispensable pour notre projet car aucun système cellulaire ou milieu de culture ne permet aujourd'hui de reproduire la complexité moléculaire des cellules du cerveau et les interactions entre types cellulaires du cerveau (neurones, astrocytes, microglie, vaisseaux).

Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet sont des modèles rongeurs. Ils proviennent d'élevages agréés et de notre élevage interne. Nous prévoyons d'utiliser 2445 animaux lors des expériences qui seront menées pendant les 5 années de l'étude. Leur nombre dans chacun des groupes expérimentaux sera réduit au minimum nécessaire permettant une interprétation statistique fiable des résultats (18 par groupe dont 12 souris pour l'histologie et 6 souris pour la biochimie et la transcriptomique). Nous utiliserons dans cette étude des modèles rongeurs de maladie de Parkinson et d'Alzheimer. La modulation de l'expression des protéines SFXN1 et SFXN5 sera réalisée par injection de virus dans le cerveau par chirurgie stéréotaxique. Ainsi, nous aurons 6 groupes expérimentaux pour étudier la sous- ou sur-expression de SFXN1 et SFXN5 (groupe 1 = des rongeurs sauvages, groupe 2 = des rongeurs modèles de la maladie d'Alzheimer avec de la protéine Tau soluble, groupe 3 = des rongeurs modèles de la maladie d'Alzheimer avec de la protéine Tau agrégée, groupe 4 = rongeur pour la mise au point des coordonnées d'injection des virus pour modéliser la maladie de Parkinson, groupe 5 = des rongeurs modèles de la maladie de Parkinson, groupe 6 = des rongeurs transgéniques modèles de la maladie d'Alzheimer avec la protéine bêta-amyloïde agrégée). Toutes les interventions chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale avec une prise en charge de la douleur péri et post-opératoire définie lors de la première procédure, et approuvée par une équipe vétérinaire. Les rongeurs seront étudiés grâce à des tests comportementaux indolores et non-invasifs puis des analyses histologiques ou biochimiques/transcriptomiques effectuées post-mortem. Nous réduirons le nombre d'animaux utilisés en effectuant des injections bilatérales et en couplant les tests comportementaux et de biochimie/transcriptomique ou d'histologie sur les mêmes cohortes d'animaux.

L'application de critères d'arrêts et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe et dans un milieu enrichi permettent de garantir le bien-être des animaux. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

17611 Le syndrome de Galloway-Mowat est une maladie génétique extrêmement rare qui associe une atteinte rénale (syndrome néphrotique) et une atteinte du système nerveux central avec la présence constante d'une microcéphalie (crâne de petite taille) et d'anomalies cérébrales. Aucun traitement ne guérit le syndrome de Galloway-Mowat qui peut, dans certains cas, entraîner la mort à un jeune âge. Cette maladie est très hétérogène sur le plan clinique et sur le plan génétique avec 10 gènes identifiés à ce jour.

Les données actuelles montrent des altérations au niveau des cellules progénitrices du cerveau, mais nous voulons comprendre plus précisément les mécanismes moléculaires et cellulaires altérés dans cette pathologie.

Pour cela nous allons utiliser une technique de chirurgie permettant de modifier génétiquement une partie des cellules progénitrices du cerveau au cours du développement chez la souris. A l'heure actuelle, il n'existe pas de méthode de remplacement permettant de reproduire in vitro la complexité du cortex en développement, ce qui rend l'utilisation d'un modèle animal indispensable à la réalisation de ce projet. De plus, le cerveau de ces animaux se forme de manière très similaire aux autres mammifères ce qui en fait un très bon modèle d'étude.

Durant les 2 années que va durer ce projet nous allons utiliser au total 36 femelles gestantes et 216 embryons.

L'utilisation de l'expérimentation animale pour nos travaux est rendue nécessaire par la complexité de l'environnement cortical qui ne peut pas être recréée par des approches in vitro. Toutefois, ce travail est organisé au maximum dans le respect de la règle des «3R » (remplacer, réduire, raffiner).

Remplacer : tous les tests de mise au point des constructions utilisées seront effectués sur des modèles cellulaires in vitro.

Réduire : nous diminuerons au maximum le nombre d'animaux expérimentés tout en atteignant la significativité statistique.

Raffiner : nous veillerons en continu au bien-être des animaux par l'utilisation d'analgésiques et d'anesthésiques lors de la procédure opératoire et par un enrichissement de leur environnement dans les cages d'hébergement. Une grille de suivi contenant des points limites détaillés sera mise en place et permettra un suivi quotidien attentif des animaux après la chirurgie. L'atteinte d'un ou de plusieurs points limites entrainera l'euthanasie des animaux concernés.

À terme, les résultats de ces travaux nous permettront de mieux comprendre les défauts à l'origine du développement de l'atteinte cérébrale dans le syndrome de Galloway-Mowat, et ainsi de développer de nouveaux médicaments ciblant les voies mises en cause, afin de prévenir ou de freiner le développement de la maladie.

17612 La méningite cérébro-spinale et le purpura fulminans sont des infections bactériennes sévères et à évolution rapide qui touchent principalement les enfants de 0 à 4 ans et les adolescents. La bactérie responsable de ces infections a la particularité de coloniser les vaisseaux sanguins lorsqu'elle provoque une infection invasive. La mortalité approche 100 % en l'absence de prise en charge médicale. En France, malgré une prise en charge médicale, le taux de mortalité reste élevé : 3% pour les cas de méningite et 30% pour les cas de purpura fulminans qui se traduit par des plaques hémorragiques cutanées et un choc septique foudroyant. De plus, même en cas d'évolution non fatale, les séquelles sont fréquentes et graves (séquelles neurologiques, amputations, qui handicaperont leur vie durant les bébés et jeunes touchés).

Le but de ce projet est d'étudier les mécanismes de l'interaction entre la bactérie responsable de la méningite cérébrospinale et du purpura fulminans et les vaisseaux sanguins humains afin de mieux comprendre la physiopathologie de cette maladie et de tester de nouvelles stratégies thérapeutiques. Le purpura fulminans est un syndrome infectieux très sévère, qui associe une septicémie à des lésions tissulaires nécrotiques disséminées sur la peau et les organes internes. Ces infections sont complexes et impliquent plusieurs organes et systèmes physiologiques à l'échelle de l'organisme (cellules endothéliales, circulation sanguine, coagulation, système immunitaire...), c'est pourquoi notre étude nécessite le recours à un modèle animal qu'il est impossible de remplacer par les modèles in vitro existants. La bactérie responsable de ces

infections n'interagit qu'avec les vaisseaux sanguins humains, nous utiliserons donc une lignée de souris humanisées avec de la peau humaine (modèle mimant le purpura fulminans). Différentes souches de bactéries (sauvages et mutantes) seront utilisées afin de déterminer l'importance de différents facteurs de virulence. Nous analyserons le rôle des cellules du système immunitaire (neutrophiles, cellules Natural Killer) par déplétion. Nous chercherons également à valider in vivo les effets d'agents pharmacologiques préalablement validés in vitro sur cellules endothéliales.

Les procédures appliquées aux animaux seront les suivantes :

Les souris seront greffées avec de la peau humaine.

Après la prise de greffe, elles seront infectées avec la souche sauvage ou différents mutants bactériens afin de déterminer l'importance de différents facteurs de virulence.

Certaines souris seront traitées avec des agents pharmacologiques identifiés comme étant potentiellement curatifs. D'autres subiront une déplétion de cellules immunitaires.

Nous analyserons l'évolution de la bactériémie en réalisant des prélèvements sanguins.

Entre 4 et 72 heures après l'infection, les souris seront euthanasiées pour prélever le greffon et étudier les lésions tissulaires.

Pour analyser l'effet de mutants bactériens et agents pharmacologiques sur le sepsis, des animaux non greffés seront utilisés.

Ce projet nécessitera l'utilisation de 650 souris et se déroulera sur 5 ans.

Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum permettant de répondre aux questions scientifiques de ce projet, nous avons estimé la taille des échantillons permettant une analyse statistique efficace des résultats grâce aux données collectées au cours d'expériences précédentes. Les animaux bénéficieront d'une surveillance quotidienne durant les procédures expérimentales et les actes invasifs seront réalisés sous anesthésie générale. Afin de réduire leur souffrance et leur stress, des mesures antalgiques médicamenteuses sont prévues pour toutes les procédures douloureuses. Enfin, des points limites ont été établis. Ils entraîneront la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire, pour limiter la souffrance.

Les résultats attendus sont importants, car en permettant de mieux comprendre les mécanismes de la méningite cérébro-spinale et du purpura fulminans, ils pourront conduire au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Cela permettra à terme de diminuer la mortalité et les séquelles dramatiques de ces infections sévères.

17613 Des données cliniques préliminaires ont objectivé de manière significative moins de récurrences métastatiques et une meilleure survie chez les patients ayant reçu des anesthésiques locaux au cours d'une chirurgie oncologique. Des études in vitro ont démontré que les anesthésiques locaux présentaient des effets directs sur les cellules cancéreuses et les cellules du système immunitaire. Notre hypothèse est que les anesthésiques locaux pourraient avoir une propriété anti-tumorale grâce à l'activation du système immunitaire. En pratique clinique, les cancers ne se traitent pas avec un seul traitement mais avec une association de traitement anticancéreux. Notre objectif est donc d'étudier l'efficacité des anesthésiques locaux en association avec les traitements antitumoraux utilisés couramment en clinique (chimiothérapie, immunothérapie. . .) afin de se rapprocher des pratiques courantes. Afin de reproduire la clinique réalisée chez l'homme, ce projet doit être réalisé sur un organisme vivant de type mammifère. En effet, dans un modèle vivant, les agents thérapeutiques sont modifiés par l'organisme et les effets biologiques observés peuvent être différents de ceux obtenus précédemment sur des cellules. De plus, il n'existe pas à ce jour de modèles alternatifs pour étudier l'implication du système immunitaire sur le contrôle de la croissance tumorale. Pour la réalisation de ce projet, l'utilisation d'animaux vivants est donc indispensable afin de prouver que les réactions subies par les agents d'anesthésie locale combinés aux traitements anticancéreux conventionnels au sein d'un organisme n'altèrent pas leur capacité à induire une réponse anti-tumorale. La confirmation de notre hypothèse pourrait avoir un impact majeur car inciterait à utiliser les agents d'anesthésie locale de manière systématique en clinique au cours des chirurgies ; ces agents, très bien connus, sont pour le moment indiqués à visée analgésique.

Dans ce projet, l'ensemble des expériences a été conçu afin de respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement et permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal.

Seul le nombre minimal de souris, déterminé et justifié rationnellement, sera utilisé dans l'étude soit 600 souris. Le projet regroupe 3 procédures composées de 10 groupes de 10 souris et réalisées dans deux types de cancer (sein et côlon). Nous pourrions être amenés à utiliser moins de souris si l'effet observé s'avère significatif au cours des premières expériences. A l'inverse, l'étude sera arrêtée si la procédure initiale invalide l'hypothèse de travail (point de réduction). Plusieurs tissus seront prélevés et soumis à diverses analyses (immunologiques, histologiques ou de biologie cellulaire) pour extraire le maximum de données de chaque expériences (optimisation). Raffinement: Les conditions d'hébergement sont adaptées et enrichi en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau, le milieu est enrichi à l'aide de coton, cage propre, renouvellement de l'air, éclairage contrôlé afin de respecter le cycle physiologique des souris). Les animaux seront acclimatés pendant une semaine avant le début des expériences puis suivis quotidiennement. Le poids des souris sera mesuré avant le début des traitements puis au moins une fois par semaine et avant euthanasie. Le stress des animaux sera évalué quotidiennement par des échelles d'hétéroévaluation (Mouse Grimace Scale: relevant des signes de mal-être tels que: perte de poids, pelade, agressivité, prostration, agitation, petits yeux, oreilles en arrière. . .). Des mesures seront prises pour limiter le stress: plusieurs souris par cage pour un élevage social (mais maximum 5 par cage, exclusion des souris agressives), animaux hébergés au calme. Les interventions chirurgicales seront réalisés sous anesthésie générale à l'écart des animaux hébergés et par des personnes qualifiées afin de diminuer le stress et la douleur. De plus, le personnel impliqué dans ce projet est qualifié sur le plan technique et formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale. Il assure aussi une lecture régulière des expériences publiées afin d'éviter de reproduire une expérience déjà rapportée dans la littérature.

17614 De nombreuses études scientifiques ont constaté le déclin de la population de Moineaux domestiques en Europe au cours des dernières décennies. Plusieurs hypothèses ont été émises pour tenter d'expliquer ce phénomène (prédation, manque de sites de ponte, pollution, maladie, etc). Récemment, il a également été suggéré que la pollution lumineuse pouvait être responsable au moins partiellement de ce déclin. Au contraire, la présence de lumière pourrait également représenter un avantage pour les populations urbaines de moineaux en augmentant la luminosité et la période journalière d'activité, permettant ainsi aux populations de moineaux domestiques de se maintenir en milieu urbain. L'état de nos connaissances sur l'impact de la pollution lumineuse sur la reproduction des oiseaux et le développement des poussins est cependant très limité à l'heure actuelle. Nous souhaitons donc tester expérimentalement l'effet d'une exposition lumineuse artificielle sur la reproduction des moineaux domestiques, et le développement de leurs poussins (morphologie, physiologie, survie). Nous allons pour cela exposer expérimentalement durant l'ensemble de la saison de reproduction (6 mois, avril-septembre) des couples de moineaux domestiques captifs (maintenus en volières) à une lumière nocturne (de 19:00 à 01:00 et de 03:00 à 08:00) d'intensité similaire à ce qui peut être retrouvé en milieu urbain (40 lux, l'équivalent de la lumière produite par un éclairage urbain à une distance d'une dizaine de mètres). La moitié des couples captifs seront gardés dans trois volières éclairées (N = 15 couples) tandis que l'autre moitié des couples captifs seront gardés dans trois autres volières sans éclairage (N=15 couples). Nous effectuerons alors un suivi régulier des nichoirs pour mesurer les dates d'entrée et de sortie de reproduction, le nombre de tentatives de reproduction, les tailles de pontes et les tailles de nichées (à l'envol). De plus, nous examinerons la croissance des poussins (N = 150 poussins, en se basant sur une moyenne de 5 poussins par couple) grâce à des relevés morphologiques (bec, aile, tarse, masse corporelle). L'effet sur la physiologie des poussins sera évalué grâce à deux prélèvements sanguins réalisés le 12ème et le 30ème jour après éclosion. Grâce à cette approche expérimentale, ce projet scientifique tend à mieux comprendre 1) les conséquences d'une pollution lumineuse sur la capacité des moineaux à se reproduire (date de ponte, nombre d'oeufs, nombre de poussins produits); 2) l'effet d'une exposition à une lumière urbaine nocturne sur le développement des poussins de Moineau domestique (croissance morphologique, condition corporelle, mécanismes

hormonaux, longueur des télomères). Au maximum, la taille d'échantillon pour cette étude sera de 60 adultes et de 150 poussins.

La règle des 3R a été prise en compte de la façon suivante : le Remplacement n'est pas possible car les expériences ciblent spécifiquement cette espèce qui est l'une des espèces sauvages les plus appropriées pour étudier cette problématique. La Réduction a été prise en compte en limitant au minimum le nombre d'animaux employés (30 couples reproducteurs seulement), ce qui est possible grâce à l'utilisation d'une approche expérimentale puissante statistiquement. Egalement, les prélèvements sanguins ainsi que les mesures morphologiques seront réalisés en nombre limité tout en permettant des analyses statistiques robustes. L'impact de l'expérience est très limité car les adultes ne seront pas manipulés et les poussins seront transférés dans des conditions de captivité sans perturbation suite à leur envol. Enfin, le Raffinement comprendra l'enrichissement des volières avec notamment la mise en place de refuges, de végétation et d'abris, et en assurant un environnement sociale approprié pour cette espèce.

17615 Les troubles neuro-développementaux (TND), incluant des déficits de mémoire, d'apprentissage, de l'attention ou encore les troubles du spectre autistique, touchent plus de 10 % des enfants dans le monde et constituent un problème de santé publique majeur. Les polluants environnementaux sont aujourd'hui mis en cause dans l'apparition de ces troubles. Au cours de la grossesse puis de l'enfance, le cerveau est notamment exposé à de nombreux perturbateurs endocriniens (PE) dont certains augmentent le risque d'apparition de TND. Parmi les PE incriminés, le bisphénol A (BPA), un agent plastifiant aujourd'hui interdit dans les contenants alimentaires en France, est cependant encore retrouvé dans l'organisme chez l'enfant comme chez l'adulte. Ce composé contamine l'homme principalement par l'alimentation. Plusieurs études indiquent que le BPA pourrait être impliqué dans le développement de TND.

Dans le cerveau, les fibres nerveuses sont protégées par une gaine de myéline riche en lipides qui permet d'accélérer la transmission des messages nerveux. La myéline joue donc un rôle essentiel pour toutes les fonctions cérébrales.

On sait que la formation de myéline, appelée myélinisation, est une étape cruciale du développement cérébral, dont la perturbation peut se traduire par l'apparition de TND. Cependant, très peu d'études se sont intéressées aux impacts des PE sur ce processus et notamment sur les lipides de la myéline.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'impact d'une exposition précoce au BPA sur la myélinisation. Pour cela, des souris gestantes seront exposées au BPA par l'eau de boisson pendant la gestation et la lactation, depuis le 6^e jour de gestation jusqu'au jour post-natal 22 (P22), afin d'étudier les conséquences de cette exposition sur leurs descendants. Les effets du BPA décrits dans la littérature, qu'ils concernent le développement cérébral, la fonction cérébrale chez l'adulte ou d'autres fonctions de l'organisme, sont souvent différents chez les mâles et les femelles. Pour cette raison, le projet inclura l'analyse des animaux des deux sexes.

Pour toutes les observations envisagées, nous utiliserons 3 groupes d'animaux : 1 groupe témoin (non exposé au BPA) et deux autres groupes exposés au BPA dilué dans l'eau à des dosages différents.

L'un des objectifs principaux consiste à analyser, chez les descendants des femelles exposées, la composition lipidique de différentes régions cérébrales (cortex, hippocampe, cervelet) à un stade précoce (P15 : début de myélinisation) et un stade tardif (P60 : cerveau myélinisé). En effet, alors que la myéline est majoritairement composée de lipides (70%), ces derniers ne sont presque jamais explorés dans les études s'intéressant aux conséquences de l'exposition du cerveau en développement à une substance potentiellement toxique. Nous rechercherons des modifications de la composition lipidique cérébrale induites par le BPA. Des analyses complémentaires seront également réalisées à différents stades entre la naissance et P60, incluant l'analyse de l'expression de protéines et de gènes. Pour ces analyses, les cerveaux seront prélevés sur animaux euthanasiés à différents temps.

De plus, nous réaliserons des analyses comportementales à différents stades afin de corrélérer les modifications moléculaires induites par le BPA à des modifications fonctionnelles. Nous évaluerons notamment les capacités de communication chez les souriceaux âgés de deux jours et d'une semaine, les interactions sociales chez les souris d'1 semaine et de 7 semaines et les capacités de mémorisation chez les souris de 6 semaines.

En tenant compte du nombre minimum d'animaux nécessaires pour garantir une puissance statistique suffisante pour chaque type d'expérience, nous avons calculé que ce projet nécessiterait l'exposition de 150 femelles gestantes, qui donneront naissance à 1350 descendants des deux sexes, soit un total de 1500 animaux utilisés. La durée prévue pour cette étude est de 5 ans.

Cette étude prendra en compte la réglementation des 3R :

Remplacement : La myélinisation est un processus développemental long et complexe impliquant de nombreuses interactions cellulaires entre les différents types cellulaires cérébraux. Pour cette raison, son étude ne peut être envisagée qu'« in vivo ». En outre, un modèle animal exposé par voie orale est actuellement le seul moyen pertinent de mimer l'exposition humaine au BPA.

Réduction : Le nombre d'animaux estimé et les tests statistiques utilisés sont basés sur notre expérience pour les différentes analyses et nous permettra de répondre aux questions scientifiques de ce projet. En particulier, l'analyse ciblée des lipides de la myéline sera réalisée sur une sélection de lipides, dont l'analyse statistique nécessite deux fois moins d'animaux par groupe pour mettre en évidence des différences significatives qu'une analyse non ciblée de tous les lipides. De plus, différentes régions cérébrales seront prélevées pour chaque animal. Les différents tests comportementaux seront réalisés successivement sur les mêmes animaux, qui seront également utilisés après le dernier test pour réaliser les autres analyses prévues dans ce projet à P60 (lipides, analyses complémentaires).

Raffinement : Les animaux seront hébergés en groupes et en milieu enrichi pour minimiser leur stress. La procédure d'exposition des animaux par l'eau de boisson, non invasive, ne générera pas de stress ou de souffrance. Une surveillance quotidienne des animaux sera effectuée. Une surveillance hebdomadaire plus exhaustive sera également mise en œuvre incluant l'observation de l'apparence, un suivi clinique et comportemental des animaux. Un score sera établi pour évaluer un éventuel stress et/ou douleur et le prendre en charge de manière adaptée selon la gravité à l'aide de grilles pour lesquelles des points limites ont été définis. Si les points limites sont atteints, nous procéderons au renforcement de la surveillance ou à l'euthanasie de l'animal (pour un score défini comme point limite terminal). Pour réaliser les tests comportementaux, nous mettrons en œuvre des procédures définies visant à minimiser le stress des animaux et à assurer la qualité et l'exploitabilité des résultats. A la fin de l'étude, les animaux seront euthanasiés selon les méthodes réglementaires.

17616 Ce projet a pour objectif l'évaluation de l'activité des immunosérums produits sur animaux et destinés à être utilisés chez l'homme et chez l'animal, selon les normes d'efficacité / activité, d'innocuité et de sécurité règlementaires. Les immunosérums sont utilisés pour le traitement de personnes ou animaux exposés au tétanos ou à certains venins et sont des « life saving products » c'est-à-dire permettant de sauver des vies. Les tests d'activité incluent également la qualification des solutions antigéniques utilisées pour la séroneutralisation des sérums, en accord avec les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF).

Ces tests d'activité consistent à administrer à des souris le sérum testé, préalablement mélangé in vitro à une quantité fixe d'une solution antigénique (venin, toxine), afin de réaliser une séroneutralisation in vitro. Après administration du mélange, les animaux sont ensuite hébergés pendant la période nécessaire pour observer les effets cliniques afin de déterminer le niveau de protection des animaux contre les effets de l'antigène.

Ce projet représente l'ensemble des essais menés systématiquement sur chaque lot de produits fabriqués. Suite à l'injection du mélange séroneutralisé les animaux peuvent présenter des signes cliniques. La prise en charge d'un animal présentant des signes cliniques de maladie non attendus est réalisée sous la responsabilité d'un vétérinaire.

Le degré de sévérité des procédures de ce projet est considéré comme sévère.

Ce projet peut nécessiter l'utilisation de 16 000 souris pour une durée de 5 ans.

Ce projet contribue au contrôle de lots de produits afin d'assurer leur fiabilité et leur conformité aux spécifications et aux textes de référence en vigueur.

En fin de test, les animaux utilisés sont euthanasiés selon les méthodes recommandées par la réglementation, par la Structure chargée du Bien-Etre des Animaux et approuvées par le Comité d'Éthique.

Mise en œuvre des 3R :

Remplacement : La stratégie pour ce projet consiste en une suppression ou un transfert des produits nécessitant ces contrôles. Cette stratégie implique une suppression des procédures liées au contrôle des sérums antirabiques ainsi qu'à un arrêt programmé à l'horizon 2025 des procédures restantes (activité des sérums antitétaniques et antivenimeux).

Réduction : Le nombre d'animaux utilisés au total est calculé au plus juste de façon à répondre aux exigences réglementaires et aux besoins de tests sur la période. Le nombre d'animaux par groupe est défini par la réglementation ou par une étude statistique. Il ne peut être réduit au-delà.

Raffinement : Les animaux sont hébergés en groupe dans des cages contenant des enrichissements dans des locaux appropriés et conformes aux standards réglementaires (ETS 123), et suivis par un personnel spécifiquement formé. En cas de signes cliniques non attendus, dans les meilleurs délais, les animaux bénéficient des soins vétérinaires ou sont euthanasiés selon les méthodes recommandées.

17617 Les produits de santé (médicaments, dispositifs médicaux...) constituent un élément clé dans la dispensation de soins de qualité aux patients. En alliant innovation et santé, la recherche et le développement de ces produits s'avèrent indispensables pour favoriser le progrès médical et l'accès à de meilleurs soins.

Or, par nature, ils sont destinés à être mis en contact avec le corps humain et peuvent donc entraîner des effets secondaires au niveau du site d'implantation : des dégradations importantes des tissus environnants peuvent nécessiter une intervention chirurgicale. Des séquelles fonctionnelles peuvent en résulter dans les cas les plus graves. L'innocuité des produits de santé doit donc être testée pour garantir le bon rétablissement des patients après chirurgie. Par ailleurs, tout produit de santé se doit d'être efficace lors de son utilisation clinique.

Il est donc impératif, comme le souligne la réglementation (directive 2007/47/CE, 21CFR820...) de prouver l'efficacité des produits de santé et de réduire au minimum le risque que des réactions indésirables se manifestent avant de proposer un produit sur le marché. Les méthodes alternatives existantes à ce jour ne permettent ni de couvrir l'ensemble des risques toxiques incombant aux produits de santé ni d'en tester intégralement l'efficacité, en particulier en raison de la complexité des mécanismes de régulations d'un organisme vivant. L'utilisation d'animaux est alors obligatoire pour y parvenir.

Chaque animal bénéficie d'une attention et des soins de qualité en post-opératoire afin d'assurer un bien être optimal. Quelles que soient les études, la douleur est rigoureusement contrôlée et proscrite grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (analgésie).

Les animaux arrivent dans l'EU (Etablissement Utilisateur) après la période post-opératoire réalisé dans l'EU concepteur (conception des protocoles, interventions chirurgicales et suivi post-opératoire). Notre EU assure, sous la responsabilité de L'EU concepteur, l'hébergement et le suivi clinique des animaux, réceptionnés dans un état clinique, sanitaire et comportemental satisfaisant.

Par ailleurs, les ruminants sont hébergés en groupes sociaux harmonieux dès que le protocole le permet et bénéficient d'un suivi quotidien par des animaliers qualifiés. La structure "Bien-être animal" et les vétérinaires des sites veillent à l'application du meilleur niveau de soins.

Il est prévu d'utiliser 750 ovins et 100 caprins sur la période de 5 ans.

17618 Le cerveau des mammifères est composé de cellules appelées neurones. La particularité remarquable des neurones est de communiquer entre eux via des structures élémentaires : les synapses. Cependant, l'efficacité de ces échanges peut évoluer à la hausse ou à la baisse (cas de la dépression à long terme ou LTD) en fonction de la sollicitation des réseaux concernés et des stimuli reçus. Ces modifications correspondent au phénomène de plasticité synaptique et surviennent dans les minutes qui suivent le stimulus déclencheur.

A plus long terme (quelques heures après le stimulus), il a été rapporté que les régions du neurone où se situent la majorité des synapses, les épines, subissent des variations de taille et de nombre. Ceci correspond à la plasticité structurelle. Dans le cas particulier d'un stimulus entraînant une LTD, le nombre d'épines diminue, on parle alors de sélection synaptique. Cependant, la compréhension du lien entre plasticité synaptique et structurelle est incomplète, notamment concernant la nature de l'interaction. De plus, leur implication dans le comportement et leurs conséquences visibles dans la « vie de tous les jours » commence à être mise en évidence mais reste peu connue.

De plus, l'implication de la plasticité neuronale dans des pathologies neurodéveloppementales et neurodégénératives (troubles du spectre autistique, maladie d'Alzheimer par exemple) a été identifiée. Une compréhension de ce phénomène est donc un point décisif dans la connaissance et la lutte contre ces pathologies, représentant dès lors un véritable enjeu sociétal et de santé publique.

Notre projet étudiera donc l'interaction entre plasticités synaptique et structurelle. Nous nous focaliserons sur la LTD et sélection synaptique ainsi que l'implication comportementale et adaptative de ces mécanismes. Nous utiliserons des techniques d'imagerie de pointe afin de suivre et mesurer différents paramètres neuronaux.

Justification du respect de la règle des 3R.

Remplacer: ce protocole nécessite l'utilisation d'animaux. En effet l'ensemble du projet repose sur l'idée de mettre en évidence le rôle de la plasticité neuronale dans la réorganisation de réseaux neuronaux et de comprendre son impact physiologique. Le projet ne peut donc se faire que sur des animaux vivants, des souris adultes "Mus musculus".

Réduire: le nombre d'animaux est calculé par l'estimation de la variance observée avec ce type de donnée permettant d'atteindre une signification statistique. Le nombre d'animaux est de 410 sur 3 ans. Chaque groupe expérimental est accompagné d'un groupe contrôle.

Raffiner: Afin de réduire au minimum la souffrance des animaux, les procédures suivantes sont mises en place: Les animaux proviennent d'un éleveur agréé. À leur arrivée, les animaux sont hébergés en cages collectives, garnies de litières leur permettant de reproduire un comportement naturel de fouissage et d'un enrichissement constitué d'un nid végétal et de tubes de cartons, pour leur permettre de construire des nids et de jouer et de ronger. Ces cages offrent aux animaux un espace important pour se redresser. Après un premier contrôle de leur état de santé, les animaux bénéficient d'une période d'acclimatation. Les animaux sont surveillés quotidiennement avec une surveillance renforcée après chirurgie.

Afin de réduire la douleur, les procédures expérimentales sont réalisées sous anesthésie et en présence d'une couverture analgésique. Un suivi post opératoire est réalisé durant 4 jours. Si un signe de douleur apparaît, un protocole de nursing est mis en place et une injection de NaCl et/ou d'analgésique est réalisée.

Des points limites suffisamment précoces sont définis pour éviter des souffrances aux animaux avec la mise en place de mesures pour les soulager comme une réhydratation, le réchauffement, une nourriture adaptée, des traitements vétérinaires si nécessaire.

17619 Les anticorps monoclonaux sont des protéines capables de se lier de façon très spécifique à d'autres molécules. Elles ont de très nombreuses applications en biologie et en médecine, de type diagnostique (tests HIV, SARS-CoV-2 par exemple) ou thérapeutique (immunothérapie contre certains cancers ou maladies infectieuses).

La fabrication d'anticorps monoclonaux est un prérequis essentiel pour la mise au point de certains tests rapides de diagnostic et d'anticorps thérapeutiques dans des domaines tels que l'oncologie,

les maladies infectieuses, la lutte contre des agents de la menace bioterroriste, etc. . . Ces anticorps, utilisés dans le cadre de tests de diagnostic, permettent d'identifier rapidement des pathologies et d'appliquer le meilleur traitement, le plus rapidement possible. Concernant les anticorps thérapeutiques, ils permettent une immunité immédiate chez la personne qui en bénéficie.

A titre d'exemples, ces anticorps serviront pour le développement de contre-mesures médicales ou de tests de diagnostic répondant à des enjeux majeurs de santé publique, à la demande de cliniciens ou en réponse aux pouvoirs publics et ciblant la détection de maladies infectieuses. Ces tests sont ensuite transférés et commercialisés par des partenaires industriels.

La synthèse d'anticorps monoclonaux nécessite de recourir aux modèles murins. Cette synthèse comprend deux étapes. Dans une première étape (immunisation), des animaux sont immunisés avec des cibles d'intérêt (qui peuvent être par exemple des protéines, ou des agents infectieux inactivés et donc incapables de générer des maladies, comme cela est réalisé chez l'homme en vaccination). Cette étape nécessite l'utilisation d'un petit nombre d'animaux, et aucune technique in vitro ne permet de la remplacer aussi efficacement, car elle implique tout le système immunitaire de l'animal, et permet donc de générer des anticorps présentant des performances inégalables par des systèmes synthétiques. La deuxième étape (fusion), une fois que les cellules sécrétant les anticorps ont été isolées, consiste en la production d'anticorps monoclonaux, à partir des cellules immunitaires de l'animal immunisé au cours de la première étape. Cette production est réalisée en routine au laboratoire par des techniques in vitro (culture de cellules productrices d'anticorps d'intérêt, purification des anticorps à partir des surnageants).

Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet (développement de tests de diagnostic ou d'anticorps thérapeutiques contre des agents de la menace biologique, responsables de maladies infectieuses, pour la détection de résistances aux antibiotiques chez les bactéries, etc...) proviennent d'élevages agréés et sont nés et élevés en captivité. Leur nombre (1000 soit 200 rongeurs par an), a été réduit au minimum nécessaire tout en restant suffisant pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées. En effet, il est prévu une cinquantaine d'immunisations par an, et des lots de 4 animaux par immunisation. Ce nombre se justifie par le fait que deux animaux sont nécessaires par fusion, et qu'il est très souvent nécessaire de réaliser deux fusions par cible (immunisation), afin d'obtenir suffisamment d'anticorps pour atteindre les performances requises en termes de spécificité, sensibilité, affinité et diversité.

L'état de santé et le bien-être des animaux seront surveillés tout au long de l'expérience et évalués grâce à une grille codifiant le niveau de douleur. En effet, les animaux sont anesthésiés lors des injections, ainsi que lors des prélèvements. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie.

17620 Les anticorps monoclonaux sont des protéines capables de se lier de façon très spécifique à d'autres molécules. Elles ont de très nombreuses applications en biologie et en médecine, de type diagnostique (tests HIV, SARS-CoV-2 par exemple) ou thérapeutique (immunothérapie contre certains cancers ou maladies infectieuses).

La fabrication d'anticorps monoclonaux est un prérequis essentiel pour la mise au point de certains tests rapides de diagnostic et d'anticorps thérapeutiques dans des domaines tels que l'oncologie, les maladies infectieuses, la lutte contre des agents de la menace bioterroriste, etc. . . Ces anticorps, utilisés dans le cadre de tests de diagnostic, permettent d'identifier rapidement des pathologies et d'appliquer le meilleur traitement, le plus rapidement possible. Concernant les anticorps thérapeutiques, ils permettent une immunité immédiate chez la personne qui en bénéficie.

A titre d'exemples, ces anticorps serviront pour le développement de contre-mesures médicales ou de tests de diagnostic répondant à des enjeux majeurs de santé publique, à la demande de cliniciens ou en réponse aux pouvoirs publics et ciblant la détection de maladies infectieuses. Ces tests sont ensuite transférés et commercialisés par des partenaires industriels.

La synthèse d'anticorps monoclonaux nécessite de recourir aux modèles murins. Cette synthèse comprend deux étapes. Dans une première étape (immunisation), des animaux sont immunisés

avec des cibles d'intérêt (qui peuvent être par exemple des protéines, ou des agents infectieux inactivés et donc incapables de générer des maladies, comme cela est réalisé chez l'homme en vaccination). Cette étape nécessite l'utilisation d'un petit nombre d'animaux, et aucune technique in vitro ne permet de la remplacer aussi efficacement, car elle implique tout le système immunitaire de l'animal, et permet donc de générer des anticorps présentant des performances inégalables par des systèmes synthétiques. La deuxième étape (fusion), une fois que les cellules sécrétant les anticorps ont été isolées, consiste en la production d'anticorps monoclonaux, à partir des cellules immunitaires de l'animal immunisé au cours de la première étape. Cette production est réalisée en routine au laboratoire par des techniques in vitro (culture de cellules productrices d'anticorps d'intérêt, purification des anticorps à partir des surnageants).

Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet (développement de tests de diagnostic ou d'anticorps thérapeutiques contre des agents de la menace biologique, responsables de maladies infectieuses, pour la détection de résistances aux antibiotiques chez les bactéries, etc...) proviennent d'élevages agréés et sont nés et élevés en captivité. Leur nombre (1000 soit 200 rongeurs par an), a été réduit au minimum nécessaire tout en restant suffisant pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées. En effet, il est prévu une cinquantaine d'immunisations par an, et des lots de 4 animaux par immunisation. Ce nombre se justifie par le fait que deux animaux sont nécessaires par fusion, et qu'il est très souvent nécessaire de réaliser deux fusions par cible (immunisation), afin d'obtenir suffisamment d'anticorps pour atteindre les performances requises en termes de spécificité, sensibilité, affinité et diversité.

L'état de santé et le bien-être des animaux seront surveillés tout au long de l'expérience et évalués grâce à une grille codifiant le niveau de douleur. En effet, les animaux sont anesthésiés lors des injections, ainsi que lors des prélèvements. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie.

17621 Notre représentation du temps est continue. En effet, dans toutes nos actions, planifications et communications, la dimension temporelle est essentielle. Dans toutes ces situations, nous comparons la durée que nous sommes en train de percevoir aux durées que nous avons préalablement acquises et stockées dans notre mémoire à long terme. Ce mécanisme de perception de durées en cours comparées à des durées connues nous permet d'anticiper les événements à venir et d'adapter notre comportement à la situation. Cela est possible grâce à la mémoire de travail temporelle.

L'implication de cette mémoire a été mise en évidence dans un conditionnement Pavlovien dans lequel le sujet associe un stimulus initialement neutre (stimulus conditionné ou SC, généralement une lumière ou un son) à l'arrivée d'un stimulus inconditionné (SI, un renforcement). Avec de l'entraînement, le sujet présente une anticipation de l'arrivée du SI, avec un pic de réponse aux alentours du moment attendu du renforcement, montrant par là qu'il a appris la durée qui sépare le SC de l'arrivée du SI. Plusieurs études chez le rat ont démontré, dans un conditionnement Pavlovien aversif, couplé à des enregistrements électrophysiologiques in vivo, que plusieurs structures cérébrales montraient des cohérences d'oscillations au moment où le renforcement est attendu.

Le but de cette recherche est de déterminer si les bases neuronales du comportement d'anticipation temporelle sont les mêmes en situation appétitive et aversive dans une tâche temporelle en conditionnement Pavlovien. En particulier, nous utiliserons le paradigme d'ajout de GAP temporels (e. g, un arrêt temporaire du SC) de façon à analyser le maintien en mémoire de la durée. Plusieurs méthodes seront utilisées en parallèle de tâches comportementales dans trois types d'expérimentation : analyse immunohistochimie (marqueurs moléculaires) d'activités neuronales, analyse des oscillations dans des enregistrements électrophysiologiques in vivo (animaux implantés d'électrodes) et l'étude de l'impact d'une infusion d'inhibiteur d'activité neuronale dans une zone cérébrale donnée (animaux implantés de canules).

Cette recherche sera menée sur 5 ans. Le nombre d'animaux dans chaque groupe utilisé a été calculé afin d'assurer une bonne puissance statistique à nos résultats, basé sur les expériences précédentes. Le travail sur un même animal en différentes conditions est favorisé de façon à d'une

part de limiter le nombre d'animaux utilisés, et d'autre part d'augmenter notre puissance statistique. Un maximum de 264 rats mâles adultes sera utilisé pour l'ensemble des expérimentations.

La règle des 3R sera suivie de la manière suivante : (1) Le nombre d'animaux utilisés sera minimisé autant que possible grâce à l'étude de plusieurs paramètres chez le même animal. À la suite de chaque expérimentation et dès lors que cela le permet, les animaux seront mis à l'adoption, ou réutilisés pour d'autres études. (2) Nous réduirons au maximum les techniques douloureuses ou stressantes, et utiliserons anesthésie et analgésie avant chaque procédure chirurgicale de façon adaptée au poids de l'animal. Les animaux seront logés avec de l'enrichissement autant que possible. Chaque animal sera suivi tout au long de l'expérience afin de détecter tout indicateur de souffrance (liée potentiellement à la chirurgie ou à la restriction alimentaire) et déterminer si besoin l'arrêt de l'expérimentation en accord avec le SBEA et les conseils vétérinaires. (3) Ce projet de recherche fondamentale fait partie des Neurosciences comportementales. L'enregistrement de structures cérébrales in vivo au cours d'une tâche comportementale nécessite l'utilisation d'animaux vivants.

17622 Ce projet cherche à caractériser la capacité d'anticorps à lever le blocage neuromusculaire induit par un curare utilisé en anesthésie, l'atracurium. Pour stopper rapidement l'effet d'une curarisation persistante chez un patient après intervention chirurgicale, les procédures actuelles ont recours à l'administration de composés capables de capturer le curare et de lever le blocage neuromusculaire que celui-ci induit. Les procédures actuelles embolisent les services de réanimation. Nous cherchons à générer, puis à caractériser les propriétés de décurarisation d'anticorps anti-atracurium sans pour autant induire d'effets secondaires néfastes.

Même si les curares utilisés en anesthésie sont des molécules relativement sûres induisant peu de réactions adverses sévères (1/10,000 patients souffrent de réactions sévères), il est impossible de prédire précisément leur durée d'action. Seul le monitoring instrumental quantitatif de la curarisation permet d'exclure avec certitude une curarisation résiduelle, qui correspond à la présence persistante de molécules de curares inhibant les jonctions neuromusculaires. Cette curarisation résiduelle est une complication majeure (jusqu'à 83% des patients) de l'utilisation des curares car elle peut être responsable d'hypoxémie, d'hypercapnie, de troubles de la déglutition et donc d'inhalation pulmonaire du liquide gastrique, entraînant un allongement de la durée de séjour à l'hôpital et de la morbi-mortalité. La curarisation résiduelle peut-être raccourcie en durée par injection d'un inhibiteur de l'estérase de l'acétylcholine, la neostigmine. En revanche le gain de temps jusqu'à la décurarisation n'est que de 50% et ne permet pas d'éviter un grand nombre d'effets secondaires ou un réveil rapide du patient en cas de nécessité (vitale). Il serait donc intéressant d'identifier de nouvelles molécules de capture de l'atracurium. Il en est de même pour l'un des stéréo-isomères de l'atracurium, le cisatracurium, plus faiblement utilisé en clinique.

Dans nos travaux précédents, plusieurs anticorps monoclonaux anti-rocuronium (un autre curare non-dépolarisant utilisé en clinique) ont été identifiés à partir de souris immunisées contre le rocuronium couplé à des protéines porteuses. Nous proposons donc de faire de même pour l'atracurium (et le cisatracurium) afin d'identifier des anticorps anti-atracurium/cisatracurium qui pourraient être utilisés dans le cadre de la décurarisation soit en urgence (échec d'intubation), soit en routine clinique afin de lever rapidement le blocage neuromusculaire.

Ce projet inclut 3 procédures avec au total 370 (10+40+320) souris utilisées :

(1) Une procédure de classe légère pour induire une réponse immunitaire de type anticorps suite à une immunisation par un dérivé de l'atracurium couplé à une protéine porteuse (dénué de capacité à bloquer la fonction neuromusculaire), nécessitant l'utilisation de 10 souris de laboratoire à l'âge de jeunes adultes.

(2) Une procédure de classe sévère pour déterminer la dose sublétales d'atracurium et déterminer quels paramètres suivre pour monitorer la survenue de la mort, nécessitant l'utilisation de 40 souris de laboratoire à l'âge de jeunes adultes.

(3) Une procédure de classe modérée pour tester l'efficacité de décurarisation des anticorps anti-atracurium, nécessitant l'utilisation de 320 souris de laboratoire à l'âge de jeunes adultes.

Ce projet contient 1 procédure active d'immunisation et 2 procédures passives pour lesquelles les animaux seront injectés avec des curares non-dépolarisant, l'atracurium et le cisatracurium. Les curares non-dépolarisants n'induisent pas à priori de douleur, puisqu'ils ne provoquent pas de spasmes musculaires. En revanche une dose proche ou supérieure à la dose nécessaire pour l'obtention d'un bloc neuromusculaire à 90 % (ED90) induira une paralysie de l'activité pulmonaire.

Des points limites seront pris en compte dans notre travail afin d'anticiper et minimiser la souffrance des animaux. Plusieurs points limites ont été définis, correspondant soit à l'apparition de manifestations respiratoires sévères (signes de respiration abdominale marquée, de suffocation ou dyspnée aggravée) ou d'hypothermie sévère. L'expérimentateur sera présent en continu pour monitorer l'apparition de ces points limites, et le cas échéant, déterminer le moment optimal de la mise à mort pour chaque animal afin de réduire au maximum la douleur et la souffrance de chaque animal.

Le suivi de la curarisation sera effectué visuellement (mobilité, vitalité, difficultés respiratoires). La curarisation étant induite par bolus, sa durée ne devrait pas excéder 30 minutes, ce qui ne nécessite pas de prévoir une réhydratation.

Pour que notre approche corresponde à un modèle préclinique pertinent et avec le minimum d'inconfort/souffrance pour les souris de laboratoire, nous nous sommes imposés deux contraintes : i) établissement de la dose optimale de curare induisant une réaction sublétales en quelques minutes ; ii) mise en œuvre d'analyses in vivo avec des fenêtres temporelles les plus courtes possibles.

Les pathologies et thérapies qui vont être étudiées ici résultent de réactions systémiques et impliquent des conséquences au niveau de différents tissus et organes. Ces processus sont complexes, reposant sur les singularités du système circulatoire et des tissus cibles, processus qui ne peuvent pas être reproduits in vitro. Nos procédures expérimentales ont un caractère de stricte nécessité et ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information biologiquement pertinent.

Le recours à des lignées de souris consanguines de souris permet, entre autres, de réduire le nombre d'animaux par groupe expérimental, et de ne pas prolonger les explorations dès lors que sont initiées et mesurées les conséquences biologiques de l'infusion de curares. La taille des lots a été réduite à un strict minimum tout en permettant une analyse statistique pertinente.

17623 Depuis les années 2010, une augmentation de la proportion de personnes âgées au sein de la population mondiale a été observée. Lors du vieillissement, les capacités fonctionnelles de l'organisme à s'adapter sont affectées et le système immunitaire, présent pour nous protéger, se dérègle : une inflammation faible mais persistante, dite de bas grade, s'installe alors. De plus, la fonctionnalité de certains organes peut également être altérée avec l'âge : pour exemple, il a été noté que l'intestin devient en parti plus perméable, augmentant le risque d'apparition d'infections et diminuant ainsi ses capacités de barrière protectrice pour l'hôte. Une modification de la composition de l'ensemble des micro-organismes présents dans nos intestins (microbiote intestinal) survient également avec l'âge, et serait impliquée dans la mise en place de cette inflammation bas grade. Des analyses de microbiote intestinal de personnes âgées saines, centenaires ou super centenaires (> 105 ans), ont montré la présence significative d'une famille de bactéries appelées Christensenellaceae, non pathogènes et qualifiées de bactéries commensales car elles ont été isolées chez des volontaires sains. Des premiers résultats obtenus au sein du laboratoire sur des modèles cellulaires ont montré que 3 des 6 bactéries testées appartenant à la famille des Christensenellaceae possèdent également la capacité de diminuer l'inflammation. Enfin, outre l'utilisation de bactéries, des chercheurs ont mis en évidence les effets bénéfiques d'une restriction calorique sur de nombreuses espèces âgées comme la souris, le rat, le singe ou encore l'humain en augmentant leur espérance de vie et en diminuant l'inflammation liée à l'âge.

Dans ce contexte, notre hypothèse de travail est que l'administration de bactéries de la famille des Christensenellaceae favorise un vieillissement en bonne santé d'une part, et que leurs associations avec une restriction calorique potentialise ces effets bénéfiques d'autre part.

Afin de vérifier notre hypothèse, et au vu des premiers résultats prometteurs obtenus sur des modèles cellulaires, nous avons choisi de poursuivre la caractérisation des effets de Christensenellaceae en utilisant des souris âgées C57BL/6 comme modèle d'étude. L'utilisation des souris comme système complexe est une étape nécessaire à la validation des résultats obtenus sur modèles cellulaires. Le fait d'avoir recours à des animaux âgés est toujours un risque supplémentaire au niveau des procédures réalisées notamment en termes de stress. C'est pourquoi nous avons décidé de réduire au maximum les gestes exécutés sur les souris et de faire un suivi scrupuleux de leur état de santé général. Nous avons déterminé le nombre d'animaux nécessaires et suffisant à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Nous aurons donc besoin de 240 animaux pour ce projet. Enfin, puisque les souris seront mises en cage individuelle pour la nécessité de l'étude, nous améliorerons au mieux leurs conditions d'hébergement avec : une feuille de cellulose ajoutée dans chaque cage permettant la nidification ; des bâtons de bois pour ronger ; les cages seront transparentes et mises côte à côte, permettant aux souris de maintenir un lien social tout en se sentant en sécurité ; un suivi quotidien des animaux à l'aide d'une grille de score clinique nous permettra de voir si des points limites sont atteints et d'agir en conséquence rapidement. Si le score indique plusieurs états « sévères », l'euthanasie sera choisie afin de stopper la souffrance de l'animal. L'emploi d'analgésiques pour diminuer la douleur ne peut être utilisé dans ce projet étant donné leurs impacts sur l'inflammation. De plus, aucun anesthésique ne sera utilisé lors de la procédure, les gestes pouvant se faire sans et des anesthésies à répétition seraient risquées sur des souris âgées.

Chaque procédure comprendra 40 souris qui seront réparties en 4 lots différents : deux lots de souris âgées non traitées et deux autres lots de souris âgées traités avec Christensenellaceae. Un lot de souris non traitées et un lot de souris traitées seront soumis à une restriction calorique. La procédure commencera à l'âge de 14 mois, et se terminera à l'âge de 22 mois, soit une durée totale de 8 mois afin d'apprécier les effets du vieillissement et l'impact de nos traitements sur ce modèle de souris âgées. Christensenellaceae sera administrée par gavage réalisé par du personnel expérimenté. La restriction calorique sera mise en place graduellement jusqu'à atteindre une diminution de 30% de la prise alimentaire. L'apport en nourriture des souris sous restriction calorique sera fait tous les jours. Des prélèvements sanguins seront effectués une fois par mois afin de suivre l'établissement du vieillissement chez les souris. Des prélèvements de fèces seront effectués deux fois par mois afin de suivre la modulation de la composition du microbiote intestinal avec l'âge et suite à nos traitements. Enfin, le poids des souris sera suivi quotidiennement pendant la totalité de la procédure afin de s'assurer de leur bien-être.

17624 Dans le cadre de la recherche et du développement de nouveaux candidats médicaments, la pharmacocinétique a pour but d'étudier le devenir d'une substance active après son administration dans l'organisme. Elle comprend l'étude des quatre grandes étapes qui permettent de choisir les voies d'administration et la forme galénique, et de déterminer le schéma posologique optimal (dose, fréquence d'administration) pour son utilisation future chez l'homme : absorption (A), distribution (D), métabolisme (M), excrétion du principe actif et de ses métabolites (E). Avant toute administration in vivo la molécule est caractérisée sur des modèles in vitro, permettant de sélectionner le composé avec les meilleures caractéristiques de solubilité, perméabilité, et stabilité métabolique.

Il n'existe actuellement pas de modèle unique in vitro suffisamment fiable permettant de prédire le comportement pharmacocinétique d'un produit chez l'homme, notamment en raison du parcours de chaque substance entre les différents organes et du métabolisme au sein de chacun de ces organes. L'utilisation d'animaux, tels que les rongeurs, est une démarche classique et éprouvée pour tester la pharmacocinétique des composés avant toute administration à l'homme.

Dans ce projet nous testerons in vivo uniquement les composés que nous avons préalablement sélectionnés sur des tests in vitro. Nous les administrerons chez le rat et la souris et testerons

différentes voies (intraveineuse, orale, sous-cutanée, ou intrapéritonéale) sur des animaux différents. Des prélèvements de sang sous anesthésie gazeuse seront prévus pour évaluer la concentration du produit (et/ou ses métabolites) dans le sang (ou dans le plasma) et suivre sa concentration dans le temps. Afin d'analyser les voies d'excrétion de nos composés, nous pourrions collecter les urines ou les fèces ou encore de la bile au moyen d'un système de dérivation du canal cholédoque.

Ce projet est développé dans le respect de la règle des 3R, et donc un nombre minimal d'animaux sera donc utilisé. Toutefois, les études de pharmacocinétique sont des études courtes mais il est nécessaire d'en réaliser un grand nombre chaque année pour répondre aux besoins des programmes de recherche. Dans ce projet, un total de 7500 souris et 3300 rats est estimé pour une durée de 5 ans. Ce nombre a été déterminé à partir d'études rétrospectives permettant de sélectionner un minimum de 3 animaux par composé. Dans le but de réduire le nombre d'animaux utilisés, des mélanges de composés pourront être administrés.

La connaissance des propriétés pharmacocinétique d'un produit chez l'animal avant le design des études de pharmacologie permet d'utiliser le meilleur traitement (dose, voie d'administration) et participe à réduire le nombre d'animaux utilisés par la suite en pharmacologie.

Afin de répondre aux besoins des programmes de R&D de la société, il pourra être nécessaire de faire des études de pharmacocinétique sur des animaux génétiquement modifiés lorsqu'ils seront utilisés comme modèles pour les études de pharmacologie.

Afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, les procédures se dérouleront avec une surveillance journalière et une prise en charge de la douleur sera pratiquée si nécessaire. De plus, un enrichissement du milieu sera effectué et adapté à chaque espèce avec ajout de maisonnettes en cartons, de coton pour la nidification et de bâtonnets en bois à ronger. Des points limites ont été établis, permettant la prise en charge de l'animal si nécessaire avant le terme de l'étude. Une anesthésie gazeuse ou chimique est prévue pour effectuer les prélèvements sanguins ainsi que lors de la mise à mort de l'animal pour réaliser les prélèvements d'organes et tissus.

A terme, les résultats précliniques de ce projet permettront de mieux comprendre la pharmacocinétique de nos composés afin de développer en clinique des composés prometteurs ayant le potentiel d'améliorer la prise en charge thérapeutique des patients.

17625 Plusieurs cas de pneumonies virales ont été décrits fin 2019 dans la ville de Wuhan en Chine. L'agent causal est un nouveau coronavirus, le SARS-CoV2, et la maladie qu'il provoque a été appelée COVID-19. Le 30 janvier 2020, l'OMS a déclaré que l'épidémie était une urgence de santé publique de portée internationale. Début novembre 2020, plus de 46 millions de personnes ont été infectées, parmi lesquelles plus d'un million sont décédées. En France, plus d'un million de cas d'infections ont été confirmés dont 36,000 décès.

Les coronavirus provoquent habituellement des infections hivernales bénignes telles que des rhumes. Toutefois, au cours des 20 dernières années, deux autres émergences d'infections respiratoires aiguës sévères ont été causées par des coronavirus : le SARS (« severe acute respiratory syndrome») en 2003 et le MERS (« Middle East respiratory syndrome») en 2012.

Les signes cliniques de l'infection par le virus SARS-CoV2 sont principalement de la fièvre et de la toux. L'infection peut se compliquer de difficultés respiratoires, d'une détresse respiratoire aiguë sévère (DRAS) et d'une défaillance multiviscérale. Ces complications semblent toucher préférentiellement les personnes âgées, fragiles ou atteintes de maladies chroniques telles que le diabète et l'hypertension.

Plusieurs vaccins seront bientôt disponibles ou sont actuellement en essais cliniques chez l'homme, mais nous avons peu de recul sur la durée de la protection conférée, d'éventuels effets secondaires à long-terme, ou l'efficacité sur diverses sous-populations à risque. Il ne faut donc pas que les candidats vaccins moins avancés dans leur développement soient précocement abandonnés alors qu'ils pourraient suppléer à d'éventuels points faibles des vaccins déjà établis.

Nous intervenons dans plusieurs de ces projets cherchant à concevoir des vaccins dirigés contre le SARS-CoV2 et d'évaluer leur efficacité sur des modèles animaux en vue d'éventuels essais cliniques chez l'Homme. Dans le cadre de ces projets, nous intervenons au niveau de la fin de la phase préclinique, avec l'évaluation de plusieurs vaccins contre le virus SARS-CoV2 sur le modèle des primates non-humains.

Il est aujourd'hui impossible de reproduire in vitro la complexité d'une infection virale et d'une réponse immunitaire de l'organisme. Le recours à un modèle animal est donc nécessaire pour apporter un maximum d'informations avant la réalisation d'essais cliniques chez l'humain, et ne peut être remplacé par tout autre modèle ne représentant que partiellement un organisme. Nous avons fait le choix d'utiliser le macaque car il est le modèle le plus pertinent pour étudier la réponse vaccinale de par sa proximité génétique avec l'être humain. De plus, l'infection du macaque par le SARS-CoV2 reproduit effectivement les symptômes observés chez l'humain.

Dans ce projet, nous testerons plusieurs vaccins candidats. Pour certains, nous comparerons l'efficacité de leur combinaison avec différents adjuvants et l'impact de la voie d'administration. Au total, nous évaluerons au maximum 20 formulations différentes sur une durée de 5 ans. Pour cela, nous estimons nécessaire d'utiliser au maximum 230 animaux nés et élevés en captivité dans un établissement agréé soit 46 animaux/an. Ce nombre prend en compte les différents scénarios du projet. Il est donc attendu que, potentiellement, moins d'animaux soient utilisés. Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux sera réduit au minimum nécessaire permettant une interprétation statistique fiable des résultats. Les méthodes expérimentales (prélèvements sanguins et tissulaires) ont été définies de manière à éviter toute souffrance lors des interventions (limitation des volumes sanguins prélevés ; imagerie in vivo afin de limiter le plus possible le recours à des biopsies tissulaires, expositions au virus et injections des vaccins réalisés sous anesthésie générale, pose de puces électroniques de suivi de la température). Les critères d'arrêt sont prévus dans le projet en cas de progression de la maladie ou d'éventuels effets inattendus du vaccin et des adjuvants. Les vétérinaires de l'installation seront alertés et mettront en œuvre des traitements en adéquation avec l'expérience. Les animaux seront hébergés en groupe lors des phases d'immunisation et en individuel dans des modules contigus permettant des interactions sociales lors de la phase d'infection aiguë (3 semaines). Ils bénéficieront d'un programme défini par la cellule « bien-être animal » de l'établissement pour l'enrichissement de leur milieu de vie et qui sera renforcé lors des phases d'hébergement individuel

- 17626** 1)Intitulé du projet : Traitement in vivo de la fièvre de Lassa par un inhibiteur dans un modèle murin.
2)Durée du projet : Ce projet d'une durée de 5 ans, prévoit l'utilisation de 68 rongeurs souris au maximum. Il comporte une seule procédure de degré de gravité sévère.
3)Mots clés : Virus Lassa, inhibiteur, modèle souris
4)Finalité du projet : Recherche translationnelle
5)Objectifs et bénéfices escomptés du projet

Les virus de la famille des Arenaviridae se répartissent en virus de l'Ancien Monde et du Nouveau Monde et sont transmis à l'Homme par contact avec les rongeurs qui en sont les espèces hôtes. Chez l'Homme, ils sont responsables de graves épidémies dont les symptômes varient d'un symptôme grippal à des fièvres hémorragiques mortelles. Le virus de cette famille ayant la plus grande prévalence est le virus Lassa (LASV), responsable de la fièvre de Lassa, pour lequel, il n'existe aucun vaccin ni traitement. Nous avons identifié une grande sensibilité de ce virus, à plusieurs inhibiteurs qui abrogent la capacité des cellules infectées à pouvoir générer de nouvelles particules virales, limitant ainsi sa propagation et sa dissémination. Nous souhaitons démontrer que l'efficacité constatée in vitro pour l'une de ces molécules peut se traduire in vivo pour bloquer la réplication du virus et sa dissémination dans l'animal infecté. La molécule que nous souhaitons tester a déjà montré son efficacité dans un modèle animal d'infection létale de la maladie du sommeil. Le but de cette expérimentation est de fournir une preuve de concept de l'utilité thérapeutique de cette molécule pour traiter l'infection par le virus Lassa.

- 6)Nuisances prévues

Pour réaliser cette preuve de concept, nous utiliserons un modèle d'infection non létale par le virus Lassa déjà décrits dans la littérature scientifique. Les animaux développent une infection disséminée qui ne provoque pas de pathologie semblable à celle observée chez l'Homme et d'autres modèles animaux plus sensibles à l'infection. Ce modèle est néanmoins pertinent car le but du traitement proposé est de démontrer qu'il empêche la dissémination du virus dans l'organisme. Ce modèle d'infection fait état d'une baisse transitoire du poids des animaux. Une baisse de l'activité des animaux devrait persister pendant toute la procédure. Les animaux infectés seront divisés en 3 groupes de 20 individus. Un premier groupe sera traité avec un placebo et les 2 autres groupes seront traités chacun avec une dose différente d'inhibiteur. Deux autres groupes de 4 animaux seront également intégrés à la procédure. L'un sera utilisé pour déterminer les paramètres biologiques de base au début de la procédure alors que le second recevra le traitement avec la dose la plus forte afin de s'assurer que les éventuels effets observés sur les animaux sont liés à l'infection et non au traitement. Les doses d'inhibiteur utilisées sont très bien tolérées par les animaux et ont déjà démontré leur efficacité *in vivo* pour un autre agent infectieux, mortel celui-là dans ce type de modèle. Nous utiliserons 50% de males et 50% de femelles dans chacun des groupes afin de s'assurer qu'aucun biais lié au sexe ne nuise à l'interprétation des résultats dans la capacité du traitement à protéger contre la multiplication et la dissémination du virus Lassa. Le jour de l'infection, les animaux seront également implantés avec une puce télémétrique pour déterminer leur température corporelle quotidienne. Toutes les injections seront réalisées par voie intrapéritonéale. Tous les prélèvements (sang et organes) seront réalisés après anesthésie et mise à mort des animaux dans le respect scrupuleux des règles en vigueur.

Du fait de l'utilisation d'un virus de groupe de risque 4, les animaux seront tous hébergés dans une animalerie de niveau de sécurité biologique de risque 4 et qu'ils soient infectés ou non, seront mis à mort à la fin de la procédure pour satisfaire aux exigences de biosécurité en vigueur (aucun animal vivant potentiellement exposé à un agent de classe 4 ne peut sortir du laboratoire). La procédure doit donc être classée en sévère.

7) Application de la règle des «trois R»

1. Remplacement

Nous avons démontré *in vitro* la capacité de l'inhibiteur à bloquer la production de particules infectieuses. Afin d'évaluer son potentiel thérapeutique, seul son utilisation dans un modèle *in vivo* d'infection peut permettre d'en déterminer l'efficacité. Nous avons préféré un modèle d'infection non létal à un modèle d'infection létal afin de limiter la souffrance des animaux au cours de la procédure. Les paramètres biologiques mesurés à partir des prélèvements effectués sur les animaux au cours de la procédure démontreront l'efficacité du traitement.

2. Réduction

Le nombre d'animaux total pour la procédure a été déterminé pour satisfaire au mieux à la règle de réduction tout en assurant un effectif minimal dans chaque groupe permettant une analyse statistique robuste des résultats des différents paramètres mesurés. Ainsi lors des jours de prélèvements, 4 animaux des groupes infectés et traités (placebo ou inhibiteur) seront mis à mort et prélevés. La comparaison des mesures des paramètres biologiques effectuée à partir de 4 animaux satisfait à la plupart des tests statistiques de ce type d'étude et assure ainsi la pertinence scientifique des résultats obtenus.

3. Raffinement

Les animaux sont hébergés dans des conditions permettant d'assurer au mieux le maintien d'une activité normale, avec un apport d'enrichissement dans les cages via la litière et la mise en place de cachettes. Le bien-être animal sera suivi à l'aide d'une grille de scoring établie quotidiennement avec les connaissances actuelles et les données bibliographiques. Celui-ci reprend notamment les observations du comportement et de l'aspect des animaux ainsi que la mesure du poids et de la température des animaux (facilitée par l'implantation d'une puce télémétrique dans chaque animal). Du fait du modèle d'infection utilisé ici, le point limite de mise à mort ne devrait pas être atteint. Si toutefois l'état des animaux se détériorait, atteinte du score limite ou d'un des points limite fixé au protocole, cela entraînera la mise à mort du/des animaux. Si l'inhibiteur s'avère efficace, deux tiers

des animaux infectés ne devraient pas présenter de dissémination du virus dans leur organisme et donc être exemptes des signes associés à celle-ci.

17627 Le Syndrome de Down (SD) ou Trisomie 21 (T21) est la première cause de retard mental d'origine génétique. Le SD est lié à la présence d'une copie supplémentaire du chromosome 21 et touche 1 naissance sur 600 à 800. Il se caractérise par des déficiences intellectuelles : les personnes atteintes de SD ayant des difficultés d'apprentissage et de mémorisation qui sont liées à des défauts dans le développement et le fonctionnement du cerveau. L'amélioration des soins apportés aux personnes atteintes du SD a permis d'augmenter considérablement leur espérance de vie. Cette augmentation a mis en évidence chez ces personnes un risque accru de développer, de façon précoce, une maladie d'Alzheimer (MA). En effet, il a été constaté que près de 100% des personnes atteintes de SD présentent les caractéristiques de la MA à 40 ans.

Afin de pouvoir étudier les mécanismes physiopathologiques du SD et des pathologies qui lui sont associées, différents modèles de rat ont été créés. En effet, le rat est physiologiquement et génétiquement proche de l'Homme. Ainsi, chez le rat, les régions homologues au chromosome 21 humain se trouvent sur 2 chromosomes différents : le chromosome 11 et le chromosome 20. Nous avons ainsi généré 9 modèles de rats présentant une trisomie de l'une ou des 2 régions homologues au chromosome 21 humain ou de gènes spécifiques, présents dans ces régions et qui semblent jouer un rôle important dans le développement du SD. Le but de ces modèles est de nous permettre de mieux comprendre le rôle de ces régions/gènes dans le développement du SD et des pathologies associées telle que la MA.

Le SD, tout comme la MA, affectent le cerveau. Nous souhaitons donc étudier l'impact de ces différentes trisomies dans le cerveau de nos modèles. En effet, nous souhaitons étudier la morphologie du cerveau et mettre en évidence de potentielles anomalies structurales/cellulaires. De plus, ces 2 pathologies sont évolutives au cours du temps, les déficits cognitifs s'accroissant avec l'âge. Par ailleurs, la MA est une maladie liée à l'âge, elle n'apparaît que tardivement dans la vie. Il nous semble donc indispensable d'étudier nos modèles à différents âges afin de pouvoir suivre l'évolution de ces pathologies au cours du temps.

Nous souhaitons ainsi réaliser des analyses histologiques (observations au microscope) chez nos différents modèles afin d'étudier la constitution interne du cerveau. Pour ce faire, il est nécessaire de réaliser une perfusion de l'animal. Nous allons ainsi perfuser de la paraformaldéhyde, qui est un fixateur des tissus, via la circulation sanguine, cela permettra de conserver les tissus, dont le cerveau. Cette procédure est réalisée sous anesthésie générale afin qu'aucune douleur ne soit générée. Il s'agit de la seule technique nous permettant d'être dans des conditions optimales pour les études que nous souhaitons réaliser par la suite.

Réduction : Dans le cadre de ce projet 9 modèles de rats génétiquement modifiés seront utilisés. Tenant compte du principe de réduction, nous utiliserons un nombre minimal d'animaux (504) estimé pour avoir des résultats scientifiquement interprétables. Dans le but d'utiliser l'ensemble des animaux produits et de prendre en compte une éventuelle variabilité sexuelle, nous utiliserons des mâles et des femelles.

Raffinement : Aucune douleur n'est attendue pour cette procédure réalisée sous anesthésie générale.

Par ailleurs, tout au long de leur vie, les animaux seront hébergés par 2 et disposeront d'un bâton à ronger comme enrichissement. Ils feront l'objet d'un suivi quotidien permettant de s'assurer de leur bien-être et de leur santé, en particulier chez les animaux à un âge avancé pouvant déclarer certains problèmes de santé liés à l'âge. Si un animal présente des signes de douleur ou de mal-être, il sera présenté au vétérinaire puis, si un traitement est envisageable, il sera mis en place. Dans le cas contraire, l'animal sera mis à mort.

Remplacement : Il n'existe à l'heure actuelle pas d'alternative à l'utilisation des animaux pour les études concernant le cerveau. En effet, il n'existe pas encore de modèle de cerveau in vitro ou autre permettant de réaliser de la recherche fondamentale dans ce domaine.

17628 L'objectif de ce projet est de produire, à partir de sérum de lapin, un immunosuppresseur sélectif utilisé pour lutter contre les rejets de greffe chez l'Homme en période pré et post opératoire, ainsi que pour traiter l'aplasie médullaire.

Le médicament est utilisé depuis les années 1980 (usage hospitalier uniquement). L'AMM définit le protocole de production du médicament et fige les modalités d'obtention de la matière active (dispositions communes à tout dossier réglementaire lié à l'agrément d'un médicament).

Le recours au lapin en tant qu'animal producteur d'anticorps polyclonaux a été évalué lors du développement du produit.

Le nombre total de lapins nécessaires à ce projet est de 152000 animaux pendant 5 ans.

La mise en oeuvre de la règle des 3R (art R214-105) sera respectée selon :

- l'application d'une procédure expérimentale définie pour obtenir la plus grande quantité de sérum (contenant la concentration requise en anticorps) possible par animal ; l'utilisation des lapins mâles et femelles, (REDUCTION)
- l'absence de modèle alternatif au lapin pour la production des anticorps polyclonaux à l'heure actuelle des connaissances scientifiques, (REMPACEMENT)
- l'utilisation d'un hébergement adapté (respectant le Bien Etre Animal et bénéficiant d'un enrichissement sous forme de bûchettes de bois à ronger) ; la réalisation du suivi quotidien des animaux par des personnes expérimentées et formées régulièrement ; une prise en compte et une évaluation de la souffrance animale en référence à une grille fixant les points limites et permettant de cesser l'expérimentation immédiatement sur tout lapin présentant des signes de souffrance dépassée ; une prise en charge de la douleur des animaux au cours de la procédure avec l'application d'un protocole d'anesthésie validé lors du dernier prélèvement de sang (RAFFINEMENT).

17629 La mise en œuvre de ce protocole vise la compréhension et l'identification de l'anatomie et de la fonction des circuits neuronaux impliqués dans la peur apprise chez la souris. Les objectifs principaux de ce protocole sont triples : premièrement, l'utilisation de modèles comportementaux permettant l'étude de la peur (conditionnée) chez le rongeur vigile, deuxièmement, l'identification et la manipulation des structures cérébrales et circuits neuronaux permettant l'expression et/ou l'inhibition des réponses comportementales de peur et troisièmement la caractérisation anatomique de ces circuits. L'utilisation d'un modèle comportemental chez le rongeur permettant l'étude des structures cérébrales et circuits neuronaux impliqués dans les réponses de peur nous permettra à terme le développement de nouvelles cibles thérapeutiques pour des pathologies telles que l'anxiété ou le syndrome de stress posttraumatique.

Le respect de la règle des trois R :

- Remplacer : ce protocole nécessite l'utilisation d'animaux. En effet, l'identification des structures cérébrales et des circuits neuronaux impliqués au cours de la peur nécessite l'utilisation d'un cerveau intact chez l'animal vigile. Des méthodes in vivo telles que la culture cellulaire ou bien les coupes de cerveau ne contiennent pas les connexions neuronales qui sont le sujet de nos travaux. Il n'existe donc pas de méthodes alternatives.
- Réduire : le nombre d'animaux a été calculé par l'estimation de la variance observée avec ce type de données permettant d'atteindre une signification statistique. Ce nombre est donc de 15 souris par groupe, soit un total de 1800 souris pour la réalisation de ce protocole.
- Raffiner : Afin de réduire au minimum la souffrance des animaux, les procédures suivantes seront utilisées. Nous appliquons également systématiquement un traitement antalgique (Métacam, 0.01 ml, 5mg/kg, i. p.) avant et trois jours suivant les actes chirurgicaux. Les chirurgies sont réalisées sous anesthésie gazeuses (isoflurane). Pour limiter les dommages et contraintes subis par l'animal, nous avons définis des critères d'observation qui permettent d'évaluer l'état de santé et le bien-être des souris. Si les points limites que nous avons fixés sont franchis, l'expérience est immédiatement interrompue et l'animal concerné est euthanasié. Cette évaluation est réalisée quotidiennement à partir du moment où l'animal est isolé en cage individuelle et rentre dans la phase expérimentale.

Ces mesures ont lieu lors de la manipulation journalière des animaux. Les mesures sont consignées dans un cahier d'expérience prévu à cet effet. L'évaluation du poids de l'animal est effectuée de façon journalière à partir du moment où l'animal est isolé en cage individuelle et rentre dans la phase expérimentale. Ces mesures ont lieu lors de la manipulation journalière des animaux. Les mesures sont consignées dans un cahier d'expérience prévu à cet effet.

17630 Les déficiences intellectuelles (DI) correspondent à un arrêt total ou partiel du développement mental apparaissant avant l'âge adulte et affectant les fonctions cognitives tel que l'apprentissage, la mémoire, le langage, mais aussi la motricité et les habiletés sociales. Ici, nous nous intéressons à un gène impliqué dans un syndrome de DI avec épilepsie. Les personnes atteintes par cette pathologie présentent une microcéphalie indiquant une atteinte au niveau de la prolifération et ou la mort cellulaire au cours du développement du cerveau. De plus un déficit au niveau de la population de neurones GABAergiques est proposé pour expliquer l'épilepsie.

Dans ce projet, nous voulons étudier la prolifération des neurones GABAergiques dans quatre modèles différents : un modèle de surexpression, un modèle d'inactivation, un modèle avec mutation et un modèle d'inactivation conditionnelle de ce gène dans les neurones GABAergiques.

Pour cela, nous utiliserons comme marqueur une molécule qui peut s'incorporer dans l'ADN au cours de la réplication cellulaire et qui permettra de marquer les cellules en division. Pour cette analyse, des femelles gestantes recevront une injection du marqueur et les embryons seront prélevés à différents stades après l'injection afin de d'analyser la prolifération neuronale au cours du développement. Pour chacune de ces études, 3 périodes clefs de la neurogenèse embryonnaire seront analysées.

Remplacement : La compréhension des mécanismes physiologiques et moléculaires ainsi que les origines développementales des pathologies génétiques associées à des retards mentaux requièrent l'étude d'un organisme vivant dans son intégrité et sa globalité. A ce jour, il n'existe pas de méthode autre que l'étude in vivo. La souris est une espèce physiologiquement et génétiquement proche de l'Homme dans laquelle nous pouvons réaliser les manipulations génétiques pour obtenir ces modèles de pathologies humaines.

Réduction :

Pour ces analyses, nous aurons besoin de 8 embryons par génotype, par objectif et par stade embryonnaire. Ce nombre correspond au nombre minimal d'échantillons nécessaire pour obtenir des résultats exploitables au niveau statistique. Dû à l'insertion d'un marqueur des neurones GABAergique, 1/4 embryon seulement aura le génotype attendu pour les trois premiers modèles et 1/8 pour le modèle d'inactivation conditionnelle du gène. Sachant que les femelles que nous utilisons produisent en moyenne 6 embryons par portée, il nous faudra 144 femelles pour l'étude des 3 premiers modèles et 96 femelles pour le modèle d'inactivation conditionnelle. Nous utiliserons donc 240 femelles et 15 mâles, pour un total de 255 animaux.

Raffinement : Un suivi des animaux sera réalisé durant la période gestationnelle où aura lieu le traitement. Un suivi particulier sera fait au point d'injection dans les trois jours qui suivent l'injection afin de mettre en place un traitement antiseptique si nécessaire.

17631 Le vieillissement se caractérise par une diminution des fonctions physiologiques et cognitives. Ces déficits sont plus ou moins prononcés et peuvent mener à un vieillissement pathologique (maladie d'Alzheimer ou de Parkinson). Certains facteurs de risques tels que l'exposition à des pesticides augmentent le risque de développer un vieillissement pathologique.

Le chlordécone est un pesticide qui a largement été utilisé aux Antilles pour lutter contre le charançon du bananier. Les propriétés hautement toxiques de cette substance envers l'écosystème ont conduit à son interdiction de fabrication et d'utilisation (convention de Stockholm, 2009). Néanmoins, la contamination antérieure des sols antillais demeure particulièrement importante et devrait se prolonger pendant les 5 à 7 siècles à venir. En outre, plus de 90% de la population antillaise montre des taux détectables de chlordécone dans le sang et les travailleurs agricoles exposés à ce pesticide présentent des symptômes neurologiques similaires à ceux retrouvés dans

la maladie de Parkinson (tremblements, troubles de la coordination, altération de la mémoire et anxiété...). Plusieurs études épidémiologiques (Timoun, Ibiscus...) ont également révélé chez les enfants Antillais un lien entre l'exposition au chlordécone et la survenue de troubles cognitifs précoces, ainsi que des retards dans les développements moteurs ou visuels. Malgré toutes ces observations, il y a encore très peu de données mécanistiques sur les effets ou mode d'action de ce pesticide sur les fonctions cérébrales.

L'objectif de ce projet est donc d'évaluer, chez la souris, les effets comportementaux induits par une exposition au chlordécone, avec un focus particulier porté sur les fonctions motrices et mnésiques. Cette étude comprendra 36 souris âgés de 4 mois. La moitié sera exposée au chlordécone et l'autre moitié serviront de contrôle. Une étude comportementale permettra d'évaluer les fonctions motrices et les fonctions de mémoire. Cette étude comportementale sera suivi d'un test de tolérance au glucose (marqueur du diabète) et d'une analyse des cerveaux de ces souris afin d'évaluer les mécanismes d'action du chlordécone sur les fonctions cérébrales.

L'effectif de chaque groupe a été déterminé statistiquement pour observer des effets avec un nombre minimal d'animaux (Réduction). Ce type d'étude ne peut être réalisé que sur des animaux vivants (Remplacement). Afin de permettre un suivi rigoureux par animal, chaque souris sera placée en cage individuelle sur toute la durée du projet. Ces cages seront munies d'éléments d'enrichissement, permettant d'offrir aux animaux la possibilité d'évoluer en espaces clos, type de milieu préférentiel chez des rongeurs (Raffinement). Le bien-être des animaux sera évalué quotidiennement par observation de tout comportement pouvant suggérer la présence d'une douleur (Raffinement). La prise en compte de points limites appropriés permettra de stopper l'expérimentation en cas de survenue de signes de souffrance. Les points limites définis sont une perte de poids de plus de 15% du poids initial (les animaux seront pesés quotidiennement), un arrêt de la prise alimentaire, un état général persistant (4 jours) renseigné par les changements d'apparence ou de signes comportementaux traduisant une évolution vers la morbidité.

L'ensemble de cette étude permettra d'identifier les mécanismes neurotoxiques impliqués afin de mettre en place de futures stratégies thérapeutiques adaptées aux effets neurologiques délétères induits par ce polluant.

17632 Le cancer est aujourd'hui un fléau mondial. Selon le dernier rapport de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), le fardeau mondial du cancer est aujourd'hui estimé à 18,1 millions de nouveaux cas et 9,6 millions de décès recensés en 2018. Nous allons nous intéresser ici plus particulièrement au cancer cérébral (glioblastome) ainsi qu'au cancer du foie (carcinome hépatocellulaire).

Le glioblastome est la tumeur cérébrale maligne la plus fréquente chez l'adulte avec une prévalence plus importante chez l'homme que chez la femme. En France, il est estimé que 5000 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année. La formation du glioblastome est provoqué par une prolifération anormale de cellules du système nerveux central. L'espérance de vie, post-diagnostic, se situe aux alentours de 15 mois malgré l'utilisation de la chirurgie combinée à une thérapie médicamenteuse.

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est un cancer primitif du foie. En France, l'incidence annuelle en 2012 a été estimée à 12. 4/100 000 pour l'homme et à 2. 4/100 000 chez la femme. Ce type de cancer touchant à 75/80% des cas des patients atteints de cirrhose, le dépistage se fait chez ces patients par échographie semestrielle, ce qui permet généralement un diagnostic au stade curable dans plus de 70% des cas. Néanmoins, tout comme pour le glioblastome, il existe aujourd'hui un réel besoin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Plusieurs facteurs sont à l'heure actuelle au centre d'intérêt tels que l'inflammation (inflammasome) et différentes métaboliques (lactate, hexosamines) dans le développement du cancer du cerveau ou du foie via des cellules du système immunitaires (microglies et les macrophages). (1) Les inflammasomes sont des complexes protéiques centraux à l'immunité innée. A ce jour, 8 différents inflammasomes ont été caractérisés. Nous proposons que les inflammasomes jouent un rôle potentiel dans le développement de ces cancers. (2) Parallèlement aux inflammasomes, le lactate, dérivé produit dans un environnement pauvre en oxygène (ce qui est le cas dans le cadre de la

tumeur et du micro-environnement tumoral) aurait un impact sur les cellules immunitaires, présentes dans l'environnement tumoral et ayant un rôle régulateur. (3) Dernièrement, la voie des hexosamines (HBP) aurait potentiellement un rôle sur les cellules immunitaires via une enzyme impliquée dans cette voie.

Pour déterminer l'implication de ces différentes voies métaboliques et inflammatoires dans le développement du cancer, nous comptons induire des tumeurs cérébrales ou hépatiques dans différents modèles de souris génétiquement modifiés et suivre l'évolution tumorale et l'effet sur les cellules immunitaires.

Afin de réaliser l'ensemble de nos expériences, 1680 souris sont demandées sur une période de 5 ans. Dans le respect des règles des 3R,

Remplacer : Des méthodologies de culture cellulaire et de modélisation in vitro ont été mises en place afin de remplacer au possible l'utilisation d'animaux pour répondre à certaines questions spécifiques à ce projet. Cependant seul un modèle in vivo chez la souris récapitulant les éléments de la physiopathologie du glioblastome et regroupant les multiples acteurs de l'immunité innée/adaptative observés chez l'homme, permettra de vérifier l'hypothèse sur l'implication de l'inflammasome, de la voie HBP ainsi que du lactate dans le développement du glioblastome.

Réduire : Pour nos expériences, nous avons prévu le nombre nécessaire et suffisant d'animaux, pour garder une puissance statistique dans le traitement des résultats et avoir le nombre de contrôles internes obligatoires, pour prouver l'efficacité des molécules thérapeutiques utilisées. De plus nous utilisons les animaux mâles et femelles ce qui réduit de 50% l'utilisation des animaux.

Raffinement : Afin de respecter la notion de raffinement, et éliminer ou réduire toute douleur, souffrance, angoisse, ou tout dommage durable, susceptible d'être infligé aux animaux, leur bien-être et leur souffrance seront pris en compte quotidiennement de leur naissance à leur mort et évalués par le personnel zootechnique expérimenté. Ainsi, pour chaque procédure impliquant une douleur supérieure à celle d'une piqûre, les animaux seront anesthésiés. De plus, chaque cage (type 4L avec 10 souris par cage) recevra du matériel pour nidifier dans le but de rétablir le répertoire comportemental des souris.

17633 La schizophrénie est une maladie psychiatrique caractérisée par un ensemble de symptômes très variables (les plus impressionnants sont les délires et les hallucinations, mais les plus invalidants sont le retrait social et les difficultés cognitives) dont la prise en charge reste difficile. Ces troubles sont caractérisés entre autre par la dérégulation de la neurotransmission dopaminergique. En effet, le récepteur à la dopamine D2 (D2R) représenterait une cible majeure des antipsychotiques, une classe de médicaments pris par les personnes souffrant de cette pathologie.

Ce projet a pour but 1) d'identifier/ étudier les neurones cibles (c'est-à-dire exprimant les récepteurs dopaminergiques) dans l'hippocampe, une région du cerveau impliquée dans la mémoire en général, dont la reconnaissance et interaction sociale, et 2) de préciser le rôle fonctionnel des D2R et des neurones exprimant ce récepteur dans certaines formes de mémoire et de comportements sociaux. Ce projet nous permettra d'avoir une vision plus complète de l'ensemble des fonctions dopaminergiques via D2R au sein de l'hippocampe, permettant peut-être ainsi le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

La réalisation de notre projet repose sur l'utilisation de nombreuses lignées de souris transgéniques. 1) des souris transgéniques exprimant l'enzyme Cre recombinase (sst-cre, sst-cre :ai14, D2-cre, PV-cre, PV-cre :AI14), nous permettant ainsi d'identifier les neurones d'intérêt et d'invalider par recombinaison homologue (système Cre/Lox) notre protéine d'intérêt le D2R (phénotype non délétère), et 2) des modèles de souris ayant certains symptômes schizophréniques : les souris DISC1-L100 et GRM3 KO (phénotype non délétère).

Le nombre total de souris prévu pour cette étude est de 1357 sur une période de 4 ans. Ce nombre a été déterminé de manière à RÉDUIRE au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées. Des mâles seront utilisés, ainsi que tous les animaux d'une même portée afin de limiter le nombre d'animaux générés sans être utilisés pour l'expérimentation. Le projet traitant de troubles

neurologiques et nécessitant des approches comportementales, il nous est impossible de REMPLACER l'animal vivant par des méthodes alternatives. Enfin, en vue du RAFFINEMENT des procédures, un soin particulier sera apporté aux questions relatives au bien-être animal. Les cages d'hébergement transparentes seront enrichies avec des carrés de cellulose permettant aux animaux de construire leur nid. Les animaux ne seront pas isolés (sauf lors du test de conditionnement à la peur) pour permettre de diminuer le plus possible le niveau d'anxiété. Le niveau d'anxiété/stress sera surveillé quotidiennement. Avant les expériences comportementales, les animaux sont manipulés fréquemment afin de les habituer aux expérimentateurs et réduire ainsi leur stress. Enfin, les animaux sont surveillés étroitement pendant toute la durée des expériences pour éviter toute souffrance inutile, dans le cadre de la mise en place de points limites spécifiques et adaptés (Annexe 1). 5 composantes seront évaluées : apparence (qualité du poil, propreté des yeux et du nez), évolution du poids, attitudes (postures et réactions à l'expérimentateur), signes cliniques (température et respiration) et comportements spontanés).

17634 La myéline est une gaine essentielle à la fois pour l'isolation et la protection de chaque nerf du système nerveux central et périphérique. Tout défaut de myéline est associé à des pathologies dites neuropathies. A l'heure actuelle, les causes de ces défauts de myéline sont souvent inconnues et les traitements curatifs inexistantes. Afin de mieux comprendre les causes et pouvoir trouver de nouvelles solutions thérapeutiques, nous nous intéressons à une protéine identifiée chez la souris et/ou le poisson zèbre, appelée Adcy6. De manière intéressante, chez l'Homme, cette dernière est responsable dans un cas d'arthrogrypose congénitale héréditaire (raideur des articulations, plus communément appelée immobilité fœtale) associé à un défaut de myélinisation du système nerveux périphérique.

Dans les tissus, la fonction d'Adcy6 est très souvent associée à une protéine assez similaire appelée Adcy5. Nous voulons donc étudier le dialogue entre ces 2 protéines et leur action précise dans la formation de la myéline. Les multiples tissus impactés et l'interaction entre différents types de cellules impliquées dans la mise en place du système nerveux périphérique est donc nécessaire pour faire cette étude et nécessite donc un organisme entier mammifère. Aucun système cellulaire ne peut rendre compte de la physiologie du développement qui fait intervenir des interactions cellulaires et molécules informatives circulantes (hormones, cytokines). De plus, une partie de notre étude demande l'analyse d'une lignée de cellules spécifiques indispensable pour nos études, qui n'est possible que chez le rongeur. L'avantage du modèle souris est que le contexte physiologique (hormones, nutriment, oxygénation) est respecté et permettra de suivre le développement de la pathologie humaine. Aucun autre modèle mammifère n'est aussi adapté à l'étude d'un tissu/organe en développement. L'objectif principal du projet est donc d'évaluer l'impact de la perte d'Adcy6 chez la souris déficientes adcy5 à la naissance et durant ses premières semaines de développement (jour 1, 4, 10, et 21). Nous allons donc analyser la formation du nerf sciatique comme nerf de référence par différentes techniques biologiques.

La règle des 3 R sera appliquée le long de ce programme de recherche. Les souris ne subiront aucune contrainte ou dommage volontaire. L'hébergement sera adapté au mieux avec accès à l'eau et à la nourriture. Au jour défini, les souris seront sacrifiées et les tissus seront prélevés pour des expériences ultérieures (REMPLACEMENT). Cette étude sera menée en parallèle d'un modèle de poisson zèbre et de culture de cellules (à partir des tissus prélevés) afin de remplacer et/ou réduire au maximum le nombre des souris, tester des produits pharmacologiques et orienter au mieux les expériences sur le nerf sciatique. De plus, le nombre d'animaux sera réduit à 6 par point expérimental, le minimum requis lors de nos travaux précédents de façon à mettre en évidence des différences statistiques avec un risque d'erreur moins que 5%. La méthodologie expérimentale est optimisée pour utiliser le strict nécessaire d'animaux, appartenant à la même lignée puisqu'un même animal servira au moins à 2 analyses (REDUCTION). Un hébergement adapté, une surveillance quotidienne et la mise en place de points limites (mise à mort dès les 1^{er} signes de souffrance ou d'immobilité fœtale) contribueront au RAFFINEMENT. Le nombre total d'animaux qui seront utilisés dans ce projet est de 336.

17635 La sclérose en plaques (SEP) est une maladie dans laquelle la réponse immunitaire est altérée. Ceci engendre une atteinte de la gaine de myéline (démýélinisation) du système nerveux central, qui à terme conduit à une perte des fibres nerveuses et à un handicap irréversible chez les patients. Un des défis majeurs dans la SEP est de mieux comprendre les mécanismes de la démýélinisation. Pour atteindre cet objectif, il est important d'étudier des molécules clefs comme les facteurs de transcription. Notre équipe a identifié un nouveau facteur, Gcm2, exprimé dans le système immunitaire. Nos récentes études suggèrent un rôle clef de Gcm2 dans le contrôle de la réponse inflammatoire. Nous proposons d'étudier le rôle de ce facteur de transcription dans une souris dans laquelle la protéine a été éliminée spécifiquement dans le système immunitaire. Cette approche innovante ouvrira la voie à une étude dans un modèle murin de la SEP et à de nouvelles perspectives thérapeutiques.

Pour ce projet, nous utiliserons sur 5 ans un total de 180 souris.

La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée sur le terrain :

1) réduction : le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum pour nous permettre de générer des données statistiques solides ;

2) raffinement : les procédures prennent en compte des temps de récupération et des nombres d'essais visant à réduire le stress et la fatigue des animaux ;

3) remplacement : les études in vitro et sur animaux invertébrés ne permettent pas l'étude de processus biologiques complexes comme la réparation des lésions de la myéline. Le rongeur est donc l'une des espèces les plus appropriées pour ce type d'étude.

17636 L'idée que la vaste majorité des maladies humaines ne sont ni le résultat d'une exposition environnementale isolée ni celui de la mutation d'un gène unique est bien connue : le plus souvent, des facteurs de risque génétiques et environnementaux se conjuguent. Parmi les anomalies congénitales qui résultent d'une interaction gènes–environnement, les malformations cardiaques sont fréquemment mentionnées mais les mécanismes physiopathologiques et les interactions gènes-environnement associés ne sont pas bien connues. Il est établi qu'un diabète maternel présent avant ou pendant la grossesse est associé à un plus grand risque de développer une maladie cardiovasculaire congénitale (risque augmenté par 5). Le diabète gestationnel apparaît au 6ème mois de grossesse, est souvent transitoire et moins sévère que les diabètes de types I et II. Les 3 formes d'hyperglycémie maternelle (diabète de type I, II et gestationnel) sont associées à diverses malformations cardiaques congénitales. Les mécanismes moléculaires associés à ces anomalies sont mal compris. Notre étude a pour objectif de mieux comprendre l'étiologie de ces malformations en utilisant la souris comme modèle d'étude.

Pour cela, nous utiliserons des souris femelles diabétiques et des mâles sains mais susceptibles de transmettre une prédisposition génétique aux malformations cardiaques. Nous analyserons le phénotype cardiaque des embryons et fœtus issus de ces croisements à différents stades développementaux.

Le diabète maternel sera provoqué grâce à un modèle murin transgénique bien décrit dont la sécrétion d'insuline est rapidement bloquée par l'expression du gène Kir6. 2 muté. Il s'agit d'un modèle inductible dont l'expression de la protéine mutée se fera spécifiquement dans les cellules des îlots pancréatiques (modèle bêta-V59M). L'induction du modèle sera réalisée par une injection sous cutanée de tamoxifène (médicament bien connu) qui devrait engendrer peu de douleurs aux animaux et remplacement de l'eau de boisson par de l'eau sucrée. Afin de vérifier l'efficacité de l'induction du diabète, la glycémie sera mesurée 2 et 7 jours après l'injection de tamoxifène par prélèvement d'une goutte de sang au niveau de la queue. Les femelles identifiées comme diabétiques seront alors mises en accouplement 7 jours après l'injection puis sacrifiées aux stades développementaux d'intérêt. Les embryons et fœtus ne devraient pas présenter de signes de souffrance au cours de la gestation et seront immédiatement mis à mort pour prélèvement de tissus après sacrifice de la femelle.

Ce projet impliquera l'utilisation de 540 femelles élevées dans un établissement utilisateur agréé, dans des pièces thermorégulées avec un cycle 12h lumière/12h obscurité. Afin de respecter leur

instinct grégaire, les souris seront stabulées en petits groupes avec une densité par cage conforme à la réglementation (au maximum 5 souris par cage de 542 cm²) et leur environnement sera enrichi par des maisonnettes en carton ou des bandelettes de kraft. Seuls les mâles reproducteurs devront être isolés pour limiter les agressions liées à la dominance. Pour limiter leur stress, deux types d'enrichissement seront mis dans la cage. Un suivi zootechnique quotidien sera réalisé (état général des animaux, niveau de nourriture et boisson) et le changement de litière sera réalisé tous les 10 à 15 jours.

Un suivi de la glycémie sera réalisé deux fois sur la première semaine après induction chez les femelles diabétiques. De plus, une grille d'évaluation prenant en compte différents paramètres (suivi du poids, l'état du pelage, présence de blessures et l'atteinte locomotrice) sera remplie au minimum deux fois par semaine. En fonction du score établi, des actions seront entreprises pour réduire la douleur, l'angoisse ou la souffrance des animaux et ne pas franchir les points limites définis pour l'étude. Dans cette étude, nous n'avons pas recours à l'administration d'analgésiques et anesthésiques, une procédure pouvant impacter sur le développement embryonnaire compte tenu de l'interaction gènes-environnement et des effets épigénétiques sous-jacents. Dans le cas d'une souffrance légère, la surveillance de l'animal sera renforcée avec une observation bi journalière. L'eau complétée en sucrose sera remplacée par une eau sans sucrose enrichie en pyruvate 1% jusqu'à la fin du protocole expérimental.

Nous avons déterminé le nombre de nos souris afin de correspondre au concept des 3R (réduire, raffiner, remplacer).

- Raffinement : Le modèle animal de diabète pré gestationnel qui sera utilisé est un modèle parfaitement caractérisé dans la littérature et est un excellent modèle au regard de la pathologie humaine. Par ailleurs, le protocole a été planifié de façon à limiter au maximum tout stress et tout inconfort pour les animaux. Notamment, les prélèvements sanguins nécessaires aux mesures de la glycémie, seront limités à un volume de 10 µl par animal. Ceci est rendu possible par l'utilisation de glucomètre à bandelettes réactives. Un enrichissement du milieu de vie sera assuré par l'ajout bandelettes de kraft et/ou de maisonnettes en carton. Enfin, bien que le protocole soit relativement peu invasif, un suivi journalier des animaux permettra une action rapide en cas d'atteinte des points limites établis.

- Réduction : Le nombre d'animaux utilisés par groupe a été défini comme le nombre minimum nécessaire pour être en mesure de mettre en évidence une différence statistiquement significative sur les paramètres étudiés.

- Remplacement : L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe aucune méthode de substitution n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude d'une surcharge en glucose sur le développement du cœur.

17637 Les herpèsvirus équin de type 1 et 4 (EHV-1 et 4) sont responsables chez les chevaux de rhinopneumonies (forme principale de la maladie), mais aussi de complications secondaires plus graves (avortement infectieux, atteintes neurologiques (encéphalomyélopathies)). Les herpèsvirus équin représentent donc un problème majeur en termes de santé équine et d'impact économique. S'il existe des vaccins efficaces contre la forme respiratoire de la maladie, les réponses induites par ces vaccins ne protègent peu ou pas les chevaux contre les formes les plus graves. Les corrélats de protection étant connus, la problématique de la vaccination contre les EHV-1 et 4 offre un contexte unique pour évaluer de nouveaux adjuvants vaccinaux. Le développement de nouveaux adjuvants est devenu un enjeu majeur en santé humaine et vétérinaire. L'objectif de ce projet de thèse est d'évaluer 3 nouveaux adjuvants et de caractériser leur mécanismes immunostimulateurs in vitro chez l'espèce cible (équidés). Ces adjuvants seront ensuite évalués dans le contexte de la vaccination contre les herpèsvirus équin de type 1 et 4, un excellent modèle vaccinal chez l'espèce cible, qui permettra d'améliorer la prévention contre cette maladie tout en s'inscrivant dans le concept one-health. Notre approche prend en compte les obligations réglementaires. 1-Remplacer : Au regard de la complexité des réponses immunitaires qui vont être mesurées et en l'absence de lignées cellulaires équin disponibles pour mesurer ce type de réponse, le recours à des cellules primaires issues de sang périphérique de cheval et/ou poneys est incontournable. 2-Réduire : Pour

ce projet, nous avons prévu d'utiliser les prélèvements sanguins issus de 3 chevaux, nombre minimal pour une répétabilité biologique des expériences. 3-Raffiner : L'obtention de prélèvements sanguins, réalisé par du personnel compétent sur des chevaux entraînés pour recevoir des prises de sang sans nécessité de contention, permettra la réalisation de la phase in vitro de ce projet (i. e. analyse in vitro de la réponse des cellulaires immunitaires en présence de nouvelles molécules adjuvantes aux propriétés immunostimulatrices). Ce projet a pour but d'évaluer les caractéristiques adjuvantes de 3 molécules/composés chez l'espèce cible (les équidés).

17638 La narcolepsie chez le rat

Mots clés: sommeil, narcolepsie, vigilance, cataplexie.

Durée du projet: 3 ans. Type de projet : Recherche fondamentale.

Nombre d'animaux nécessaires : 48 rats.

Le projet contient une procédure. Compte tenu du traitement chirurgical fait aux animaux, le degré de sévérité prévu pour la procédure expérimentale est modéré. Toutefois, la procédure de chirurgie est maîtrisée et ne devrait pas engendrer d'effet néfaste. Le suivi post-opératoire permet de palier à toute éventualité. Un suivi quotidien du bien-être des animaux sera également réalisé.

La narcolepsie est une maladie neurologique rare dont les principaux symptômes sont l'hyper-somnolence en journée, un mauvais sommeil de nuit et des cataplexies. La cataplexie est une perte de tonus musculaire pendant l'éveil, déclenchée par le rire ou la surprise, qui s'accompagne souvent de la chute de la personne. C'est une maladie handicapante ayant un fort impact négatif sur la qualité de vie des patients.

Aucune cure n'existe à ce jour et les traitements disponibles sont symptomatiques, basés sur l'utilisation de stimulants pour favoriser l'éveil et d'antidépresseurs pour réduire l'apparition des cataplexies. Ces traitements sont d'une efficacité modérée, peu spécifiques et contraignants.

L'objectif de notre projet de recherche est de valider un modèle unique de rats narcoleptiques qui sera adapté à l'utilisation de la technique d'enregistrements électrophysiologiques multi-unitaires multi-sites pour étudier l'activité neuronale de plusieurs structures cérébrales ainsi que la dynamique du réseau neuronal impliqué dans la cataplexie, un symptôme majeur de la narcolepsie. Un modèle animal similaire de narcolepsie est disponible chez la souris mais la petite taille de son cerveau ne nous permet pas l'implantation d'électrodes multiples sans entraver sa mobilité, paramètre essentiel à l'expression des cataplexies.

La première étape qui fait l'objet de cette demande d'autorisation de projet (DAP) aura donc pour objectif de valider le modèle de rat narcoleptique par des enregistrements polysomnographiques permettant de valider la présence d'une fragmentation du sommeil et de cataplexies. Si le modèle de rat s'avère performant et est validé, une deuxième DAP sera déposée afin d'étudier la dynamique cérébrale et apporter les éléments scientifiques nécessaires au développement de traitements innovants.

Dans le cadre de cette DAP, chaque animal ne sera soumis qu'à une seule et unique procédure expérimentale avec mise à mort requise pour les analyses post-mortem sur le cerveau, éliminant toute possibilité de réutilisation.

Nous répondrons explicitement aux principes et exigences des 3R :

Remplacement: Il n'existe pas à ce jour de modèles in vitro d'études du sommeil. Le sommeil comme les cataplexies sont des phénotypes complexes nécessitant l'animal entier vivant. Nos travaux seront conduits chez le rat. Les réseaux neuronaux responsables du sommeil et de l'éveil que nous ciblons sont communs aux mammifères, incluant les rongeurs et l'homme. Ils sont aujourd'hui bien identifiés.

Réduction: Le nombre d'animaux prévu est légitimé par le besoin de choisir les meilleurs fondateurs qui seront à l'origine de deux lignées originales de rats narcoleptiques. Il tient compte des erreurs et échecs aux différentes étapes des procédures appliquées aux animaux. Pour la durée complète du projet, il est prévu un total de 48 animaux, répartis en 6 lots expérimentaux. La taille respective

des lots a été calculée de manière à ne pas compromettre les objectifs scientifiques et la significativité des données (petits échantillons).

Raffinement: Par notre expérience d'utilisateurs d'animaux à des fins scientifiques, nous sommes conscients que l'étude du sommeil qui constitue notre corps de métier au laboratoire requiert des animaux constamment placés dans les meilleures conditions psycho-physiologiques. Les cataplexies ne s'expriment que si les individus, les souris comme les humains, sont dans des conditions de bien-être. Il est fort probable que ce soit également le cas chez le rat. Les soins post-opératoires et les procédures expérimentales sont d'ores et déjà maîtrisés. Les expérimentations seront réalisées par des personnes compétentes, formées et suivies dans leur carrière dans le cadre de leur formation continue à l'expérimentation animale.

17639 L'administration de substances dont le but est d'augmenter les performances des chevaux de courses et de sport est dangereuse et interdite. Dans ce contexte, des méthodes d'analyses toujours plus performantes doivent être développées pour déceler les administrations de substances prohibées et/ou interdites, lors des tests de contrôle antidopage.

La Thymosine beta 4 est un peptide naturel impliqué dans diverses fonctions biologiques. Sa séquence en acides aminés est très conservée à travers diverses espèces de mammifères et on ne peut pas différencier la Thymosine beta 4 humaine de la Thymosine beta 4 équine.

Parmi les fonctions qui lui sont imputées, la thymosine beta 4 est impliquée dans les processus de coagulation, de création de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogenèse) ou encore de cicatrisation. Pour ces raisons, la Thymosine beta 4 suscite l'intérêt des chercheurs depuis de nombreuses années, en dépit de son expression ubiquitaire et importante. Ainsi, certains groupes de recherche ont pu définir les régions de la Thymosine beta 4 (TB4) responsables de ses diverses fonctions biologique et/ou pharmacologique. Il a été mis en évidence que la région 17-23 était présente à la zone de cicatrisation et promotrice de la création de nouveaux vaisseaux sanguins.

Dès lors, certaines spécialités dépourvues d'autorisations de mise sur le marché et de toute étude clinique, dénommées « T B-500 » ou « TB-1000 » sont apparues sur les plateformes de vente de produits synthétiques en ligne. Certains mentionnent une forme synthétique de la TB4, d'autres une forme de sa région 17-23 comportant une modification chimique non naturelle (Ac-TB4-17-23). Le TB-500 fait par ailleurs partie des molécules dont l'usage chez les chevaux de courses ou de compétition est strictement interdit.

Des méthodes de chromatographie liquide couplés à la spectrométrie de masse (LC/MS) ont été ainsi développées pour caractériser les produits d'intérêt et appliquer aux spécialités de TB-500 et TB-1000, L'analyse, a permis de mettre en évidence la présence soit de la TB4 intacte, soit Ac-TB4-17-23 au sein des spécialités, sans pouvoir associer de manière spécifique et systématique une forme à un nom de spécialité. En effet, plusieurs spécialités « TB-500 » analysées contiennent soit la TB4 soit l'Ac-TB4-17-23 tandis que les spécialités « TB-1000 » analysées contenaient toutes la forme Ac-TB4-17-23.

Dans ce contexte, lors des analyses systématiques de contrôle, le laboratoire cible depuis plusieurs années les deux formes « TB4 » et « Ac-TB4-17-23 » dans le plasma. Cependant, tandis que la forme Ac-TB4-17-23 est non naturelle et donc strictement absente des prélèvements issus de chevaux non traités, la TB4 est une molécule naturellement produite (endogène) et présente à des concentrations variables dans l'intégralité des échantillons plasmatiques et /ou urinaires.

Dans le cadre de l'établissement d'une stratégie de contrôle anti-dopage d'une substance endogène, il est nécessaire d'en évaluer la concentration dans les échantillons biologiques. Il serait ainsi possible de déterminer des concentrations limites pour lesquelles un prélèvement pourra être considéré comme conforme, dans le cas où sa concentration est proche d'une valeur moyenne, ou suspect, dans le cas où sa concentration est significativement éloignée des valeurs limites. Pour se faire, en plus de l'étude conduite sur un millier d'échantillons prélevés dans le cadre du contrôle (prélèvements en situation de courses ou d'entraînement), il est nécessaire de réaliser une étude de population complémentaire sur 50 chevaux connus des trois sexes au repos (mâles entiers, hongres et femelles). Deux projets sont en cours: un sur des mâles et des hongres, un autre sur

des femelles présentes sur un autre site afin de déterminer que la concentration de TB4 endogène est bien en adéquation avec celles observées dans le cadre des tests de contrôle antidopage. Cette étude est une étape indispensable à l'étude de population proprement dite qui sera réalisée sur au moins 1000 échantillons.

Dans ce projet, la règle des 3R a été suivie comme suit :

-Remplacer : cette étude ne peut être réalisée que chez l'animal vivant et sur l'espèce cible, le cheval. L'étude se fait surtout sur le plasma, mais l'urine sera aussi analysée. Il est important que toutes les analyses se fassent sur des échantillons collectés en même temps. La Thymosine β 4 est une molécule peptidique et l'analyse basée sur des échantillons collectés depuis très longtemps serait hasardeuse.

-Réduire : le nombre d'animaux impliqués est optimisé et très réduit.

-Raffiner : Les chevaux sont quotidiennement surveillés et observés. Le bien-être de chaque cheval est une priorité quotidienne du personnel.

17640 Les troubles du mouvement sont des pathologies neuromusculaires, souvent chroniques, qui handicapent durablement les patients et ont donc un impact sociétal important. La dystonie, par exemple, est un trouble qui se caractérise par des contractions musculaires involontaires pouvant entraîner des mouvements répétitifs ou des postures figées. La spasticité musculaire, quant à elle, est considérée comme une sur-contraction inhabituelle et involontaire du ou des muscles. Ce trouble du système nerveux central résulte en une crispation et une rigidité accrue du muscle touché. Le traitement de ces pathologies neuromusculaires implique généralement la prescription de traitements administrés oralement : le baclofène, les benzodiazépines, le dantrolène... Ces traitements systémiques comportent cependant tous des effets secondaires conséquents (sommolence, nausée, fatigue). Une solution pour diminuer ces effets secondaires consiste à administrer le baclofène via une pompe intrathécale ; cette approche est toutefois invasive. Alternativement, l'injection intramusculaire de certains produits directement dans le muscle affecté peut soulager ces pathologies : le phénol ou la toxine botulique. Cette approche présente de clairs avantages devant celles présentées précédemment, notamment concernant les effets secondaires. Toutefois, cette approche peut encore être optimisée : les patients et soignants attendent des myorelaxants offrant encore moins d'effets secondaires, capables d'être efficaces rapidement après l'injection, et dont les effets seraient durables. Au cours des études précédentes, nous avons identifié et caractérisé 3 candidats (FTP-101, FTP-501 & FTP-722) présentant une activité myorelaxante d'intérêt. Chacun de ces produits semble avoir des caractéristiques pharmacologiques différentes : l'un induit une myorelaxation très rapide, les autres offrent un effet plus durable. Or, selon la maladie neuromusculaire, le besoin clinique est différent, et donc chaque caractéristique est plus ou moins critique. Nous visons ainsi le développement de plusieurs produits (incluant les trois précédemment cités), car nous envisageons la possibilité de positionner chacun des produits finaux pour le traitement de différentes maladies neuromusculaires.

A terme, nous démontrerons les bénéfices de nos produits face aux produits de référence utilisés en clinique. Ce projet expérimental vise à établir un second modèle animal fonctionnel qui confirmera l'activité et le profil pharmacologique des candidats myorelaxants.

Il n'existe à ce jour pas de test *in vitro* qui permette de tester la pharmacologie locale de ces molécules (cinétique de l'effet myorelaxant) qui est l'élément clé de leur valeur clinique, ce qui justifie donc notre étude sur modèle animal. Nous avons au cours d'une étude pilote (comportant des petits groupes d'animaux) précédente obtenu des résultats prometteurs, et donc identifié un premier groupe de produits candidats avec une activité myorelaxante rapide et durable chez le rat. Nous avons utilisé durant ce pilote le test du « Digit Abduction Score » (DAS), un test reconnu comme pertinent pour mesurer l'activité myorelaxante d'un produit.

Cette étude a pour objectifs : i) de mettre en place un second modèle fonctionnel permettant de tester l'activité musculaire, ii) puis de confirmer les résultats obtenus précédemment à l'aide de ce nouveau modèle, pour nos trois candidats les plus avancés (FTP-101, FTP-501 & FTP-722). Ce second modèle consiste à utiliser une roue munie d'un compte-tour afin de suivre l'activité de course

volontaire du rongeur (rat), qui aura subi une injection de myorelaxant. La procédure d'injection est brève, indolore et peu stressante pour les animaux, ; la mesure de course est réalisée sans manipulation de l'animal (et ne comporte donc pas de course forcée). Au contraire, l'accès à une roue peut être considéré comme un enrichissement.

Concernant l'application des 3R, le remplacement ne peut pas être assuré dans cette étape du programme de travail, car la pertinence des modèles cellulaires de coculture est aujourd'hui encore débattue, et de tels modèles ne prennent de toute façon pas en compte le paramètre de diffusion (qui est essentiel lorsqu'on s'intéresse au profil pharmacodynamique des composés). Un test sur animal nous permet au contraire de mesurer l'activité myorelaxante tout en prenant en compte ce paramètre.

Pour la réduction, les études précédentes nous ont permis : d'une part de cerner une échelle de doses pertinentes pour le produit de référence ; et d'autre part de cerner la dose optimale pour chacun de nos produits candidats. Bien que cette étude implique la mise en place d'un nouveau modèle, et donc implique théoriquement un nouveau travail sur l'optimisation des doses, nous avons pu réduire le nombre d'animaux nécessaires en nous appuyant sur les études précédentes pour le choix des doses à tester.

Concernant le raffinement, les animaux seront hébergés en groupe (2 rats) avec enrichissement du milieu (bille en verre, et roue), et surveillés quotidiennement. Nos études précédentes nous a permis un raffinement de l'injection intramusculaire chez le rat : l'injection intramusculaire dans le membre inférieur est réalisée sous contention par un expérimentateur entraîné, diminuant le stress pour les animaux.

En conclusion, cette étude, prévue sur 3 ans, nous permettra donc de confirmer nos résultats sur nos trois candidats clés dans un second modèle, en utilisant au maximum 216 rats (souche Sprague-Dawley, femelles). A terme, ce modèle pourra être utilisé pour confirmer l'activité d'autres candidats, qui sont aujourd'hui à des stades plus précoces de caractérisation.

Ces données serviront de base à la conception d'un essai clinique chez l'homme.

17641 Le but de ce projet est d'évaluer l'efficacité d'un traitement pour la fibrose pulmonaire idiopathique (IPF). L'IPF est la plus fréquente des pneumopathies interstitielles idiopathiques. Son incidence est estimée entre 0,2 et 7,4/100 000/an en Europe et entre 6,8 et 17,4/100 000/an aux Etats-Unis. Son origine est encore inconnue à ce jour mais l'hypothèse est qu'une atteinte de l'intégrité de l'épithélium alvéolaire engendre une prolifération et une activation des fibroblastes. Ceux-ci vont produire de la matrice extracellulaire en excès (notamment du collagène) et entraîner la fibrose.

Le but de ce projet est d'évaluer l'effet de molécules inhibant l'activation des fibroblastes. Nous utiliserons dans ce projet des rongeurs pour lesquels nous aurons induit la pathologie avec un modèle largement décrit dans la littérature et considéré comme celui reproduisant au mieux la pathologie humaine. L'utilisation de ces animaux est nécessaire afin de contribuer au développement de traitement efficace pour l'Homme.

Dans un premier temps, ce projet a pour but de mettre au point le modèle d'induction de l'IPF chez les rongeurs (souris ou rat). Dans un deuxième temps, il a pour objectif de tester plusieurs molécules et d'évaluer leur efficacité sur le développement de l'IPF. Ces molécules auront été validées préalablement sur des cellules en culture avant d'être tester chez l'animal. Les résultats de ce projet permettront de transposer l'utilisation de ces traitements de façon plus adéquate chez l'Homme.

Ce projet aura des bénéfices pour l'Homme. En effet, l'IPF est progressive et irréversible, avec un mauvais pronostic c'est à dire une survie médiane de 2,5 à 4,5 ans. A ce jour, seules deux molécules permettent un ralentissement de la progression de la maladie mais il n'existe pas de traitement pour cette pathologie.

Afin de satisfaire aux exigences de la règle des 3R, nous avons mis en place différentes stratégies pour ce projet.

Tout d'abord dans un but de remplacement nous choisirons les molécules optimisées ayant été testé in vitro afin de ne tester chez l'animal que les molécules présentant un potentiel thérapeutique important.

Dans un but de raffinement, nous réaliserons une évaluation précise de l'état des animaux tout au long des procédures expérimentales grâce à des grilles de suivi et nous appliquerons des points limites précis. La perte de poids, qui est décrite dans ce modèle, sera suivi et prise en compte. De l'eau gélifiée enrichie sera proposée aux animaux souffrant d'une perte de poids. La détresse respiratoire attendue dans ce modèle, sera particulièrement suivie.

Dans un but de réduction, nous prévoyons l'utilisation d'un nombre d'animaux minimum mais nécessaire à des études statistiques pertinentes.

Dès leur arrivée, les animaux seront hébergés dans des cages collectives avec un environnement enrichi (igloos, briques de bois à grignoter, buchettes, commutation progressive de la lumière et interactions fréquentes avec les humains...). Boisson et nourriture seront disponibles ad libitum. Pour ce projet d'une durée de 5 ans, nous estimons que nous allons utiliser au maximum 11 988 rongeurs dans ce projet (5 994 souris et 5 994 rats).

17642 Il a été démontré et publié que, en cancérologie, plus de 45% des candidats médicaments testés favorablement pour leur efficacité chez les rongeurs, par les méthodes classiques, donnent des résultats décevants chez l'Homme, dès la phase I des essais cliniques.

Les entreprises du médicament se tournent vers notre expertise afin d'avoir accès à des modèles innovants de cancers permettant d'obtenir des données consolidées au delà des données générées en interne ou obtenues sur d'autres modèles précliniques.

L'objectif de ce projet est de déterminer in vivo les propriétés antitumorales de candidats médicaments (petite molécule ou biothérapie) afin d'identifier les traitements potentiellement efficaces en clinique. L'étude de ces candidats médicaments permettra de définir leur efficacité antitumorale ainsi que les informations nécessaires pour choisir leur posologie en vue de leur utilisation future en clinique. Ce projet se base sur l'utilisation de modèles de tumeurs humaines xénogreffées sur souris ou PDX pour Patient Derived tumor Xenografts. Ces modèles développés au cours des dernières années sont les seuls actuellement permettant de reconstituer sur animal la complexité des tumeurs humaines. Les résultats obtenus sur ces modèles permettent ainsi une réelle extrapolation en médecine humaine. Nous disposons actuellement d'une collection de plus de 150 PDX différentes représentatives des tumeurs solides.

Les étapes de validation d'un candidat médicament s'effectuent, autant que faire se peut, in vitro. Cependant, il est essentiel, avant toute administration à l'Homme, de valider le potentiel thérapeutique des candidats médicaments dans des modèles reproduisant les interactions entre les différents types cellulaires telles que les cellules endothéliales et les cellules stromales mais aussi reproduisant la diffusion sur l'ensemble de l'organisme (invasion, métastase) ainsi que les propriétés de métabolisation de l'organisme qui ont un impact significatif sur la distribution et la disponibilité des médicaments potentiels. Ces études in vivo constituent une des nombreuses étapes du développement préclinique d'un médicament mais ce travail sur organisme entier ne peut être remplacé. Seuls les candidats médicaments ayant franchi les étapes de validation in vitro seront évalués in vivo réduisant le nombre de molécules à évaluer. Les animaux seront hébergés à 5 par cage afin de réduire leur stress. Les interventions se font sous anesthésie afin de supprimer toute douleur. La méthodologie utilisée implique une surveillance quotidienne rapprochée et différents points limites adaptés strictement appliqués afin de détecter tout effet indésirable et s'assurer du bien-être des animaux et Raffiner l'étude.

Le projet dont la durée sera de 5 années sera constitué de 100 études visant à différents candidats médicaments sur différents modèles de PDX. Les études comprendront chacune 144 animaux au maximum, soit un total de 14400 animaux au maximum.

17643 La glomérulonéphrite extra-membraneuse (GEM) est une maladie rénale rare mais la plus fréquente des glomérulonéphrites chez l'adulte. Elle est caractérisée par des lésions rénales spécifiques avec

un épaissement de la membrane basale du glomérule, l'unité de filtration du rein, dû à des dépôts de complexes antigène-anticorps et de protéines du complément. Ces altérations ont pour conséquence de perturber la fonction de filtration du rein. Les protéines majeures du sang comme l'albumine et les anticorps ne sont plus retenus et sont perdus dans les urines : on parle alors de protéinurie et d'albuminémie sévère. L'évolution clinique de la maladie est complexe. Un tiers des patients guérissent spontanément, tandis que les deux autres tiers ont une protéinurie sévère persistante, nécessitant dans les formes les plus graves présentant une insuffisance rénale terminale une dialyse ou une transplantation. Ces formes graves sont traitées par des immunosuppresseurs non spécifiques avec de nombreux effets secondaires. Il n'existe à ce jour aucun traitement spécifique. Notre équipe a découvert qu'un récepteur des phospholipases A2 sécrétées, appelé PLA2R1, était la cible autoantigénique majeure de cette maladie, avec des autoanticorps anti-PLA2R1 présents chez environ 70% des patients. L'un des enjeux majeurs actuels consiste à mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques afin de développer de nouvelles solutions thérapeutiques plus ciblées. Ceci implique donc le recours à l'expérimentation animale avec la mise au point d'un modèle animal utilisable en pré-clinique. Ce projet a donc pour objectif d'établir un modèle murin de GEM. De ce fait, les méthodes alternatives usuelles de remplacement (modèles in silico ou in vitro) ne pourront se substituer aux manipulations in vivo planifiées dans ce projet.

L'utilisation d'un total maximal théorique de 2808 animaux est prévu pour ce projet. Néanmoins, nous travaillerons de manière séquentielle et certaines procédures ne seront réalisées que si les procédures précédentes sont concluantes (voir arbre décisionnel en annexe). Ainsi, en cas de résultats négatifs lors des premières étapes du projet, le nombre total d'animaux pourrait être réduit à 168.

En suivant les protocoles d'anesthésie adéquats, aucune souffrance, douleur ou angoisse ne sont à anticiper pour toutes les procédures à l'exception de celles portant sur l'étude des effets chroniques. Pour cette dernière, dans un but de raffinement, l'utilisation d'une grille d'observation permettant un suivi optimal des animaux sera mise en place (voir grille de score en annexe). Plusieurs variables seront évaluées : poids, apparence physique, comportement, température corporelle (si nécessaire) et protéinurie. La quantification de la protéinurie sera réalisée de manière séquentielle à l'aide de bandelettes afin d'avoir une idée en temps réel de l'intensité de la pathologie et ainsi améliorer le suivi et le confort des animaux.

17644 Notre laboratoire de recherche fondamentale étudie une classe de molécules trouvées dans toutes les cellules vivantes: les longs ARN non-codant (lncARN). Les cellules humaines produisent plus de 10. 000 lncARN différents. Ces molécules ont été jusqu'à récemment peu étudiées, et pour la plupart, leur fonction reste inconnue. Cependant, la dérégulation de nombres d'entre elles a été associée à différents cancers. Certains lncARN présentent même un fort potentiel comme cibles thérapeutiques ou marqueurs des différents stades de progression de ces maladies. Cependant, leur mécanisme d'action est encore non-élucidé.

Parmi ces lncARN, plusieurs sont dérégulés chez les patients souffrant de mélanome. Le mélanome est le cancer de la peau qui connaît la plus forte progression en France, avec plus de 10. 000 nouveaux cas chaque année. Il est également le plus meurtrier, avec plus de 1. 500 décès par an. Le présent projet vise à étudier un lncARN impliqué dans le mélanome et de déterminer son rôle dans le développement et la progression de la maladie.

Pour cela, nous utilisons le poisson zèbre, un vertébré inférieur largement étudié pour son développement, qui apparaît comme un modèle de choix pour étudier cette pathologie. En effet, la formation des mélanocytes (Cellules de l'épiderme qui produisent de la mélanine) et le développement du mélanome chez le poisson zèbre sont particulièrement similaires aux processus humains.

Nous avons déjà au laboratoire une lignée de poissons modifiée pour ne plus exprimer notre lncARN d'intérêt. Nous pourrions ainsi étudier l'importance de notre candidat en cas d'induction de mélanome humain. En effet, nous comparerons l'évolution de la maladie dans un contexte

génétiq ue contrôle, où le gène cible est exprimé, à un contexte génétique modifié, où le gène cible n'est plus exprimé.

En combinant la lignée de poissons zèbres mutante pour notre long ARN non codant, avec des modèles de mélanome humain, nous pourr ons évaluer l'importance de notre candidat.

La transparence des poissons zèbre nous permettra également de suivre le processus métastatique in vivo, à l'échelle de l'organisme entier.

Ce projet vise donc à évaluer l'impact de l'absence de notre lncARN sur la progression du mélanome et éventuellement d'identifier ce lncARN comme une nouvelle cible moléculaire à différents stades de la maladie. A terme, ces connaissances pourront conduire à une meilleure compréhension de cette pathologie et ouvrir de nouvelles options thérapeutiques.

Nous aurons soin de respecter la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner). Il n'existe en effet pas de modèle ex-vivo permettant de suivre le processus métastatique au sein d'un organisme entier. Nous utilisons donc le poisson zèbre, un modèle vertébré inférieur, comme méthode alternative des modèles murins. Afin de réduire, nous limiterons le nombre d'animaux utilisés aux besoins statistiques de nos analyses. Nous utiliserons au maximum 300 poissons zèbres pour ce projet. Enfin, pour le critère du raffinement, les animaux seront suivis quotidiennement afin d'assurer leur bien-être et les expérimentations seront arrêtées avant la souffrance des individus, et ce, en accord avec les recommandations internationales dans le domaine de la cancérologie. Nous nous appliquerons à réduire la souffrance, la douleur et l'angoisse. Toutes les analyses sur tissu seront conduites après euthanasie d'animaux.

17645 L'objectif du projet est de mettre en place un guidage chirurgical lors de transplantation du foie.

En effet, malgré les progrès importants des technologies d'imagerie médicale, il n'existe actuellement aucun outil capable d'aider objectivement les professionnels de la santé lors des opérations de transplantation du foie. Les chirurgiens se fient encore à leurs propres sens (vision et toucher, principalement) pour déterminer si une transplantation est saine avant, pendant ou après l'intervention.

La chirurgie reste subjective et dépendante de l'expérience du chirurgien, ce qui fait que 10 à 12 % des patients ne sont pas transplantés à temps, avec pour les patients transplantés, un taux de survie qui peut diminuer de 15 %. De plus, 7 à 10 % des patients présentent de graves déficiences de la fonction hépatique.

La lumière dans le domaine proche infrarouge, invisible à l'œil humain, a l'avantage de pénétrer profondément dans les tissus vivants et d'apporter des informations physiologiques relatives à l'état de ces tissus. Par conséquent, l'imagerie optique est particulièrement prometteuse pour aider les chirurgiens à obtenir des informations critiques pendant l'acte chirurgical. En particulier, le contraste moléculaire endogène, telle que la concentration en hémoglobine, en lipides et en eau, ainsi que le coefficient de diffusion, permet d'obtenir des informations précises sur l'état des tissus vivants.

Une nouvelle méthode, appelée Single Snapshot of Optical Properties (SSOP), permet d'imager les tissus vivants en temps réel et sur de très larges champs de vue (>100cm²) et est donc compatible avec une utilisation clinique.

Ainsi ce projet vise à tester l'intérêt de la SSOP pour évaluer la perfusion du foie sur un modèle animal qui reproduit une réduction du flux sanguin et permet d'analyser en temps réel la viabilité des tissus.

Le bénéfice attendu est de pouvoir anticiper chez l'homme, lors d'une intervention chirurgicale du foie, les effets potentiellement néfastes d'une réduction du débit sanguin (nécessaire durant une chirurgie pour retirer la partie malade du foie mais qui peut aussi impacter les marges saines des zones opérées). Cette technologie aide à la visualisation de la réduction du débit sanguin en temps réel et aide donc à mieux évaluer la ligne de frontière entre la partie saine à préserver et la partie malade à extraire.

Le projet utilisera au maximum 36 porcs dans le respect de la règle des 3R :

Remplacement : Afin de pouvoir valider l'analyse par méthodes optiques de la perfusion hépatique, un modèle expérimental animal est nécessaire. A ce jour, aucune technologie de simulation ne permet de reproduire les effets d'une réduction du débit sanguin sur l'ensemble des tissus irrigués, tels qu'ils se produisent sur un organisme vivant. Le porc, du fait de sa taille et de son anatomie viscérale, est alors l'espèce qui permet au mieux de modéliser l'approche chirurgicale. Sa vascularisation hépatique est parfaitement superposable à celle de l'homme.

Réduction : Ce projet se compose de différents modèles d'ischémie hépatiques: ischémie artérielle, veineuse ou mixte (les 2 en même temps). Le calcul du nombre d'animaux minimum nécessaire s'appuie sur un examen des 10 dernières années de recherche. Le nombre retenu permet de répondre aux objectifs scientifiques en répartissant les sujets en 3 groupes expérimentaux statistiquement représentatifs. Toute mesure sera appliquée pour maintenir ce nombre à un minimum.

Raffinement :

Avant la procédure opératoire réalisée dans un environnement chirurgical strict, les porcs sont acclimatés en animalerie aux normes en vigueur afin de garantir leur bon état de santé et de leur assurer un temps de repos avant l'intervention. Ils sont hébergés en groupe social dans un environnement contrôlé en température et hygrométrie. Ils reçoivent une alimentation adaptée à leurs besoins, de l'eau à volonté, des jouets et dispositifs qui favorisent leurs comportements naturels comme l'exploration, le fouissage et le mâchouillage.

L'opération est réalisée sous anesthésie générale profonde avec traitement de la douleur. Des points limites ont été établis pour terminer la procédure en évitant toute souffrance pour les animaux.

Une équipe qualifiée de zootechniciens et médecins assure au quotidien l'entretien, la surveillance et les soins des animaux. La structure en charge du bien-être animal accompagne la mise en œuvre des expériences. Avec le vétérinaire désigné, elle conseille les chercheurs dans l'amélioration de leurs pratiques en faveur du bien-être des animaux et de l'application des 3R.

17646 La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative incurable caractérisée par la perte de cellules nerveuses (appelées « neurones moteurs »), qui contrôlent les muscles. Cette perte de neurones moteurs entraîne une atrophie musculaire et une paralysie progressive menant au décès du patient. Il n'existe actuellement aucun traitement curatif.

Dans la SLA mais également lors des processus de dénervation musculaire, il existe une altération du métabolisme des lipides (processus utilisant les graisses comme source d'énergie essentielle pour le fonctionnement optimal des muscles). De plus, Il apparaît maintenant que le métabolisme du glucose (sucre) joue également un rôle important dans le développement et la progression de la pathologie. En effet, chez les malades atteints de SLA, le métabolisme glucidique et lipidique sont déjà altérés avant même l'apparition des premiers symptômes moteurs. Notre hypothèse est que la modulation de ces métabolismes pourrait permettre le maintien et la régénérescence du dialogue neurone moteur-muscle dans les situations pathologiques. Dans ce projet, nous allons tester trois molécules capables de moduler le métabolisme du glucose et/ou des lipides, à des doses différentes puis par la suite en synergie, chez la souris non-transgénique après lésion du nerf sciatique. La lésion du nerf sciatique provoque une dénervation des muscles. Ce projet nous permettra donc de déterminer si ces molécules favorisent la récupération fonctionnelle après lésion du nerf et si elles accélèrent le retour d'une motricité normale. Si ces résultats sont positifs, ils nous permettront de déterminer la dose la plus efficace de chaque molécule et d'envisager une synergie potentielle. Ainsi, à long terme, ces molécules pourront être testées dans le traitement de la SLA afin de favoriser le maintien et/ou la régénération des connections entre les neurones moteurs et les muscles.

Conformément à la règle des 3R, une attention particulière a été portée sur l'optimisation des protocoles afin de réduire le nombre d'animaux utilisés et d'améliorer et raffiner leurs conditions de vie.

Remplacer : la SLA est une maladie d'origine multifactorielle et multicellulaire. Les cultures cellulaires ne permettent pas de modéliser l'aspect intégré et comportemental de cette pathologie

et leur mise en place progressive. Nous avons donc besoin de recourir à des modèles animaux qui présentent, en outre, une organisation du système nerveux proche de celle de l'homme pour réaliser ce projet de recherche.

Réduire : Compte tenu de la variabilité interindividuelle, nous utiliserons au maximum 300 souris sur 3 ans (soit 15 souris non-transgéniques par groupe), ce qui permet d'obtenir des résultats exploitables et robustes en termes statistiques. Afin de réduire le nombre d'animaux dans ce projet, les animaux destinés aux analyses biochimiques ou histologiques seront au préalable inclus dans les études comportementales et fonctionnelles. Les tests statistiques utilisés seront le test t de Student (non apparié) pour la comparaison de deux groupes expérimentaux ou des tests de comparaison de variance (ANOVA) suivis d'un test post-hoc pour la comparaison de plus de deux groupes expérimentaux.

Raffiner : Les animaux auront accès ad libitum à l'eau et à la nourriture, bénéficieront de conditions de température et d'hygrométrie régulées et conformes à la réglementation en vigueur. Les animaux sont hébergés en cohorte, dans un milieu enrichi (bâtonnets à ronger, coton compressé pour faire des nids, maisons en plastique rouge) et observés quotidiennement par l'expérimentateur ou une personne compétente. Les chirurgies sont effectuées sous anesthésie générale et analgésie adéquate, et les animaux maintenus au chaud et surveillés jusqu'au réveil complet. Après réveil et pour les 4 jours suivants, nous effectuerons un suivi rigoureux de la suture ainsi que de l'état post-opératoire de l'animal. Les animaux bénéficieront d'un suivi clinique rigoureux après leur anesthésie/analgésie. Les animaux seront quotidiennement suivis durant toute la durée de l'expérience. Des points limites prédictifs adaptés ont été déterminés afin d'interrompre les procédures s'ils sont atteints, limitant ainsi la douleur animale à son minimum.

17647 Objectif scientifique du projet :

Il a été montré que la protéine X est surexprimée dans de nombreux cancers.

Les récepteurs de la protéine X activent des voies dites positives induisant des phénomènes de survie, de prolifération mais aussi de migration des cellules tumorales. En absence de la protéine X, les récepteurs ne sont pas inactifs. En effet, il a été montré qu'ils activent les voies dites négatives, induisant des processus de mort cellulaire.

C'est pourquoi les cellules tumorales ont mis en place des systèmes pour échapper à la voie de mort cellulaire de ces récepteurs. Par exemple, les cellules tumorales sont capables de surexprimer de manière autocrine la protéine X afin d'empêcher l'activation de la voie négative de mort cellulaire.

Afin de restaurer la mort cellulaire induite par la voie Protéine X/Récepteurs, le laboratoire a développé un anticorps monoclonal ciblant la Protéine X. Cet anticorps est actuellement testé pour une phase 2 chez l'homme.

La radioimmunothérapie consiste en l'utilisation d'anticorps comme des transporteurs de molécules radioactives vers une cible spécifique (en l'occurrence une tumeur). Cela permet ainsi d'imager ou d'irradier spécifiquement la zone exprimant la cible de l'anticorps utilisé suivant le radio-isotope utilisé. Ce domaine a fait l'objet de nombreuses études pré cliniques et cliniques amenant notamment la mise sur le marché de 2 anticorps radiomarqués pour le traitement des lymphomes non Hodgkiniens, le Bexxar® et le Zevalin®.

Objectif du projet et retombées attendues dans le domaine :

Notre projet a deux objectifs :

- Le premier est de développer un nouveau radio pharmaceutique permettant l'imagerie in vivo de l'expression de la Protéine X au niveau tumoral. Le composé radioactif injecté qui se concentrera uniquement dans les tumeurs exprimant fortement la protéine X, permettra sa détection par imagerie dans des modèles précliniques murins. Cette étude devrait nous permettre à terme de sélectionner des patients éligibles au nouveau traitement anti-protéine X par imagerie.

- Le second objectif de notre projet est de développer un agent de radiothérapie métabolique en le couplant avec un isotope pertinent pour la thérapie afin de détruire les tumeurs de l'intérieur. Notre but est que la radio-activité se concentre dans les tumeurs exprimant beaucoup de protéine X, que

notre nouvelle molécule la détecte et se concentre à son tour dans le tissu tumoral. La radio-activité à forte dose locale devrait ainsi bloquer la division cellulaire et induire la mort des cellules cancéreuses.

Afin de répondre à ces objectifs, différents modèles de souris seront utilisés dans cette étude: des souris avec xénogreffes et un modèle souris avec des tumeurs spontanées transgénique.

Balance dommages/bénéfices :

L'utilisation de la souris est une nécessité pour ce projet car l'utilisation d'un organisme entier est indispensable afin d'analyser la dispersion spatiale des traceurs d'imagerie. En effet, des études de la biodistribution de notre nouvelle molécule thérapeutique seront réalisées au sein des différents organes ainsi qu'une étude de sa potentielle toxicité sur les organes sains. Ces expériences ne sont donc pas réalisables sur des modèles in vitro. Brièvement, les animaux seront « imagés » afin de voir si le traceur s'accumule dans les tumeurs, favorisant leur identification de manière non invasive. En cas d'accumulation dans les tumeurs, un second radio-isotope sera couplé à l'anti-protéine X, afin d'amener de manière ciblée une dose de radioactivité nécessaire pour tuer les cellules cancéreuses.

Pour ce faire, les animaux subiront pour ce projet des greffes de cellules tumorales, des injections en intraveineuses des différentes molécules thérapeutiques ainsi que des procédures d'imagerie.

Conformité avec la règle des 3R :

Le développement d'un nouveau traceur d'imagerie est en soit un effort de raffinement afin de ne pas procéder à la mise à mort des animaux. Les effectifs définis ont été déterminés à l'aide de comportement connu de ces différents modèles expérimentaux et tiennent compte des exigences statistiques nécessaires à l'exploitation des résultats. Les points limites ont été précisément définis et une surveillance adaptée des animaux tout au long des expériences permettra un contrôle de toute douleur animale. L'ensemble des procédures d'acquisition d'images sera réalisé sous anesthésie générale des animaux. Certains animaux utilisés dans l'étude proposée sont transgéniques. L'utilisation d'antalgique et d'anesthésique permettra de réduire la douleur et le stress des animaux.

Nombre total d'animaux inclut dans ce projet : 2848 animaux au maximum.

17648 Les G-quadruplex sont des structures tertiaires d'acides nucléiques formées par le repliement de brins d'ADN ou d'ARN riches en guanine (G), et généralement organisés sous la forme de répétitions G4C2. L'existence de ces structures de « quadruplex » hélices était suspectée depuis plus de 30 années, mais ce n'est que récemment que leur présence au sein de cellules vivantes a pu être confirmée ex-vivo en culture cellulaire, grâce au développement d'outils spécifiques comme des anticorps monoclonaux reconnaissant ces structures ou des sondes nucléotidiques spécifiques se liant au cœur de ces quadruplex. Alors que les études récentes ont largement décrit la structure de ces quadruplex, aucune étude jusqu'à présent n'a démontré i) la présence de quadruplex in vivo et, ii) le rôle physiologique des quadruplex.

Nous faisons l'hypothèse que ces structures « non-covalentes » représentent un mécanisme adaptatif permettant de réguler (en l'inhibant) les mécanismes de transcription sur l'ADN et/ou de traduction sur l'ARN et, que par ce biais, elles joueraient un rôle dans la réponse adaptative au stress et aux drogues. Nos études préliminaires ont permis de caractériser la présence de quadruplex in vivo sur coupe de cerveau de souris et de mettre au point une technique de quantification de l'expression des quadruplex in vivo. Notre objectif est maintenant d'étudier la régulation de l'expression des quadruplex dans la réponse adaptative au stress et aux psychostimulants. Dans ce but, nous quantifierons l'expression de quadruplex dans un modèle de stress aigu (stress de contention) et dans un modèle de réponse aiguë à la cocaïne, dans les structures cérébrales connues pour être impliquées dans ces comportements. Nous faisons l'hypothèse que ces structures tertiaires représentent une sorte d'épigénétique à court terme et, par conséquent qu'elles sont impliquées dans les adaptations des cellules nerveuses.

Notre étude sera menée sur un total de 180 souris C57BL/6J sur une période de 4 ans. Dans le respect de la règle des '3R', Remplacer/Réduire/Raffiner, les différentes procédures expérimentales ont été consciencieusement pensées et élaborées.

1/Remplacer : notre objectif étant d'étudier les modifications d'expression dans la réponse adaptative au stress ou aux drogues, les procédures expérimentales ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information. Il n'existe pas, dans notre domaine, d'alternatives satisfaisantes aux méthodes expérimentales proposées dans ce projet. Par ailleurs, il n'existe actuellement aucun moyen de tester notre question biologique à l'aide de modèles informatiques ou d'autres alternatives car trop de paramètres physiopathologiques entrent en jeu.

2/ Réduire : afin de réduire les duplicatas, la taille estimée des échantillons nécessaires a été calculée à l'aide d'un programme de statistique. L'écart type et l'estimation de différences biologiques significatives sont basés sur des résultats obtenus auparavant et sur un intervalle de confiance de 2 sigma (95%). Par conséquent nous avons besoin de 12 à 16 animaux par groupe pour pouvoir mettre en évidence des différences pertinentes et statistiquement significatives à $p < 0.05$. Il faut noter que, à chaque fois où cela est possible, plusieurs régions du cerveau sont isolées à partir d'un même animal, permettant d'utiliser le minimum d'animaux possible.

3/Raffiner : dans la zone de stabulation avant les procédures, les souris ne seront pas manipulées ou dérangées mais observées tous les jours afin de limiter tout stress. Les protocoles de stress ou d'injection de substances utilisés dans ce projet peuvent induire une gêne (anxiété) ou une agitation, mais non douloureuses, et sont de plus réalisés par des chercheurs expérimentés.

17649 Avec plus de 220 millions de malades dans le monde à l'heure actuelle, et plus de 360 millions d'ici 2030, le diabète est un réel problème de santé publique. La diminution de la masse fonctionnelle des cellules bêta pancréatiques (MCB) qui produisent l'insuline est une caractéristique commune aux diabètes de type 1 et de type 2. Pouvoir estimer cette MCB in vivo, de manière non invasive, permettrait aux cliniciens d'évaluer l'état anatomique et fonctionnel du pancréas du patient et ainsi d'orienter son traitement. De plus, un tel outil pourrait permettre le suivi d'une greffe d'îlots, traitement de plus en plus envisagé dans les cas de diabète de type 1.

Des tests métaboliques complexes ont été développés pour tenter d'évaluer la fonctionnalité des cellules bêta pancréatiques. De nombreux tests métaboliques plus simples, basés sur des dosages sanguins, permettant d'évaluer cette fonctionnalité ont donc été proposés, mais ces tests restent peu sensibles. Il est par conséquent important de développer une nouvelle méthode permettant une mesure non invasive et fiable de la MCB. L'imagerie nucléaire est à priori le meilleur moyen de mesurer la MCB in vivo ; cependant, elle est relativement compliquée compte tenu du fait que les cellules bêta représentent seulement 1 à 2% de la masse totale du pancréas. De nombreux outils sont en cours de développement mais aucun à ce jour ne s'est révélé concluant.

Le laboratoire a précédemment évalué plusieurs candidats ciblant une protéine exprimée spécifiquement par les cellules β pancréatiques au niveau de la membrane des vésicules contenant l'insuline. Les fragments d'anticorps évalués n'avaient cependant pas une biodistribution favorable à l'imagerie de la BCM, car ils s'accumulaient beaucoup dans le foie, organe très proche du pancréas.

L'objectif de ce projet, dans la continuité des précédents, est de proposer de nouveaux radiotraceurs permettant d'évaluer la fonction des cellules bêta pancréatiques. Le laboratoire va ainsi synthétiser de nouveaux candidats pour l'imagerie nucléaire, protéiques mais aussi chimiques, et les évaluer chez le rongeur (400 animaux).

Le protocole d'imagerie qui sera mis en œuvre n'entraînera pas de douleur, souffrance ou angoisse en dehors d'un stress bref et modéré lié aux injections selon les bonnes pratiques vétérinaires. Tout sera mis en œuvre lors de cette étude pour respecter la règle des 3R (Remplacer, Réduire et Raffiner) : 1. Cette étude ayant pour objectif d'étudier la biodistribution de molécules dans un organisme entier placé sous une caméra, suite aux études cellulaires préliminaires qui permettront de sélectionner le(s) meilleur(s) candidat(s), les expérimentations sur l'animal ne pourront être

remplacées. 2. Nous réduirons le nombre d'animaux utilisés au minimum requis pour répondre à notre question scientifique et remplir les conditions nécessaires pour la réalisation de tests statistiques. 3. Le raffinement consistera à prendre toutes les précautions possibles et nécessaires pour limiter la souffrance animale. Le projet sera mis en œuvre dans un établissement utilisateur agréé et tous les personnels impliqués ont des compétences validées pour les manipulations des animaux. Les animaux seront hébergés en groupe avec enrichissement du milieu de vie ; des points limites adaptés seront utilisés afin de réduire le stress et la souffrance ; un suivi quotidien de leur bien-être sera réalisé ; lors des procédures d'imagerie les animaux seront anesthésiés, leur température contrôlée, et un gel ophtalmique sera utilisé pour prévenir toute sécheresse oculaire.

17650 L'objectif de ce projet est de déterminer chez l'animal les doses sans effet toxique de candidats médicaments à visée antitumorale. Dans le cadre de la recherche préclinique, ces doses permettront la réalisation d'études d'évaluation de l'efficacité antitumorale de molécules innovantes sans effets secondaires, en validant les schémas ainsi que les voies d'administration. ce projet constitue une brique du développement préclinique des traitements en cancérologie qui conduiront à la mise sur le marché de nouveaux traitements anticancéreux innovants permettant une meilleure prise en charge des patients souffrant de cancer.

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

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

Ce projet, d'une durée de 5 ans, vise à évaluer 80 traitements innovants selon la même procédure expérimentale, soit au maximum 5040 animaux. Ce nombre d'animaux pourra être réduit en fonction des modèles tumoraux utilisés. Les changements opérés lors des différentes répétitions sont le modèle tumoral et le traitement (doses, schémas et voies d'administration).

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

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

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

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

17651 L'objectif de ce projet est de démontrer qu'il est possible d'induire chez la souris des anticorps capables de neutraliser le virus SARS-CoV-2, virus responsable de la pandémie de Covid-19. Des protéines cibles de la surface de ce virus ont été identifiées et ont donné lieu à la production de trois protéines par recombinaison génétique. Ces protéines ont ensuite été modifiées par ajout d'un segment particulier, six segments ont été choisis pour au total produire et purifier 18 protéines modifiées. Ces protéines seront injectées aux souris, seules ou en association. Nous suivrons la production d'anticorps spécifiques au cours du temps dans le sérum de chaque souris. Dès l'apparition de tels anticorps, des tests *in vitro* de neutralisation du virus seront effectués. Nous projetons d'utiliser 1440 souris adultes femelles.

Toutes les souris seront identifiées par une bague à l'oreille. Elles subiront 2 procédures : plusieurs prélèvements sanguins seront effectués afin de récolter du sérum dans lequel se trouvent les anticorps, et elles subiront des injections par voie intrapéritonéale chaque jour pendant 14 jours. Les souris seront hébergées par groupe de 8 souris dans des cages adaptées, elles auront accès à l'eau et la nourriture. Les cages seront enrichies une semaine avec un tunnel, puis une semaine avec un igloo en plastique rouge transparent. La production d'anticorps ne peut pas être étudiée *in vitro* (remplacement), et le nombre de souris prévues pour ce protocole est nécessaire et suffisant pour pouvoir exploiter toutes les pistes (réduction). L'injection de protéines modifiées pour induire des anticorps spécifiques a déjà fait l'objet d'études chez les souris BalbcByJ, et tout sera mis en œuvre pour assurer leur bien-être (raffinement). Les souris seront maintenues dans un cycle jour/nuit de 12h à une température et une hygrométrie comprise entre 20 et 24°C, 35 et 75% humidité. Un contrôle visuel sera effectué tous les jours. En cas de piloérection, prostration, tremblements les souris seront mises à mort par une méthode réglementaire.

17652 Chaque individu perçoit en permanence des stimuli environnementaux qui peuvent modifier de façon pérenne son comportement. Parmi eux, le stress déclenche un large éventail de réponses qui sont adaptatives quand elles sont correctement régulées. Toutefois, de par sa chronicité, le stress peut favoriser l'apparition de nombreux troubles mentaux dont la dépression.

Notre projet vise à comprendre comment des changements moléculaires engendrés par le stress sous-tendent l'apparition de modifications comportementales liées à la dépression. Les maladies mentales se classent au deuxième rang des causes mondiales de handicap. L'impact social et économique de ces troubles est donc considérable, et nécessite un accès fréquent aux hospitalisations. Les mécanismes moléculaires et cellulaires qui sous-tendent ces troubles sont encore méconnus ce qui freine l'avancée de nouvelles thérapies. Afin de comprendre les mécanismes reliant le stress aux troubles psychiatriques qui en découlent, notre équipe s'intéresse à une structure cérébrale, le striatum, qui est fortement sensible au stress. Au sein de cette structure, le stress entraîne un déséquilibre de messagers chimiques (dopamine et glutamate) qui se répercute sur les récepteurs de ces molécules (récepteurs à la dopamine et au glutamate). Nos travaux préliminaires ont montré qu'un stress chronique augmentait la formation de complexes (i. e. hétéromères) entre ces deux types de récepteurs. Nous possédons des outils pharmacologiques permettant de bloquer la formation de ces complexes.

Le présent projet aura donc trois objectifs principaux : i) Établir une cinétique de la persistance de ces complexes après exposition à un stress social chronique. ii) Étudier les changements d'activité causés par le stress au sein du striatum, et le rôle de ces complexes de récepteurs dans ces processus. iii) Étudier le potentiel bénéfique thérapeutique de cibler ces complexes de récepteurs afin d'améliorer les troubles comportementaux liés au stress. Pour parvenir à ces objectifs, notre projet sera découpé en quatre procédures. La procédure 5 consiste en une procédure complémentaire de perfusion intracardiaque permettant des analyses histochimiques, elle ne comprendra que des animaux issus des procédures 1 et 4. Nous combinerons des approches moléculaires, électrophysiologiques et comportementales et utiliserons des outils viraux permettant de cibler de façon sélective ces complexes de récepteurs. i) Procédure 1 : Effet d'un stress social sur l'hétéromérisation des récepteurs à la dopamine et au glutamate. Dans cette procédure histologique, nous quantifierons le nombre d'hétéromères induit par le stress et déterminerons si ces changements perdurent. ii) Procédure 2 : Rôle des hétéromères dans les manifestations

comportementales associées au stress. Dans cette procédure nous essayerons de bloquer et de réverser les troubles comportementaux induits par le stress. iii) Procédure 3 : Rôle des hétéromères dans les adaptations cellulaires liées au stress. Dans cette procédure électrophysiologique, nous mesurerons les changements d'activité des neurones du striatum suite à un stress et étudierons le rôle des hétéromères dans ces processus. iv) Procédure 4 : Évaluation des effets d'un antidépresseur classique sur la formation des hétéromères. Dans cette procédure, nous évaluerons l'effet de la kétamine sur les hétéromères.

Nous avons déjà obtenu des résultats très prometteurs chez le mâle, et souhaitons à présent tester le rôle de ces hétéromères chez la femelle. Les résultats générés auront ainsi une plus grande portée translationnelle. L'ensemble du projet nécessitera 1402 souris adultes. Les procédures présentées dans ce projet ont été pensées afin de prendre en compte les objectifs de la règle des 3R : Remplacement : La souris est le modèle animal ayant le moindre potentiel de douleur chez lequel la complexité des structures et circuits cérébraux dérégulés par le stress chez l'homme est conservée. Réduction : Chaque souris est utilisée dans autant de procédures qu'il est envisageable sans qu'elles interfèrent entre elles, dans le but de limiter le nombre d'animaux. Les tests statistiques sont choisis afin d'obtenir la meilleure significativité avec un minimum d'individu. Raffinement : Les résultats comportementaux dépendent directement du niveau de stress non contrôlé des animaux. Nous portons donc une attention particulière aux conditions d'hébergement et de soin des animaux, ainsi qu'à la diminution du stress et de la douleur à leur minimum pour chaque procédure (suivi quotidien via grille de score en annexe, définition de points-limite précoces et adaptés).

17653 Le cancer est la deuxième cause de décès dans les pays développés après les maladies cardiovasculaires. Les traitements conventionnels de nombreux cancers tels que la radiothérapie, la chimiothérapie et la chirurgie ont démontré des limites d'efficacité nécessitant un besoin urgent de nouvelles stratégies thérapeutiques. Les virus oncolytiques sont une nouvelle classe d'agent thérapeutique pouvant être une alternative au traitement des cancers. Par définition, un virus oncolytique est un virus qui démontre une réplication et une lyse spécifique des cellules tumorales avec une faible voire aucune cytotoxicité sur les tissus dits « sains ».

La perspective de ce projet est d'évaluer et de comparer, dans différents modèles murins de greffe de tumeurs de souris (modèles syngéniques) et de greffe de tumeurs humaines (modèles xénogreffes), différents virus oncolytiques exprimant des gènes thérapeutiques (virus « armés »). Les cancers ciblés correspondent aux tumeurs pour lesquelles il y a un fort besoin médical en clinique humaine. Sachant que le développement clinique de ces virus prévoit de les combiner avec de l'immunothérapie afin de potentialiser l'activité anti-tumorale, le projet se propose d'explorer dans les modèles murins les combinaisons de ces virus avec des traitements d'immunothérapie utilisés en clinique humaine pour le traitement de cancers de différentes origines. Le but de ce projet sera d'évaluer l'activité thérapeutique anti-tumorale des virus oncolytiques « armés » en association ou non avec de l'immunothérapie. Cette activité thérapeutique sera analysée dans une large variété de modèles de cancers murins et humains. Les résultats issus de ce projet permettront une meilleure compréhension des mécanismes d'activité des virus oncolytiques en association avec des substances anti-tumorales couramment utilisées en clinique. Les résultats permettront également de valider chez l'animal l'activité thérapeutique anti-tumorale de nouvelles générations de virus oncolytiques dans différents types de cancer.

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

-Réduire le nombre de souris utilisées : avant d'être testés chez l'animal, les virus-candidats médicaments auront été évalués in vitro sur des modèles cellulaires de tumeurs humaines et murines établies et caractérisées, ainsi que dans des cellules primaires (non tumorales) pour sélectionner les virus ayant une activité anti-tumorale et ne présentant pas de cytotoxicité. Nous prévoyons de mesurer l'effet bénéfique que pourrait apporter une « poly-thérapie » en combinant les substances anti-tumorales capable de potentialiser les effets oncolytiques de nos virus candidats dans nos modèles cellulaires. Après analyse de notre service de bio statistique,

l'obtention de résultats statistiquement robustes est limitée à des groupes de 15 animaux. Cela est rendu possible par la réalisation des études par des techniciens rompus à ses manipulations, ce qui garantit une bonne reproductibilité des expériences et également un suivi optimal du bien-être des animaux.

-Remplacer : du fait de l'absence de système in vitro comportant tous les éléments pouvant interférer avec la réplication virale, et permettant de mimer leurs interactions et leur mode d'action, l'emploi de modèles animaux est incontournable. Un nombre maximal de 3840 souris est envisagé pour ce projet.

-Raffiner : Tout au long de leur vie, une attention particulière est portée au bien-être des animaux. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux et dans un milieu de vie enrichie pour préserver les interactions sociales et leur permettre d'assouvir les comportements liés à leur espèce. Pour toutes les techniques le nécessitant, une analgésie et / ou une anesthésie est prévue dans le but de réduire à son minimum le stress et la souffrance des animaux. Du fait de la combinaison avec nos virus, des doses sub optimales d'anticorps sont utilisées, ce qui réduit fortement les effets secondaires habituellement observés avec ces traitements. Enfin, les procédures expérimentales seront arrêtées le plus précocement possible sur la base de points limites permettant de réduire le stress et la souffrance de l'animal.

17654 La dépression est la pathologie mentale la plus fréquente, dont les facteurs déterminants dans son apparition sont le stress et la douleur chronique. Des données d'imagerie neuroanatomique et fonctionnelle chez l'homme ainsi que des résultats obtenus chez la souris par des méthodes de biologie moléculaire montrent que la dépression majeure, mais aussi des situations douloureuses, s'accompagnent de changements dans des structures du cerveau responsables des comportements anxio-dépressifs. Chez la souris, ces résultats ont été obtenus en utilisant deux modèles:

(1) un modèle de la dépression induite par la douleur neuropathique.

(2) un modèle de la dépression induite par l'utilisation de souris génétiquement modifiées, dont certains neurones présentent la caractéristique de pouvoir être activés par la technique optogénétique, une exposition à une lumière d'une longueur d'onde donnée.

Nous souhaitons approfondir ces observations par un suivi longitudinal de ces deux modèles murins, en cartographiant les réseaux cérébraux intervenant dans le développement de la dépression. Pour cela, nous utiliserons l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) et l'imagerie nucléaire (TEP), deux techniques d'imageries biomédicales non-invasives alliant ainsi la résolution spatiale et la multi-modalité de l'IRM à la sensibilité et la spécificité du TEP. De plus, l'utilisation de ces deux techniques d'imagerie déjà présentes dans les services cliniques en routine, nous permettent d'envisager un transfert de nos observations plus rapide vers l'Homme. Des tests comportementaux viendront compléter nos observations basées à partir des images.

Afin d'éviter des temps d'anesthésie trop longs au cours des examens d'imagerie, ce projet se découpera en 4 parties. Ces différentes parties aboutiront à des conclusions complémentaires les unes des autres, permettant la compréhension des structures impliquées dans la dépression. Ainsi, 410 souris seront utilisées au total : 160 souris non-modifiées génétiquement pour le premier modèle et 250 souris génétiquement modifiées pour le second modèle. Le projet sera conduit en respectant la règle des 3R visant :

- Réduire : Nous n'utiliserons que 25 animaux par groupe, ces chiffres étant le minimum pour pouvoir faire des études statistiques dans ces modèles. De plus, l'imagerie nous permet de suivre un même animal plusieurs fois, ce qui réduit le nombre d'animaux à inclure.

- Raffiner : L'environnement des animaux sera enrichi par une zone de repos correspondant à un abri en plastique, du coton et de tunnels en papier ou plastique dans les cages. Les animaux seront hébergés de manière à former des groupes sociaux. Les procédures d'imagerie sont non-invasives et seront réalisées sous anesthésie. Egalement, les procédures expérimentales pour créer les modèles (la chirurgie) seront réalisées sous anesthésie générale (ketamine/xylazine). Pendant la phase de réveil, l'animal est isolé dans une enceinte chauffée et surveillé visuellement. Une solution

de sérum physiologique avec 5% de glucose peut lui être injectée en sous-cutanée (volume max. 10 mL/kg).

- Remplacement : L'étude portant sur les conséquences affectives de la douleur neuropathique et la dépression induite par l'activation optogénétique, nécessite impérativement l'utilisation d'animaux. Un calcul statistique sera réalisé pour s'assurer que les résultats obtenus sont valides.

17655 Les maladies hépatiques chroniques telles que la cirrhose du foie et le carcinome hépatocellulaire (CHC) sont des défis majeurs pour la santé mondiale. Ces maladies sont souvent la conséquence d'une maladie hépatique chronique et asymptomatique évolutive. Cirrhose et CHC sont la plupart du temps dus à une infection virale par le virus de l'hépatite C ou de l'hépatite B. Au cours des dernières années un autre type d'affection s'est fortement développé. La stéato-hépatite non alcoolique (NASH), encore connue sous le nom de maladie du soda ou maladie du foie gras, est la conséquence d'une alimentation trop riche en sucre et en graisse. Ce type d'alimentation va entraîner le stockage et l'accumulation de graisses dans le foie, ce qui va conduire à une inflammation locale au sein de l'organe. Cette inflammation chronique va entraîner avec le temps le développement d'une fibrose dans 20% des cas, qui va ensuite évoluer en cirrhose et/ou CHC. Le CHC est la 3ème cause de mort par cancer dans le monde et le seul cancer à ne pas avoir régressé ces dernières années en termes d'incidence et de mortalité. Actuellement, il n'existe aucune thérapie permettant de traiter la fibrose hépatique et/ou la NASH. Récemment, nous avons identifié la nizatidine (NZA), un antagoniste du récepteur H2 de l'histamine (HRH2) et prescrit dans certaines formes de gastrites, comme nouvelle option thérapeutique pour la prévention du CHC et le traitement de la fibrose hépatique. Afin de mieux comprendre le mécanisme d'action de la NZA et de valider le HRH2 comme cible thérapeutique, nous souhaitons utiliser 2 modèles de souris permettant le développement de la maladie chez tous les animaux et chez lesquels le HRH2 est soit totalement absent soit invalidé au niveau du foie. Pour cette étude, nous estimons le nombre d'animaux nécessaire à 100 en incluant les couples reproducteurs.

Remplacer : une majorité des expériences ont été menées en amont, in vitro sur des lignées cellulaires et ex vivo sur des biopsies de patients atteints de CHC, in vivo dans d'autres modèles murins de maladies hépatiques afin de nous assurer de la réelle nécessité de poursuivre sur ces modèles. La complexité du développement de cette maladie hépatique ne pouvant être récapitulée autrement, le recours à l'animal est nécessaire pour cette approche.

Réduire : nous nous basons sur la littérature et sur notre expérience en interne afin de n'utiliser que le nombre d'animaux jugé nécessaire à l'obtention de résultats exploitables.

Raffiner : le protocole expérimental est planifié en amont, l'environnement des animaux est enrichi avec des tubes de coton pour nidifier et des briques de tremble pour ronger, les animaux sont maintenus en groupe de 3 minimum afin d'éviter tout stress de l'animal isolé, les souris en expérimentation auront un suivi quotidien adapté afin d'éviter toute souffrance et les points limites prédéfinis seront respectés permettant d'interrompre les procédures et ainsi de soustraire l'animal à la souffrance.

17656 L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie cardiopulmonaire incurable qui se définit par une élévation de la pression sanguine au niveau des artères pulmonaires, évoluant vers une insuffisance cardiaque puis au décès du patient. Outre la transplantation pulmonaire, dont les résultats restent insatisfaisants, il n'existe actuellement aucun traitement curatif. L'HTAP se manifeste par des signes apparemment bénins, comme l'essoufflement à l'effort, mais responsables d'un diagnostic tardif et d'un pronostic grave : en l'absence de traitement, l'espérance de vie n'atteint en moyenne que 2,8 ans après diagnostic. Cette élévation de la pression sanguine au niveau des artères pulmonaires, qui est progressive et irréversible, est la conséquence de la réduction progressive de la lumière vasculaire due, quant à elle, à des anomalies des cellules de la paroi vasculaire des petits vaisseaux pulmonaires (cellules endothéliales, musculaires lisses, mésenchymateuses et péricytes), ainsi que des cellules circulantes immunitaires et de l'inflammation. Cette réduction de la lumière vasculaire, ainsi que cette inflammation accrue, sont les caractéristiques de ce que l'on appelle le remodelage vasculaire pulmonaire, qui empêche le

bon écoulement sanguin et favorise le développement et la progression de la maladie. Les mécanismes cellulaires du remodelage vasculaire pulmonaire ne sont toujours pas complètement élucidés.

Afin d'identifier et de mieux comprendre ces mécanismes, nous souhaitons étudier les globules rouges, appelés également érythrocytes, dans l'HTAP, et déterminer s'ils sont altérés et si leurs anomalies jouent un rôle dans la mise en place de la maladie. L'objectif principal de cette étude étant de déterminer si la régulation de ces altérations érythrocytaires pourrait représenter une nouvelle cible thérapeutique. Notre hypothèse de travail est que les érythrocytes sont des acteurs clés précoces dans la mise en place de la dysfonction des cellules endothéliales pulmonaires, cellules qui tapissent les vaisseaux. En effet, nos données montrent que 1) Les érythrocytes représentent une source locale de stress oxydant, via la production des ROS (ou reactive oxygen species) qui peuvent être libérés dans le milieu extracellulaire ; 2) Les ROS d'origine érythrocytaire peuvent induire l'acquisition d'un phénotype pro-inflammatoire de la part des cellules endothéliales pulmonaires.

Une meilleure compréhension des mécanismes par lesquels les érythrocytes influencent les fonctions des cellules endothéliales pulmonaires pourrait aider à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques dans l'HTAP et/ou permettre de développer des outils pour le diagnostic et le suivi de la progression de la maladie

Cette maladie est complexe et fait intervenir plusieurs types cellulaires : cellules endothéliales, cellules musculaires lisses, péricytes et cellules immunitaires. Bien que notre laboratoire travaille sur des cultures de ces types cellulaires provenant de patients atteints de cette maladie, seule l'expérimentation animale permet de retrouver l'ensemble de ces acteurs au sein d'un même modèle, dans un environnement physiologique et pathologique. Les modèles animaux d'HTAP sont alors des outils très importants et permettent le suivi de la mise en place dans le temps des différents mécanismes physiopathologiques et d'avoir donc accès aux phases précoces de la maladie. Les modèles animaux, régulièrement utilisés dans de nombreuses publications de différentes équipes de recherche, sont un réel apport et un outil indispensable pour nos travaux de recherche.

Nous avons déjà obtenu de nombreuses données chez l'Homme qui indiquent la présence d'altérations érythrocytaires chez les patients atteints d'HTAP. Nous souhaitons à présent évaluer le rôle des érythrocytes dans le modèle HYPOXIE CHRONIQUE, puis traiter l'HTAP induite à l'aide de modulateurs spécifiques des altérations érythrocytaires. Ce modèle fait intervenir des modifications fonctionnelles, structurelles et moléculaires du lit vasculaire pulmonaire et du ventricule droit. Les contraintes observées chez l'animal ne seront pas plus sévères que les signes bénins retrouvés chez l'homme puisque l'étude se réalise dans les phases précoces de l'HTAP. Nous évaluerons plusieurs doses pour les modulateurs spécifiques, seules et combinées avec les traitements palliatifs utilisés chez le patient. Nous visons à réduire au minimum le nombre de souris utilisées afin d'obtenir des données statistiquement exploitables en tenant compte de la dispersion des résultats. Durant les expérimentations, les animaux seront quotidiennement observés et évalués au moyen d'un score (apparence, poids et comportement) pour s'assurer de leur bien-être. Nous envisageons donc pour cette étude d'utiliser 308 souris sur une durée de 5 ans.

17657 La radiothérapie (RT) fait partie des traitements les plus utilisés chez les patients atteints de cancer. A l'heure actuelle, en France, 60% des patients diagnostiqués pour un cancer sont traités par RT. Pour les tumeurs du pôle céphalique, tels que les gliomes et les tumeurs tête et cou, la RT fait partie du traitement standardisé. Cependant, pour certaines tumeurs, la RT à base de rayons X (RX) présente des bénéfices limités en termes de contrôle de la tumeur et de survie. Une des hypothèses est que les caractéristiques intrinsèques de ces tumeurs malignes, telles que l'hypoxie ou l'inflammation, pourraient les rendre résistantes aux irradiations de faible énergie. Il a été montré que l'irradiation aux RX pouvait modifier l'inflammation des tumeurs cérébrales en favorisant notamment les macrophages protumoraux. De plus, plusieurs études ont également montré une diminution des leucocytes circulants (lymphopénie) lors de traitements par radiothérapie. Contrairement à la RT conventionnelle, l'hadronthérapie, qui comprend notamment la protonthérapie (PT) permet de déposer de façon précise des doses d'irradiation dans le tissu.

Ainsi la protonthérapie peut être utilisée pour : i) limiter les risques de radiotoxicité en réduisant l'exposition du tissu sain et ii) augmenter la dose déposée à la cible pour accroître la probabilité du contrôle tumoral tout en maintenant les doses pour le tissu sain environnant sous la limite du seuil de tolérance.

Récemment, il a été proposé que l'hadronthérapie en général et la protonthérapie en particulier pourraient agir sur la composante inflammatoire en favorisant la présence de macrophages anti-tumoraux. Le but de ce projet est d'appréhender si au-delà des avantages précisés précédemment, la protonthérapie pourrait présenter des avantages en termes d'inflammation anti-tumorale, notamment en nous intéressant aux effets sur les leucocytes circulants.

Pour ce faire, nous souhaitons comparer les effets de l'irradiation cérébrale à base de photons ou de protons sur les cellules immunitaires circulantes. Nous utiliserons dans ce projet des souris syngéniques immunocompétentes C57/Bl6. 90 souris seront nécessaires sur 2 sites, un site pour l'irradiation photon et l'autre, qui est l'objet de cette saisine, réalisera les irradiations protons sur 40 souris.

Pour ce projet la règle des 3R sera respectée :

- Remplacement, nos études précédentes réalisées sur les cultures primaires et lignées de macrophages doivent maintenant être confirmées in vivo chez l'animal. Les effets de l'irradiation, même ciblée comme c'est le cas en protonthérapie, sur la production des leucocytes dans la moelle osseuse et leur circulation dans le système vasculaire ne peut être obtenu sur des modèles in vitro
- Réduction, la méthodologie de dosage des sous types de leucocytes, en cytométrie en flux maîtrisée par une des équipes de l'étude, permet de réduire fortement le nombre d'animaux puisque chaque animal peut-être suivi à différents temps post-irradiation. Le nombre d'animaux utilisés, 40 pour cet établissement utilisateur est le minimum pour pouvoir réaliser des tests statistiques sur les résultats obtenus en tenant compte de la variabilité inter individuelles des résultats.
- Raffinement, les animaux sont hébergés à plusieurs par cage dans un environnement enrichi. Les procédures seront réalisées sous anesthésie générale. Les animaux sont observés quotidiennement à l'aide d'une grille d'observation par du personnel qualifié ; en cas de doute, l'avis du vétérinaire référent sera demandé.

17658 Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, l'infarctus du myocarde reste l'une des principales causes de mortalité dans le monde. Il est causé par l'apparition d'un caillot dans une artère du cœur provoquant l'arrêt de la circulation sanguine et aboutissant à la mort des cellules cardiaques, notamment par manque d'oxygène. Le traitement de l'infarctus du myocarde consiste à rétablir rapidement la circulation de l'artère du cœur, que l'on nomme reperfusion, par élimination du caillot sanguin. Cette reperfusion sanguine est indispensable pour permettre la survie des cellules cardiaques mais, paradoxalement, elle est elle-même potentiellement néfaste. Par ailleurs, dans les semaines qui suivent cet accident, l'infarctus du myocarde précédemment constitué conduit à une modification importante de la structure du cœur suite à la cicatrisation de la lésion. En effet, afin de compenser cette perte en tissu capable de se contracter, le ventricule gauche est obligé de modifier sa géométrie et son fonctionnement, c'est le remodelage. Cependant, bien que ce remodelage soit bénéfique au début, il devient rapidement péjoratif et conduit au développement d'une défaillance cardiaque dénommée insuffisance cardiaque. Aujourd'hui, ce remodelage péjoratif est difficile à bien prédire et n'est que partiellement amélioré par les thérapeutiques actuelles.

Des taux augmentés d'une protéine dite Prion au rôle méconnu ont été identifiés chez des patients humains ayant présenté un remodelage péjoratif. L'objectif de ce projet est donc d'étudier le rôle de la protéine Prion dans le développement du remodelage péjoratif et d'évaluer son blocage comme traitement potentiel pour atténuer le remodelage péjoratif du ventricule gauche. Pour ce projet, nous travaillerons sur des souris délétées pour le gène PRNP codant pour la protéine Prion et qui seront comparées à d'autres ayant le gène codant pour la protéine Prion. Les souris seront soumises à un modèle expérimental d'infarctus du myocarde habituellement réalisé au laboratoire, les souris étant suivies dans les heures, jours et semaines qui suivent l'infarctus du myocarde, afin de mimer le plus possible la réalité clinique.

Au total, nous utiliserons 360 souris qui seront hébergées dans une animalerie conventionnelle. Elles auront à leur disposition des feuilles de papier pour jouer/se cacher et des baguettes de bois à ronger et feront l'objet d'une surveillance quotidienne. La procédure chirurgicale d'infarctus du myocarde sera réalisée chez l'animal profondément anesthésié. Afin de lutter contre la douleur post-opératoire, les animaux recevront une dose d'antalgique dès leur réveil. Par ailleurs, il n'est pas possible de ne pas utiliser d'animaux car seule leur utilisation permet d'atteindre l'objectif du projet et de rester proche de la réalité clinique humaine. Nous prévoyons d'utiliser le minimum d'animaux en contrôlant leur nombre par des méthodes statistiques.

17659 Les surdités neuro-sensorielles, « surdités classiques », résultent d'une atteinte ou d'une perte de fonction des cellules sensorielles cochléaires. La réhabilitation des personnes développant de telles surdités passe par un appareillage classique qui en principe est couronné de succès tant que les pertes auditives ne sont pas trop sévères. L'implant cochléaire est la seule neuro-prothèse actuellement disponible et efficace dans le cadre de la réhabilitation des surdités totales (cophose). Son indication est également étendue aux neuropathies auditives. Récemment, une nouvelle entité pathologique auditive a été décrite : la surdité cachée. Le concept de « surdité cachée » est né d'observations chez des souris traumatisées par des surexpositions acoustiques. Histologiquement, une perte sélective d'une catégorie de fibres nerveuses auditives (impliquées dans le codage des intensités moyennes à fortes, fibres de hauts seuils) a été caractérisé. Fonctionnellement, il n'y a aucune altération des seuils auditifs et de la fonction cochléaire. Il n'existe actuellement aucun test fonctionnel pré-clinique ou clinique permettant d'objectiver cette entité pathologique. De plus, pour mettre en évidence cette entité physiopathologique, les analyses histologiques cliniques d'oreille interne sont quasiment impossibles. Par ailleurs, les dons de corps ne sont jamais associés à une documentation la plus exhaustive de la fonction auditive des « donneurs ». Il semble donc indispensable de développer de nouveaux outils d'évaluation fonctionnelle basés sur des méthodes électrophysiologiques non invasives. Ainsi, un profil exploratoire fonctionnel non-invasif caractérisant précisément cette nouvelle entité physiopathologie auditive obtenue sur un modèle animal, pourra sans difficulté être établi chez des patients présents des plaintes particulières (laissant suspecter une « surdité cachée »). La concordance entre profils exploratoires préclinique et clinique témoignera d'une atteinte cellulaire identique chez les patients. Ainsi, avec ces éclairages, la prise en charge de ces patients pourra sans doute être plus adaptée. Pour l'ensemble des expérimentations envisagées, la règle des 3R sera appliquée afin de limiter le nombre d'animaux utilisés (nombre maximal d'animaux utilisé n=10), d'avoir recours à des tests validés dans la littérature scientifique et de limiter la souffrance animale par le seul geste d'injection de la dose d'anesthésique (par une approche intrapéritonéale). Le recours à l'animal demeure indispensable pour la modélisation et l'étude de la complexité des mécanismes la physiologie auditive et neurale et du décryptage des processus physiopathologiques qui se mettent en place chez les patients. Le cochon d'inde est un animal qui présente une fonction auditive la plus similaire -dans sa physiologie (spectre auditif 500 à 40 000Hz) et dans son codage neural avec la fonction auditive humain (20 à 20000Hz). Les autres petits rongeurs ont une physiologie plus éloignée, car très haute fréquence (rat 4 000 à 50 000Hz, souris 5 000 à 100 000Hz). Certaines explorations audiologiques comme les otoémissions acoustiques (test de dépistage de la surdité à la maternité, une simple sonde identique à un écouteur de musique est positionnée dans le conduit auditif) peuvent être réalisé chez le cochon d'inde vigile et légèrement mis en contention, alors que le recours à l'anesthésie est incontournable pour les autres petits rongeurs. L'objectif de ce projet est (1) de normaliser sur un petit nombre (10) d'animaux « contrôle » (sans pathologie induite) des tests électrophysiologiques et acoustiques chez le cobaye et (2) de disposer d'images histologiques pour ensuite envisager d'autres projets de recherche avec modélisation de différentes surdités ou atteintes neurales auditives induites (suite à des traumatismes acoustiques ou à des effets indésirables ototoxiques de certaines molécules thérapeutiques). En effet, le Laboratoire dispose d'une solide expertise sur d'autres modèles animaux (souris, rat, gerbille) et souhaite développer ses compétences sur le cochon d'inde car des collaborations scientifiques sont prochainement envisagées avec des collègues qui utilisent également le cochon d'inde, et surtout dans le cadre

des études de réhabilitations des surdités avec des implants cochléaires (dimension anatomique des cochlées sont sensiblement identiques entre l'homme et le cochon d'inde).

17660 Dans le contexte actuel de préoccupations sanitaires et environnementales, les consommateurs ont tendance à limiter leur consommation de viande, voire à la supprimer au risque de générer des apports nutritionnels inadéquats qui peuvent être dommageables pour certaines populations comme les personnes âgées ou les femmes enceintes. La viande permet en effet de couvrir plus facilement les besoins nutritionnels en acides aminés indispensables, en minéraux (zinc, fer, selenium) et en vitamines de groupe B. L'ensemble des études épidémiologiques suggèrent en effet un rôle plutôt protecteur de la consommation de viande vis-à-vis du développement de la sarcopénie (perte de masse et de fonctionnalité musculaire). Cet effet pourrait s'expliquer par une teneur très élevée en protéines qui permet de couvrir plus facilement les besoins protéiques (qui augmente chez les personnes âgées alors que la consommation énergétique globale diminue) et par une qualité nutritionnelle des protéines carnées supérieure à celle des protéines végétales (en raison d'un meilleur équilibre en acides aminés biodisponibles). De même les études épidémiologiques mettent en évidence un moins bon statut en fer et vitamine B12 chez les végétariens par rapport aux consommateurs de viande. Ce qui entraîne un risque accru d'anémie (ferriprive ou par carence en vitamines B12 et B9) pour ces populations, effet particulièrement sensible chez les femmes et les seniors. Pour couvrir les besoins nutritionnels des individus, les nutriments doivent non seulement être présents dans les aliments, ils doivent également être biodisponibles. Cette biodisponibilité est souvent plus faible dans les produits végétaux, et globalement, dans le cadre de repas complexes, l'interaction encore produits animaux et végétaux dans la détermination de la biodisponibilité des nutriments est encore très mal connue. L'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation (2016) souligne l'insuffisance et la disparité des données concernant les coefficients d'absorption des nutriments en fonction de leur forme chimique, de la matrice qui les contient, ou du régime alimentaire, et la nécessité de poursuivre les recherches sur la biodisponibilité des nutriments.

L'objectif du projet Viandigest est de mesurer la biodisponibilité des nutriments d'un repas complet en tenant compte des interactions entre les constituants des aliments et en faisant varier la proportion de viande rouge dans l'apport protéique. Dans cette étude, des repas contenant des proportions variables de protéines carnées et végétales, avec ou sans apport de protéines laitières seront consommés par des miniporcs, modèle utilisé dans cette étude pour quantifier la biodisponibilité des nutriments. Celle-ci sera évaluée par la quantification des résidus alimentaires non-absorbés à la fin de l'intestin (principal site d'absorption des acides aminés, minéraux et vitamines d'intérêt pour l'étude), et par l'apparition des nutriments dans le sang. Cette approche nécessite la réalisation d'une fistule iléale pour collecter les éfluents digestifs, et l'implantation de cathéters vasculaires permanents. Les actes chirurgicaux nécessaires à la préparation des animaux seront réalisés sous anesthésie générale. Pendant les phases péri et post opératoires, un protocole sera mis en place pour prévenir d'éventuels processus douloureux et un suivi régulier des animaux sera réalisé par du personnel qualifié afin de garantir au mieux le bien-être des animaux. Les interventions nutritionnelles seront réalisées lorsque les animaux auront totalement récupérés de l'intervention chirurgicale (niveau d'ingestion et comportement normalisés).

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

17661 Première cause de mortalité en France, les cancers se développent à partir de cellules anormales qui se multiplient de manière incontrôlée au détriment de l'organisme. Les patients diagnostiqués ont souvent déjà des atteintes sur des vaisseaux avoisinants ou des organes distants. Les résultats des chimiothérapies demeurent décevants, de nouveaux traitements et de nouvelles techniques de diagnostic doivent être développés afin de limiter/éradiquer les cancers. Il existe ainsi une demande pressante de la part de l'industrie pharmaceutique pour l'identification de récepteurs spécifiques des cellules tumorales, permettant des approches de ciblage ou vectorisation d'agents d'imagerie et molécules thérapeutiques. Notre société et ses partenaires ont engagé le développement de vecteurs (V) conjugués avec différentes classes de molécules (agents d'imagerie, drogues thérapeutiques, oligonucléotides, siRNA) et proposés comme potentiels candidat-médicaments.

Ce projet est centré sur l'adressage sélectif de molécules vers des tumeurs afin d'en améliorer leur diagnostic/traitement. Cela consiste à injecter la molécule vectorisée (V-molécule ou conjugué) au patient, la V-molécule va reconnaître puis s'accrocher spécifiquement à sa cible dans différentes régions de l'organisme ou elle sera exprimée. En fonction de la nature de la molécule vectorisée utilisé on peut « éteindre » l'expression de différents gènes dans les organes cibles (oligo antisens, siRNA. . .), faire de l'imagerie in vivo (TEP, Fluorescence), augmenter l'index thérapeutique de drogues actives (Doxorubicine, Gemcitabine. . .). Dans notre cas, l'adressage sélectif se fait par l'intermédiaire de deux récepteurs : Le récepteur aux lipoprotéines de faible densité (LDL) LDLR et le récepteur à la Transferine (Tf) TfR. Le LDLR et le TfR sont abondamment présent à la surface des cellules de nombreuses tumeurs humaines (Pancréas, Glioblastome. . .). A cet effet des vecteurs (V), reconnaissant spécifiquement ses 2 récepteurs, et conjugués aux différentes classes de molécules, ont été développés et optimisés par nos collaborateurs possédant une expertise reconnue dans ce domaine (6 brevets).

L'objectif de cette étude scientifique est de développer de nouveaux candidats-thérapeutiques afin d'améliorer le traitement des cancers. Cette étude sera réalisée sur des modèles de souris porteurs de xenogreffes de cancer de différentes origines. Elle fera appel à une procédure spécifique : ciblage des tumeurs avec nos V-molécules.

Ce projet est conçu pour respecter au mieux la règle des 3R :

Le REMPLACEMENT : nous avons besoin d'un modèle permettant de reproduire d'un point de vue phénoménologique tout ce qu'implique le développement tumoral. Un organe isolé ou une espèce autre que les mammifères ne permettra pas d'évaluer la biodistribution et/ou l'effet du conjugué testé. Nous choisirons des modèles simples et exhaustivement décrits dans la littérature chez la souris.

La REDUCTION : Le nombre d'animaux par groupe expérimental a été réduit au minimum requis pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs. Le nombre total de souris pour cette étude s'élève à 600 souris athymiques. Il tient compte du suivi des modèles expérimentaux développés dans le projet et de la variabilité de développement des tumeurs qu'il peut exister dans les différents modèles.

Le RAFFINEMENT : Un enrichissement matériel (twists, cocon ou nid) de l'environnement des animaux est mis en place dans toutes les cages afin qu'ils expriment un répertoire diversifié de comportements normaux. De plus, une observation quotidienne des animaux porteurs de tumeurs, avec mesure régulière des volumes tumoraux, permettra d'établir quotidiennement un score prenant en considération la perte de poids, la présence de signes de douleur ou de souffrance notable (cardiaque, respiratoire). Afin d'atténuer toute forme de souffrance des animaux, des injections d'analgésique ainsi que des anesthésies gazeuses (pour les expérimentations) seront réalisées. Lorsque le point limite, tel que défini dans la grille de score, sera atteint, l'expérience prendra fin. A la fin du projet tous les animaux seront mis à mort.

17662 La zone Europe Nord-Ouest (appelée ENO) est une région densément peuplée où l'agriculture contribue de façon significative à la production de déchets agricoles et alimentaires. Afin de les réduire, la digestion anaérobie y est utilisée (2 000 sites sur cette zone) en convertissant ces déchets en biogaz et en digestats liquides riches en nutriments (DRN). Chaque site produit entre 4

000-70 000t/an de DRN (2-6kg d'azote/t NRD) dont la majorité sont épandues (biofertilisant) mais des limites réglementaires strictes sont imposées du fait de Zones Vulnérables au Nitrate (ZVN, Directive Nitrates 91/676/CEE) pour prévenir les risques d'eutrophisation. La majorité de l'ENO est soumise à cette directive (58 % de la zone UK, 100% des zones Bretagne et Flandre) engendrant un excès critique de DRN nécessitant des solutions. Sachant que l'azote étant l'un des principaux nutriments nécessaires à la production de microalgues, l'objectif à terme est de proposer une solution de recyclage des digestats de méthanisation comme sources de nutriments pour la production de microalgue, ces dernières étant riches en molécules d'intérêt (acides gras polyinsaturés, protéines, peptides actifs, etc...).

Ainsi, pour ce projet, des microalgues sont cultivées à partir d'une source d'azote apportée par le DRN (en fonction de la concentration en azote du DRN ou de la forme de l'azote la composition des algues varient d'où l'obtention d'hydrolysats différents). Après récolte, ces microalgues subissent une hydrolyse enzymatique. Cette hydrolyse casse les protéines présentes dans la matière ce qui lui permet d'obtenir des peptides qui selon leur taille présenteront des caractéristiques distinctes (nutritionnel pour l'appétence ou bien santé pour des peptides bioactifs). L'objectif de cette étude est d'évaluer l'impact de ces peptides sur la croissance et la santé digestive des porcelets. L'hypothèse est que les hydrolyses des microalgues libèrent des composés fonctionnels (eg : antioxydants, immunomodulateurs) pouvant promouvoir la santé digestive via la digestion, le contrôle de l'inflammation ou encore le stress oxydant. Le modèle utilisé est le jeune porcelet sevré sujet à un stress physique et psychologique à l'origine d'un ralentissement de croissance et de troubles digestifs.

Cette étude inclut 160 porcelets (50 % de mâles, 50 % de femelles) en post-sevrage repartis en 2 études, chaque étude permettant de tester un type d'hydrolysat (hydrolysat 1 : *Traustochytride*, hydrolysat 2 : *Scenedesmus*). Chaque étude d'un hydrolysat compte 4 groupes (n = 20 par groupe), chaque groupe recevant un aliment contenant une concentration différente de l'hydrolysat : 0 %, 1 %, 2 % ou 3 %.

Le protocole a été élaboré dans le respect de la règle des 3R : (1) Remplacement : Les mesures sur animaux sont requises pour répondre à l'objectif de l'étude car les effets résultent de processus biologiques dynamiques qui impliquent la digestion et le métabolisme qui ne peuvent pas être reproduits dans des modèles *in vitro* ; (2) Réduction: Le nombre d'animaux est suffisant pour détecter les différences statistiques entre les régimes expérimentaux (20 par traitement) ;(3) Raffinement : L'ensemble des mesures et suivi quotidien des animaux sont réalisés par du personnel formé et expérimenté dans le respect des points limites. En cas de souci de santé, le vétérinaire sera consulté et les animaux traités en conséquence. Concernant l'hébergement, les cages sont munies de parois transparentes et seront placées de façon à permettre un contact visuel, sonore et olfactif entre les animaux.

17663 Les écosystèmes de montagne, bien que vitaux pour les sociétés humaines, sont actuellement menacés à cause de nos activités. Ici, nous considérons deux indicateurs qui nous renseignent sur leur « santé » : les biofilms et les amphibiens. Les premiers sont des communautés de micro-organismes qui adhèrent aux surfaces immergées. Ils forment la base de la chaîne alimentaire des écosystèmes d'altitude et constituent la nourriture des têtards de certains amphibiens. Ces derniers participent activement à la purification de l'eau et forment le lien entre les mondes aquatique et terrestre, et sont donc cruciaux dans le fonctionnement des écosystèmes de montagne.

Pourtant, 40% des amphibiens sont menacés à l'échelle mondiale, à cause, entre autres, d'une panzootie: la chytridiomycose amphibiennne, causée par les champignons *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) et *Batrachochytrium salamandrivorans* (Bsal). La maladie est observée dans les Pyrénées où elle cause des déclinés de populations chez certaines espèces comme le crapaud accoucheur (*Alytes obstetricans*), que notre équipe étudie depuis plus de 10 ans. C'est est une grave menace pour les écosystèmes de montagne. Toutefois, même après plus d'une décennie de travail multidisciplinaire, on ne comprend toujours pas pourquoi certaines populations semblent épargnés par ce fléau. Plusieurs éléments suggèrent que les amphibiens pourraient être protégés par des facteurs environnementaux.

Notre objectif est d'évaluer si les biofilms peuvent réduire le risque infectieux posé par Bd, et si oui, de déterminer par quel(s) mécanisme(s). Nous voulons aussi déterminer si divers types de biofilms ont différentes capacités de protection, et s'ils peuvent aider à traiter l'infection. Notre hypothèse est que l'altération des biofilms par les activités humaines mène à un risque d'infection plus important pour les amphibiens. Pour la tester, nous avons conçu un projet d'une durée de 5 ans se divisant en 9 procédures : La première détaille les conditions d'acclimatation des têtards avant expérimentation. La deuxième consistera à évaluer la capacité nutritive des biofilms pour les têtards. Dans la procédure n°3, nous infecterons les têtards avec Bd, pour voir si le fait de vivre avec un biofilm (ou un certain type de biofilm) est associé à une diminution du risque infectieux. Dans la procédure 4, tous les groupes seront supplémentés, afin de voir si l'éventuelle diminution du risque infectieux est simplement due à une meilleure nutrition. Dans la procédure 5, les biofilms seront préalablement autoclavés afin de tester l'hypothèse d'une éventuelle prédation des habitants des biofilms sur Bd. Dans la procédure 6, les têtards seront en plus soumis à un polluant inorganique (micro-plastiques, qui peuvent perturber les têtards et les biofilms, et ainsi influencer l'épidémiologie de la maladie), pour mieux refléter les conditions de terrain. La procédure 7 récapitule les mesures d'entretien pour garantir le bien-être au cours du projet. La procédure 8 détaille les modalités de traitement thermique que l'on utilisera en conjonction avec les biofilms pour permettre une guérison et un relâcher des animaux dans le milieu naturel (procédure 9, si obtention de l'autorisation par les instances régionales).

Nous aurons besoin de 1200 têtards maximum. C'est un nombre conséquent, mais les 7 procédures seront échelonnées dans le temps, et si les procédures 4, 5 et 6 ne sont pas réalisées (dans le cas où la procédure 3 ne montre pas de résultat), le nombre de têtards utilisés se réduira à 660. Nous mesurerons la probabilité et l'intensité d'infection des têtards grâce à des écouvillonnages buccaux, non invasifs et indolores, chez des têtards de crapaud accoucheur. Cette espèce, bien qu'en difficulté par endroits dans les Pyrénées, est par ailleurs répandue et non menacée en France. Notre équipe a déjà pu obtenir l'autorisation de capture pour une étude similaire. Nous nous sommes d'ailleurs basés sur celle-ci, ainsi que sur des tests de puissances statistiques afin de réduire les effectifs au strict minimum. Nous espérons obtenir à nouveau l'autorisation de capture en milieu naturel, dans des populations en bonne santé. Sinon, nous utiliserons à la place des têtards d'une autre espèce d'Alytidés, la grenouille peinte du Maroc (*Discoglossus scovazzi*), mais issus d'élevage pour obtenir le nombre requis. Cependant, nos potentielles conclusions seraient moins transposables au milieu naturel avec cette espèce qui n'existe pas dans les Pyrénées.

Il se peut que certains têtards soient moins bien nourris que d'autres en raison d'un biofilm moins nutritif. Les biofilms représentent la source principale de nourriture des têtards en milieu naturel, ainsi nos conditions expérimentales ne s'éloigneront pas des conditions naturelles, sur ce point. Les têtards seront supplémentés avec de la nourriture industrielle adaptée si nous observons une dégradation de leur condition corporelle. Le traitement utilisé est celui qui présente le moins d'effets secondaires, d'après les connaissances scientifiques.

Nous sommes contraints d'utiliser des animaux vivants dans le contexte de notre étude. Les biofilms jouent à la fois sur l'hôte (nutrition) et le pathogène (pouvant être piégé dans le biofilm). Nous effectuons déjà une série d'expériences pour évaluer les interactions entre les biofilms et le pathogène, sans têtard, afin d'éviter au maximum le recours aux animaux. Cependant, il est indispensable d'impliquer l'hôte dans la dernière étape de notre démarche pour évaluer la composante nutritionnelle importante dans l'épidémiologie de cette maladie. Des études d'infection par Bd de peau d'amphibien (cellules d'adultes) cultivée in vitro commencent à être mises au point, mais seraient moins réalistes. Or, les têtards sont plus intéressants à étudier ici car (i) ils forment le réservoir du pathogène dans la nature ; (ii) ils ne meurent pas de la chytridiomycose, contrairement aux adultes. Choisir les têtards est donc plus intéressant du point de vue du raffinement (souffrance minimisée, et guérison plus facilement atteignable) et maximise les chances, en maintenant les animaux en vie, d'aboutir à des conclusions robustes.

Les enjeux de notre projet sont scientifiques avec l'amélioration des connaissances de l'écologie des écosystèmes de montagne et de l'épidémiologie des maladies infectieuses. En permettant potentiellement la mitigation des risques que ces dernières posent (par des méthodes naturelles -

biofilms- et non chimiques -traitement thermique-), il y a surtout des enjeux de bien-être et de préservation non seulement pour les amphibiens mais aussi pour les écosystèmes du monde entier.

17664 bahL'un des défis de l'écotoxicologie est d'appréhender la pression chimique toxique, parmi la complexité des multiples perturbations des milieux naturels. Dans ce contexte, l'importance du changement climatique global et de ses interactions potentielles avec les contaminants dans l'environnement a reçu une attention croissante. La combinaison du réchauffement et de l'acidification des océans pose des problèmes écophysologiques aux organismes, entraînant des effets interactifs négatifs sur la survie, la croissance, la reproduction et l'aptitude physiologique globale. Les mécanismes physiologiques impliqués lors d'effets combinés de substances toxiques et de stress climatiques peuvent être interprétés à partir de deux angles différents : (i) l'exposition à un facteur de stress lié au climat rend un organisme plus sensible à l'exposition à des substances toxiques, et (ii) l'exposition à un contaminant rend un organisme plus vulnérable aux changements climatiques. Cette sensibilité/vulnérabilité aux multi-stress, quelque soit l'angle d'approche considéré, est également dépendante du stade de vie pendant lequel l'organisme est exposé. Dans ce contexte de multi-stress (changement climatique, contamination chimique) et de dynamique temporelle (cycle de vie), le défi est de tenter de développer une approche intégrée permettant d'appréhender l'ensemble de ces facteurs. Dans ce « champ d'investigation » particulièrement complexe et ambitieux, l'objectif du projet est d'initier une étude permettant d'évaluer la capacité d'acclimatation d'une espèce face à un environnement changeant. Cette approche est essentielle pour anticiper les conséquences du changement climatique sur la fitness individuelle et la dynamique des populations, qui peuvent potentiellement affecter les services écosystémiques déjà fortement impactés par les contaminations chimiques. Afin d'avoir une vision globale des effets au niveau de la population, des épinoches des deux sexes seront utilisées. Le scénario retenu est le RCP8.5 du GIEC pour 2100, soit une température supérieure de 3° C et un pH diminué de 0,4 par rapport aux conditions actuelles d'élevage.

En lien avec les 3R, comme nous souhaitons prendre en considération l'intégralité des réponses physiologiques, nous nous basons sur des organismes vivants sans remplacement de ces derniers par des techniques alternatives trop spécifiques de quelques réponses physiologiques. Néanmoins, en ce qui concerne la réduction du nombre d'animaux, l'ensemble des paramètres biologiques est mesuré sur chaque individu, ce qui permet de minimiser le nombre de poissons utilisés : 3000 poissons à raison de 600 individus de la génération F0 (300 mâles et 300 femelles) pour être représentatif de 4 conditions différentes (condition actuelle + non exposé ; condition actuelle + exposé ; Giec 2100 + non exposé ; Giec 2100 +exposé) et 1200 individus (600 mâles et 600 femelles) par génération F1 et F2 pour être représentatif de 4 conditions différentes pour chaque génération (conditions climatiques actuelles : F1 issus de F0 non exposés, F1 issus de F0 exposés – GIEC 2100 ; F1 issus de F0 non exposés, F1 issus de F0 exposés). Le nombre d'individus par groupe est optimisé de façon à permettre une détection significative des variables mesurées (test de puissance). Concernant le raffinement, les conditions d'hébergement des animaux sont enrichies pour favoriser leur bien-être (hébergement en groupe, décors des aquariums, mise à disposition de caches). De plus, les animaux vont bénéficier d'une eau adaptée en termes de paramètres physico-chimiques et d'une période d'acclimatation suffisamment longue pour limiter le stress dû aux expérimentations. Tout au long de l'expérimentation, les animaux sont observés quotidiennement en se référant à la grille d'évaluation des points limites chez les poissons en application dans notre laboratoire et l'acclimatation sera immédiatement arrêtée si nécessaire. De plus, avant dislocation cervicale, les animaux sont anesthésiés avant chaque échantillonnage avec une dose non létale de Tricaine Pharmaq (100 mg. L-1). Pour ce qui est du remplacement, il n'existe pas d'alternative à l'utilisation animale dans ce contexte. Au cours de ce projet, toutes les expérimentations sont en accord avec la Directive 2010/63/EU relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques.

17665 Parmi les tissus des vertébrés, le muscle squelettique est l'un des plus remarquables : il présente un développement et une croissance prodigieux et possède de grandes capacités régénératrices.

Ces capacités de croissance et de régénération font de lui un organe très plastique. À l'origine de cette plasticité musculaire se trouve un réservoir de cellules souches, dont les plus étudiées à ce jour sont les cellules satellites qui, comme leur nom l'indique, se localisent en périphérie des fibres musculaires. Ces cellules sont mises en place au cours du développement. Elles sont présentes dans toutes les masses musculaires, où elles résident dans un état de repos jusqu'à ce que des signaux notamment environnementaux viennent les solliciter afin de participer à l'homéostasie et à la régénération musculaire.

Parmi les stimuli environnementaux, notre laboratoire s'intéresse plus particulièrement à l'impact d'une diminution du taux en oxygène dans l'atmosphère (hypoxie systémique) et/ou d'une exposition aux polluants environnementaux sur la fonction du muscle squelettique sain, dystrophique ou en régénération. Les principales approches mises en œuvre dans notre laboratoire pour répondre à cette question englobent un large éventail de techniques en biologie, en imagerie, des modèles de lésions musculaires et des souris modifiées génétiquement.

Dans notre étude, nos objectifs seront d'étudier l'influence d'un taux faible en oxygène inhalé (hypoxie systémique) ou d'un polluant, la dioxine sur l'homéostasie et la régénération du muscle après une lésion chez la souris. Pour ce faire, nous utiliserons deux modèles de régénération musculaire, un modèle de régénération suite à une lésion chimique (injection d'un venin de cobra) ou suite à une ligature de l'artère fémorale. Après les actes chirurgicaux potentiellement douloureux, notamment dans les modèles de lésion musculaire, les animaux sont suivis quotidiennement et une prévention des douleurs est assurée par un traitement analgésique approprié. Le polluant environnemental utilisé sera la dioxine, qui est le plus connu et le plus toxique des polluants environnementaux.

Les principes de remplacement, réduction et raffinement ont été pris en compte pour construire les protocoles expérimentaux de ce projet. Quand l'observation le permet, une approche préalable de remplacement par l'utilisation de cultures cellulaires est employée, ce qui permet par la suite de réduire le nombre d'expériences incontournables réalisées sur l'animal. Pour réduire, nous utilisons le minimum statistiquement possible de souris par groupe et nous favorisons l'utilisation de la patte controlatérale comme contrôle sans lésion. Enfin pour raffiner, on réduit la souffrance des souris en utilisant des sédatifs et analgésiques au cours des procédures. Et nous tentons également d'améliorer la qualité de l'élevage en enrichissant les cages expérimentales avec du coton, du carton et des maisonnettes en cellulose.

Notre étude fera appel à 1467 souris au total réparties sur 5 procédures expérimentales.

17666 En filière porcine, la castration est réalisée sur des porcelets d'une semaine d'âge ou moins, pour assurer la production de viande exempte de mauvaises odeurs à la cuisson.

Cet acte chirurgical est douloureux pour les animaux. Pour alléger leur souffrance, l'administration d'analgésique est actuellement pratiquée dans les élevages en France. Cependant, cela permet uniquement d'alléger la douleur post-opératoire. La douleur chirurgicale doit être allégée également par anesthésie. L'anesthésie gazeuse n'est pas envisageable en France car elle ne peut être pratiquée que par les vétérinaires. L'anesthésie locale par injection, qui permet d'insensibiliser les tissus innervés qui sont sectionnés au cours de la castration, ne peut être pratiquée que par des vétérinaires à l'heure actuelle, mais sera utilisable par les éleveurs pour la castration de leurs porcelets à partir du 1er janvier 2022. Pour optimiser la prise en charge de la douleur, les manipulations des animaux doivent se faire dans le calme, en essayant de réduire au maximum leur stress. Certaines molécules utilisées en phytothérapie peuvent aider à réduire le stress de la manipulation.

Ce projet étudie la mise au point de protocoles de prise en charge de la douleur, plus efficaces que ceux actuellement utilisés, tout en étant applicables dans les élevages de porcs biologiques, c'est-à-dire faciles à mettre en œuvre dans les conditions d'élevage souvent moins standardisées que les conditions d'élevage conventionnel.

Un protocole d'anesthésie locale et l'utilisation de principes actifs anti-stress issus de la phytothérapie seront testés. Ils seront comparés à un protocole d'anesthésie générale gazeuse

considéré comme témoin positif ainsi qu'à l'utilisation de bombe de froid, qui est actuellement utilisée par certains éleveurs en Agriculture biologique.

Le suivi des animaux sera réalisé au moment de leur prise en charge puis de l'application du protocole d'anesthésie, de l'acte chirurgical et dans les heures et quelques jours suivants. Le suivi portera sur l'observation du comportement, des vocalisations ou des expressions faciales (points réguliers). Des mesures du cortisol sérique seront effectuées suite à l'acte chirurgical. Dans les jours suivants, la sensibilité et l'état de cicatrisation de la plaie, les comportements spécifiques de la douleur seront relevés. Enfin, les performances de croissance seront relevées jusqu'au sevrage des animaux.

Remplacement : Sachant que le projet porte sur l'évaluation de la douleur ressentie par les animaux, il n'est pas possible de mettre en place de méthode de substitution qui évite l'emploi d'animaux vivants.

Réduction : Un maximum de 588 porcelets seront intégrés à ce projet. Cet effectif a été calculé sur la base d'études similaires, pour réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en conservant un effectif suffisant d'animaux pour pouvoir tirer des conclusions sur l'efficacité des anesthésiques utilisés.

Raffinement : Les animaux sont logés conformément aux réglementations définissant les conditions de vie des porcs d'élevage. Lors des interventions, les animaux ne sont jamais isolés de leurs congénères : les animaux de la portée auxquels sont administrés les traitements sont placés ensemble dans une caisse puis remis directement dans la loge avec leur mère une fois l'intervention réalisée. Les procédures utilisées sont des pratiques habituelles d'élevage (castration). Les castrations et les prises de sang seront réalisées par du personnel qualifié en respectant les règles d'hygiène et de sécurité.

17667 *Pseudomonas aeruginosa* (PA) est une bactérie responsable d'infections pulmonaires graves chez les patients atteints de mucoviscidose. L'implantation de PA est souvent favorisée par le Virus Respiratoire Syncytial (VRS). Au vu de l'émergence rapide de résistance aux antibiotiques et du manque d'antiviraux, il est capital de rechercher des alternatives thérapeutiques comme les probiotiques. Les probiotiques, parmi lesquels certaines souches de *Lactobacillus*, sont des microorganismes qui, administrés en quantités adéquates, confèrent un bénéfice à la santé de l'hôte.

Lors d'une étude princeps, un criblage bactérien réalisé à partir de 137 souches de lactobacille, toutes issues de patients atteints de mucoviscidose (patients CF), a permis d'identifier 2 souches à forte activité anti-PA. Nous avons mis en évidence que ces deux bactéries (*L. salivarius* et *L. brevis*), administrées préventivement dans un modèle murin C57BL/6 d'infection pulmonaire à PA, possédaient un effet anti-PA significatif très intéressant.

Nous avons également mis en évidence que la viabilité des lactobacilles était indispensable à leur activité anti-microbienne et que le mode d'instillation nasal permettait de lutter plus efficacement contre PA au niveau pulmonaire par rapport à une administration orale.

Au vu de ces premières étapes importantes menées avec succès, que sont l'identification des souches de *Lactobacillus* à fort potentiel anti-PA et leurs mécanismes d'actions, nous avons poursuivi les investigations dans un nouveau modèle murin BABL/c spécifique du VRS, compte tenu du fait que les infections virales au VRS favorisent la survenue d'infections bactériennes à PA.

Ce nouveau projet a pour but d'évaluer l'effet de l'administration intranasale de *Lactobacillus* en prophylaxie sur deux modèles mono-infectieux de pneumonie aiguë à Virus Respiratoire Syncytial (VRS) d'une part et à *P. aeruginosa* (PA) d'autre part, puis dans un 2ème temps sur un modèle de co-infection VRS-PA (modèle mimant la cinétique infectieuse observée chez les patients CF). Les expérimentations menées avec le VRS seront effectuées par des collaborateurs qui ont l'expérience de ce pathogène et du modèle murin spécifique à ce dernier. Seul le modèle mono-infectieux de pneumonie aiguë à PA (objet de cette DAP) a été expérimenté par notre équipe.

Nous avons ainsi mis en évidence que l'administration préventive de *L. salivarius* et *L. brevis*, engendrait également un effet anti-PA significatif très intéressant dans ce nouveau modèle murin BALB/c d'infection pulmonaire à PA.

Nous souhaitons désormais conforter ces données et mettre en lumière les mécanismes d'action en décrivant les microorganismes bactériens pulmonaires et digestifs, la modulation de ces microbiotes étant un processus fortement suspecté.

Nous utiliserons 42 souris BALB/c, afin de mener à bien ces expérimentations.

Nous analyserons la quantité de PA dans le poumon 24 heures après l'instillation du pathogène. Des dosages de molécules immunitaires pulmonaires et sanguins seront réalisés 24 heures après l'infection à PA. Des analyses du microbiote pulmonaire et digestif de ces souris seront également menées afin de définir les mécanismes d'action de ces *Lactobacillus*.

L'ensemble de ce projet respecte les principes de remplacement, réduction et raffinement. En effet les *Lactobacillus* ont été sélectionnés *in vitro* dans un premier temps (principe de remplacement), le nombre d'animaux a également été réduit au maximum sans compromettre les objectifs du projet (principe de réduction). Les animaux sont élevés à l'animalerie dans des cages enrichies avec un igloo et de la litière cellulose au sein d'un portoir ventilé et les procédures expérimentales utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible la douleur et/ou l'angoisse des animaux (anesthésie préalable des animaux avant toutes procédures expérimentales ainsi que l'utilisation de lampes chauffantes durant toute la durée de la procédure) (principe de raffinement).

17668 Le défi actuel de la recherche contre le cancer vise à trouver des nouvelles stratégies thérapeutiques dans le but d'améliorer la prise en charge des patients chez qui les traitements conventionnels demeurent inefficaces. L'objectif de ce projet consiste donc à étudier l'effet anti-tumoral d'une nouvelle molécule, un inhibiteur de kinases, dans le cancer colorectal. Lors d'un précédent projet, l'activité anti-tumorale de cette molécule a pu être montrée dans un modèle de tumeur colorectale sous-cutanée chez la souris. Son activité était corrélée au recrutement de cellules immunitaires dans la tumeur. De plus, cette molécule s'est révélée inhiber le développement des tumeurs lorsqu'elle était injectée avant la greffe des cellules tumorales. Avant de pouvoir envisager de proposer ce traitement aux patients, il nous faut déterminer les mécanismes par lesquels cette molécule induit la régression tumorale, mais également voir si elle peut inhiber le développement d'un cancer dans un modèle de tumeur induite chez la souris. Ce projet nécessite donc l'utilisation de modèles murins de tumeurs, puisque l'activité anti-tumorale de cette molécule semble nécessiter la présence d'un système immunitaire complet et fonctionnel. Ce projet va durer 3 ans et nécessite l'utilisation de 150 souris Balb/c, 30 souris Swiss Nude et 30 souris NOD scid gamma qui seront réparties comme suit :

1) Implication du système immunitaire dans l'effet anti-tumoral de l'inhibiteur de kinases. L'implication du système immunitaire dans l'activité anti-tumorale de l'inhibiteur de kinases sera réalisée par greffage sous-cutané de tumeurs d'origine colique en utilisant deux souches de souris (Swiss Nude et NOD scid gamma) dont le système immunitaire est déficient. L'identification des cellules immunitaires impliquées dans l'effet anti-tumoral sera quant à elle réalisée à partir de souris présentant un système immunitaire fonctionnel (souris Balb/c).

2) Effet protecteur de l'inhibiteur de kinases dans un modèle de cancer colorectal induit chimiquement. Cette deuxième partie visera à étudier l'effet de la molécule dans l'inhibition du développement d'une tumeur dans un modèle de cancer colorectal induit par des agents chimiques. Cela permettra de se rapprocher davantage du modèle humain, où les tumeurs ne sont pas greffées par un expérimentateur mais sont la conséquence de mutations. Pour cela, 60 souris Balb/c seront nécessaires.

Ce projet se déroulera en respectant la règle des 3R. Le raffinement se fera en veillant à ce que l'hébergement des souris soit fait en groupes de 5 ou 10, pour éviter la surpopulation des cages et le stress, tout en garantissant la vie sociale des animaux qui est indispensable dans cette espèce. De plus, du matériel d'enrichissement, qui leur permettra les jeux et la construction d'un nid, sera mis à disposition dans chaque cage. L'injection des cellules tumorales se fera par voie sous-cutanée

dans le flanc des souris, qui seront préalablement anesthésiées. L'inhibiteur de kinases sera administré deux fois par semaines par voie intra-péritonéale et le volume tumoral sera mesuré tous les deux à trois jours afin de s'assurer qu'il ne dépasse pas le point de limite. Cela permettra de détecter d'éventuels signes de souffrance (modification du comportement, perte de poids)) et d'envisager la mise à mort des animaux en cas de dépassement des points limites prédéfinis.

L'induction de tumeurs spontanées se fera en injection par voie intra-péritonéale de deux produits chimiques mono-dose ainsi que par l'administration d'un troisième composé dans l'eau de boisson. Ce modèle est déjà bien décrit dans la littérature, et n'est pas sensé induire de souffrance chez les animaux, tout en garantissant le développement lent et spontané des tumeurs (en 20 semaines). Puisque celles-ci se développent au niveau intestinal et que nous ne pourrions pas en suivre la croissance par des mesures, les souris seront surveillées de manière encore plus régulière, pendant toute la durée de l'expérience, afin de monitorer une éventuelle perte de poids et leur état général (prostration, poils hérissés, perte de vitalité, et tous les signes de souffrance). Les animaux seront mis à mort, après anesthésie, si leur souffrance dépassait les points limites prédéfinis. Le nombre de souris utilisé se limite au minimum nécessaire pour avoir des résultats statistiquement significatifs, dans le but de réduire le plus possible l'utilisation des animaux. Le remplacement du modèle animal n'est pas envisageable pour ce type d'expérience qui nécessite la présence de toutes les cellules constituant la tumeur (cellules tumorales, immunitaires...).

17669 L'objectif de ce projet est de produire, à partir de sérum de lapin, un immunosuppresseur sélectif utilisé pour lutter contre les rejets de greffe chez l'Homme en période pré et post opératoire, ainsi que pour traiter l'aplasie médullaire.

Le médicament est utilisé depuis les années 1980 (usage hospitalier uniquement). L'AMM définit le protocole de production du médicament et fige les modalités d'obtention de la matière active (dispositions communes à tout dossier réglementaire lié à l'agrément d'un médicament).

Le recours au lapin en tant qu'animal producteur d'anticorps polyclonaux a été évalué lors du développement du produit.

Le nombre total de lapins nécessaires à ce projet est de 5400 animaux pendant 1 an, ce qui correspond à la première phase du projet.

La mise en oeuvre de la règle des 3R (art R214-105) sera respectée selon :

- l'application d'une procédure expérimentale définie pour obtenir la plus grande quantité de sérum (contenant la concentration requise en anticorps) possible par animal ; l'utilisation des lapins mâles et femelles, (REDUCTION)
- l'absence de modèle alternatif au lapin pour la production des anticorps polyclonaux à l'heure actuelle des connaissances scientifiques, (REMPLACEMENT)
- l'utilisation d'un hébergement adapté (respectant le Bien Etre Animal et bénéficiant d'un enrichissement sous forme de bûchettes de bois à ronger) ; la réalisation du suivi quotidien des animaux par des personnes expérimentées et formées régulièrement ; une prise en compte et une évaluation de la souffrance animale en référence à une grille fixant les points limites et permettant de cesser l'expérimentation immédiatement sur tout lapin présentant des signes de souffrance dépassée ; une prise en charge de la douleur des animaux au cours de la procédure avec l'application d'un protocole d'anesthésie validé lors du dernier prélèvement de sang (RAFFINEMENT).

17670 Les facteurs externes ou environnementaux, tels que le stress ou l'exposition à des perturbateurs endocriniens, et les facteurs intrinsèques, tels que les stimuli métaboliques et l'état énergétique, perturbés dans certaines pathologies comme l'anorexie mentale, la malnutrition ou l'obésité, peuvent interférer avec les effets liés aux stéroïdes sexuels provenant des gonades. Les stéroïdes sexuels influencent de nombreux paramètres comportementaux chez les Mammifères et en premier lieu les comportements de reproduction.

L'objectif de ce travail est de construire un modèle de régime de type « western diet » afin d'explorer les effets associés de deux types de facteurs environnementaux, les perturbateurs endocriniens et

le régime alimentaire, sur les comportements de reproduction chez la souris mâle puis d'analyser les modifications cellulaires et moléculaires intervenant au niveau des structures cérébrales contrôlant ces comportements.

Pour mener à bien cette étude, nous allons élaborer un régime HF/HF/DEHPmix, constitué de l'association d'un régime HF/HF (High Fat/High Fructose) riche en graisses et en sucre, connu pour induire une obésité et un diabète de type 2, avec une exposition à un mélange de phtalates mimant l'exposition environnementale à ce perturbateur endocrinien (DEHP = DiEthylHexyl Phthalate). Cette association permet de modéliser les repas que l'on pourrait qualifier de « malbouffe » des pays occidentaux en y intégrant les interactions entre le contenant (récipient plastique contenant des phtalates) et le contenu (alimentation riche en lipides et en sucres).

Il s'agit de la première étape d'une caractérisation plus large des effets de ce type de régime sur les comportements en général et la physiopathologie, puisque de nombreuses données chez l'Homme indiquent des effets complexes du régime alimentaire, au-delà des altérations métaboliques.

Le projet portera sur des souris adultes C57Bl6 : 288 mâles adultes et 90 femelles. Le design expérimental a été élaboré dans le respect de la règle des 3R. Remplacer : il n'est pas possible de transposer les études comportementales in vitro ou in silico car il faut étudier les réactions de l'organisme en entier, Réduire : le nombre d'animaux a été calculé au plus juste pour garantir la puissance statistique de l'étude, enfin Raffiner : les protocoles sont élaborés dans le respect du bien-être animal, notamment en prenant en charge tout inconfort des animaux (enrichissement, analgésie adaptée, points limites).

17671 Ce protocole vise à enseigner l'anatomopathologie et les modifications moléculaires sur des modèles murins à des étudiants de licence professionnelle. En effet, de nombreux professionnels embauchant

ces étudiants ont signalé la nécessité d'intégrer des enseignements d'anatomopathologie, absents jusqu'à présent, au sein de ces licences, dans le souci d'une insertion professionnelle plus efficace.

Le protocole expérimental des travaux pratiques est cité ci-dessous :

La greffe de cellules murines B16F0 en sous-cutané chez la souris C57Bl6 est un modèle syngénique qui présente plusieurs avantages pour l'enseignement de l'histologie du cancer :

- c'est un modèle syngénique représentatif des interactions cellules tumorales/stroma puisque les cellules tumorales proviennent de ces souris
- les B16 sont des cellules de mélanome greffées en sous-cutané ce qui permettra d'obtenir sur les mêmes coupes histologiques de la peau saine et de la tumeur
- c'est un modèle tumoral se développant assez rapidement (15 jours)
- ces modèles murins ne présentent pas de risques biologiques pour les étudiants

Pour compléter les observations histologiques, des marqueurs moléculaires seront aussi recherchés au sein des tumeurs.

Le nombre d'animaux inclus dans ce projet a été optimisé conformément à la règle des 3Rs (Remplacement, Réduction, Raffinement). L'ensemble du projet comprendra 125 souris C57Bl/6J sur 5 ans. L'utilisation d'1 souris par binôme (donc pour 50 étudiants 25 animaux/an) répond aux exigences de réduction du nombre d'animaux utilisés : chaque souris recevra une greffe sur chaque flanc.

La surveillance quotidienne des animaux permettra de déceler les premiers signaux de stress, de douleurs ou d'inconfort pour l'animal qui pourront être améliorés par l'administration d'antalgiques avant l'atteinte des points limites définis. Les conditions d'hébergement seront optimisées (température, hygrométrie, luminosité, densité animale, enrichissement de milieu avec tube et coton) avec 5 souris par cage.

Signalons aussi qu'aucune méthode alternative n'est connue pour obtenir des interactions cellules tumorales/stroma en histologie à ce jour.

17672 Nous cherchons à limiter les effets du stress social prénatal sur les porcelets, en leur proposant des situations sources d'émotions positives que peuvent être les interactions avec une personne. Le stress gestationnel a un effet négatif sur l'état émotionnel des jeunes, leurs capacités d'adaptation à des stress. Il est possible d'améliorer ceci par des expériences post-natales positives chez le jeune. L'impact positif des interactions humaines de type caresses, parole douce, sur le bien-être et le développement du jeune a été mis en évidence dans de nombreuses études. Nous voulons voir s'il permet de moduler les effets délétères du stress prénatal chez les porcelets.

Pour cela, 5 groupes de 18 truies gestantes seront soumis à une restriction du temps d'accès à l'alimentation. Nous mesurerons l'activité comportementale et le taux de cortisol salivaire pour évaluer leur stress. Quelques jours avant la mise bas, les quatre truies les plus stressées et les quatre truies les moins stressées de chaque groupe seront sélectionnées pour suivre leur comportement maternel, les performances de reproduction et le comportement de leurs porcelets (total de 40 truies). Nous mesurerons le tempérament des porcelets à deux semaines d'âge. Au sevrage, 6 porcelets par portée seront suivis pendant 5 semaines. La moitié sera apprivoisée par des contacts positifs répétés chaque jour (parole, caresses) pendant 2 semaines et l'autre non. Nous observerons alors l'impact de cette relation à l'humain positive sur le comportement des jeunes. Au total, 85 truies seront observées en gestation, les portées de 40 d'entre elles, puis 240 porcelets après le sevrage.

Nous porterons particulièrement attention au respect des 3R dans ce projet. La notion de remplacement a été réfléchié mais il n'est pas possible à ce jour de modéliser le stress prénatal et la relation à l'homme, c'est pour cela que nous travaillerons avec des animaux. Le nombre de traitements et d'animaux a été choisi dans un objectif de réduction, afin d'être sûr d'attendre un nombre de 16 mâles et 16 femelles par lot, nous permettant de tirer des conclusions en s'affranchissant de la variabilité individuelle et en mesurant l'effet du sexe. Enfin, le raffinement sera assuré aussi bien pendant l'élevage (présence d'objets à manipuler, suivi régulier de la consommation d'aliment et du comportement) que lors des tests comportementaux qui peuvent induire un stress passager du fait de l'isolement social. Tout au long du projet, les animaux seront suivis quotidiennement au moment des repas par les personnes en charge de l'expérience ou les animaliers formés pour l'expérimentation animale. Tout animal souffrant sera soigné en fonction de son état, selon les recommandations vétérinaires.

17673 Le glioblastome multiforme (GBM) est le cancer du cerveau le plus fréquent, caractérisé par un développement rapide des cellules tumorales qui infiltrant profondément les tissus sains. Cette tumeur reste incurable. Le traitement de référence consiste en une exérèse suivie du protocole de Stupp : une radiothérapie et/ou une chimiothérapie concomitante, 4 à 6 semaines après l'acte chirurgical. Ce délai permet aux tissus de cicatriser et au patient de récupérer. Cependant, des récurrences tumorales apparaissent dans la plupart des cas à la bordure de la résection, dues aux cellules tumorales résiduelles. Ainsi, la médiane de survie des patients est d'environ 14 mois, avec un taux de survie à 5 ans inférieur à 5%. Une thérapie locale post-résection du GBM, entre l'acte chirurgical et le protocole de Stupp, semble une bonne stratégie pour limiter la présence des récurrences. L'utilisation d'un implant capable de délivrer une thérapie ciblée vers les cellules résiduelles de GBM semble être une voie prometteuse. Actuellement, il existe un implant qui s'appuie partiellement sur cette stratégie. Il s'agit du Gliadel®, un disque de polymère solide (wafer), permettant la libération localisée d'un agent anticancéreux. Cependant, cet implant a une efficacité modeste puisque l'actif anticancéreux n'est pas spécifique des cellules de GBM. Il présente d'autres désavantages tels que la difficulté d'ajustement dans la cavité de résection et des complications post-opératoires. Récemment, nous avons développé un nouveau hydrogel de nanoparticules. Il s'agit de nanocapsules lipidiques (NCLs) capables de s'auto-associer pour former une structure de type collier de perle. Cette structuration permet d'obtenir un hydrogel avec une rigidité se rapprochant de celle du cerveau. Ces NCLs peuvent être chargées en actif anticancéreux. Lorsque cet hydrogel est administré dans un environnement composé d'eau, la libération progressive des NCLs est observée. De plus, une fois toutes les NCLs libérées, une suspension liquide est retrouvée. Ainsi, après administration de cet hydrogel dans la cavité de résection, les NCLs se

détachent progressivement et il ne reste plus d'implant une fois qu'elles sont toutes libérées. Cet hydrogel a déjà été testé avec succès sur un modèle murin de résection de GBM avec une efficacité thérapeutique prometteuse. Néanmoins, ces NCLs ne sont pas spécifiques des cellules de GBM. Ainsi, nous avons développé un hydrogel de NCLs de deuxième génération, basé sur la même structure que celle décrite précédemment. Un peptide capable de cibler les GBM a été ajouté à la surface des NCLs sans affecter la formation de l'hydrogel. Les résultats *in vitro* ont montré l'efficacité du ciblage des cellules de GBM, ainsi que l'efficacité thérapeutique par rapport à l'hydrogel de première génération. Ainsi, nous souhaitons tester ce nouveau hydrogel sur le modèle murin de résection de GBM déjà utilisé, ainsi que d'associer cet implant post-résection avec la chimiothérapie utilisée dans le protocole de Stupp. Il s'agira de développer un implant anticancéreux utilisable lors de la prise en charge des patients atteints de GBM, implantable par le neurochirurgien après la résection du GBM. La forme hydrogel permettra une application plus pratique de l'implant, adapté pour couvrir parfaitement la cavité de résection, sans aucun produit de dégradation. La prise en charge du GBM sera donc améliorée par la mise en place d'un traitement spécifique comblant le gap entre la résection chirurgicale et l'initiation du protocole de Stupp. Le projet sera divisé en deux parties. La première consistera à tester différents gels de NCLs couplées ou non à différentes concentrations en peptide de ciblage, chargées ou non à différentes doses d'un actif anticancéreux : la Gemcitabine modifiée. Il s'agira de déterminer quelle combinaison aura l'activité anti-cancéreuse la plus efficace. Puis, le gel d'intérêt sera testé en combinaison avec du témozolomide par voie orale. Il s'agira d'évaluer l'effet complémentaire des deux traitements, voire une synergie thérapeutique. En prévision des difficultés possibles avec la résection tumorale, les groupes seront formés de 12 animaux afin d'assurer 10 animaux inclus correctement dans l'étude. Nous avons 19 groupes pour l'évaluation de l'efficacité anti-tumorale des hydrogels de NCLs et 9 groupes pour l'étude des effets complémentaires des traitements hydrogel et témozolomide, ce qui fait un total de $19 \times 12 + 9 \times 12 = 336$ souris. Tous ces travaux respecteront la règle des 3R en remplaçant ou à défaut, en réduisant le nombre d'animaux utilisés. Des premières expérimentations sur des cultures de cellules tumorales ont déjà été réalisées. Les NCLs en suspension couplées au peptide montrent un ciblage préférentiel des cellules tumorales par rapport aux NCLs non couplées, ainsi qu'une cytotoxicité plus prononcée lorsque celles-ci sont chargées en actif anticancéreux. Cependant, tester l'efficacité prolongée de l'implant par libération progressive des NCLs sur une longue période de temps ne peut pas être réalisé *in vitro*. De plus, l'objectif du projet étant de se rapprocher de la prise en charge thérapeutique actuelle chez l'Homme, une résection tumorale dans un cerveau pour tester les nouveaux traitements ne peut pas être réalisée *in vitro*. Ainsi, l'expérimentation animale avec un modèle déjà bien caractérisé est donc une étape indispensable et non remplaçable (remplacement). Les études sur l'efficacité thérapeutique des gels seront réalisées sur un premier lot de souris femelles (car le modèle est basé sur ce type de souris). Puis selon les résultats, un seul gel sera testé sur de nouvelles souris femelles en combinaison avec du témozolomide et permettra ainsi de réduire au strict minimum le nombre d'animaux (réduction). Une grille d'évaluation de la douleur sera utilisée au cas où un animal montrerait une souffrance qui impose l'arrêt de l'expérimentation. Au fur et à mesure des études précédentes, nous avons pu affiner cette grille et la prise en compte de la douleur animale. Enfin, un suivi quotidien du bien-être des animaux sera réalisé et plusieurs personnes seront impliquées dans ce suivi (raffinement).

17674 La neuromodulation thérapeutique est aujourd'hui employée chez l'Homme lorsque des approches médicamenteuses et/ou chirurgicales sont inefficaces ou impossibles à mettre en œuvre notamment pour traiter l'épilepsie.

Notre projet vise la validation d'un nouveau prototype de neuromodulateur adaptatif. Par adaptatif, il faut entendre que le neuromodulateur modifie constamment sa stimulation en fonction de l'état de certains paramètres mesurés en temps réel sur le patient. Le prototype testé existe en deux versions : une version dédiée à la recherche non implantable et une version miniaturisée implantable. Notre projet est divisé en deux phases. D'abord une phase de test sur des rats anesthésiés puis, en second temps, une phase sur des rats vigiles porteurs du prototype implantable. Quel que soit la phase du projet, les procédures se dérouleront en trois étapes (vérification des connexions,

entraînement/apprentissage et tests thérapeutiques) pour une durée totale d'environ 3h. Les animaux porteurs du neuromodulateur implantable seront suivis durant 4 semaines.

Remplacement : l'essentiel du travail de mise au point du neuromodulateur a été réalisé par calculs sur ordinateur. Il reste cependant strictement nécessaire qu'une validation finale soit réalisée par des tests expérimentaux avec un nombre limité d'animaux. Ce projet constitue cette validation finale.

Réduction : Le nombre total de rats utilisés dans ce projet est réduit à 30 rats car de nombreux tests de vérification et d'optimisation ont été réalisés sur ordinateur avec des modèles informatiques reprenant les propriétés électrophysiologiques du système cardiaque couplé à de la stimulation nerveuse.

Raffinement : Les chirurgies seront réalisées sous anesthésie et analgésie par un personnel formé et compétent pour ce type de chirurgie afin de limiter au mieux la douleur induite par celle-ci et permettre une récupération plus rapide des animaux.

En complément du suivi régulier des animaux hébergés dans l'animalerie de notre laboratoire, un soin particulier sera apporté aux animaux porteurs du neuromodulateur. Avant chaque enregistrement, le poids, la surveillance du pelage et une éventuelle déshydratation seront recherchés pour prévenir, anticiper et adapter nos soins, complétés par un traitement si besoin.

17675 Objectif scientifique du projet :

Nous avons montré que la protéine Y est surexprimée dans de nombreux cancers et qu'elle est sécrétée à la membrane des cellules cancéreuses uniquement dans ces conditions, ce qui lui confère une grande spécificité.

Nous avons développé un anticorps monoclonal ciblant la Protéine Y. Cet anticorps est actuellement testé pour une phase 1 chez l'homme. Des études in vitro et in vivo ont mis en avant la capacité de cet anticorps à bloquer Protéine Y et à induire la mort cellulaire des cellules tumorales. Nous avons développé une stratégie basée sur la radio-immunothérapie, qui consiste en l'utilisation d'anticorps comme des transporteurs de molécules radioactives vers une cible spécifique (en l'occurrence une tumeur). Cela permet ainsi d'imager ou d'irradier spécifiquement la zone exprimant la cible de l'anticorps utilisé suivant le radio-isotope utilisé. Ce domaine a fait l'objet de nombreuses études pré cliniques et cliniques amenant notamment la mise sur le marché de 2 anticorps radiomarqués pour le traitement des lymphomes non Hodgkiniens, le Bexxar® et le Zevalin®.

Objectif du projet et retombées attendues dans le domaine :

Notre projet a deux objectifs :

- Le premier est de développer un nouveau radio pharmaceutique permettant l'imagerie in vivo de l'expression de la Protéine Y au niveau tumoral. Le composé radioactif injecté qui se concentrera uniquement dans les tumeurs exprimant fortement la protéine Y, permettra sa détection par imagerie dans des modèles précliniques murins. Cette étude devrait nous permettre à terme de sélectionner des patients éligibles au nouveau traitement anti-protéine Y par imagerie.

- Le second objectif de notre projet est de développer un agent de radiothérapie métabolique en le couplant avec un isotope pertinent pour la thérapie afin de détruire les tumeurs de l'intérieur. Notre but est que la radio-activité se concentre dans les tumeurs exprimant beaucoup de protéine Y, que notre nouvelle molécule la détecte et se concentre à son tour dans le tissu tumoral. La radio-activité à forte dose locale devrait ainsi bloquer la division cellulaire et induire la mort des cellules cancéreuses.

Afin de répondre à ces objectifs différents modèles de souris seront utilisés dans cette étude: a savoir des souris avec xénogreffes et un modèle de souris transgénique qui développe des tumeurs spontanées.

Balance dommages/bénéfices :

L'utilisation de la souris est une nécessité pour ce projet car l'utilisation d'un organisme entier est indispensable afin d'analyser la dispersion spatiale des traceurs d'imagerie. En effet, des études de

la biodistribution de notre nouvelle molécule thérapeutique seront réalisées au sein des différents organes ainsi qu'une étude de sa potentielle toxicité sur les organes sains. Ces expériences ne sont donc pas réalisables sur des modèles *in vitro*. Brièvement, les animaux seront « imagés » afin de voir si le traceur s'accumule dans les tumeurs, favorisant leur identification de manière non invasive. En cas d'accumulation dans les tumeurs, un second radio-isotope sera couplé à l'anti-protéine Y, afin d'amener de manière ciblée une dose de radioactivité nécessaire pour tuer les cellules cancéreuses.

Pour ce faire, les animaux subiront pour ce projet des greffes de cellules tumorales, des injections en intraveineuses des différentes molécules thérapeutiques ainsi que des procédures d'imagerie.

Conformité avec la règle des 3R :

Le développement d'un nouveau traceur d'imagerie est en soit un effort de raffinement afin de ne pas procéder à la mise à mort des animaux. Les effectifs définis ont été déterminés à l'aide de comportement connu de ces différents modèles expérimentaux et tiennent compte des exigences statistiques nécessaires à l'exploitation des résultats. Les points limites ont été précisément définis et une surveillance adaptée des animaux tout au long des expériences permettra un contrôle de toute douleur animale. L'ensemble des procédures d'acquisition d'images sera réalisé sous anesthésie générale des animaux.

Nombre total d'animaux inclut dans ce projet : 2848 animaux au maximum.

17676 Les myopathies dégénératives sont des maladies incapacitantes dont les symptômes s'aggravent avec l'âge. Diverses pathologies ont été répertoriées chez l'homme. Ces myopathies sont généralement des maladies génétiques et nombre de ces pathologies sont liées à des mutations récessives ou co-dominantes identifiées chez les humains. Une grande partie de ces pathologies sont des maladies 'orphelines' pour lesquelles il n'existe aucun traitement à l'heure actuelle. Les atteintes musculaires sont généralement multiples et couvrent un champ étendu de la physiologie musculaire depuis des défauts métaboliques et/ou respiratoires pouvant aller jusqu'à des atteintes mitochondriales et de l'apoptose cellulaire ou des défauts dans le fonctionnement de la matrice extracellulaire qui mènent à la dégénérescence musculaire. Chez les malades, la progression de la maladie reste relativement imprédictible. Une même modification génétique peut aboutir à une évolution des symptômes très différente d'un individu à l'autre. Cette diversité est dû au contexte génétique et physiologique propre à chaque individu ainsi certainement qu'à des causes environnementales ou comportementales, lié au parcours personnel des malades. L'étude de la mécanistique de progression de ces maladies chez les humains est impossible car elle nécessiterait de réaliser des analyses invasives et incapacitantes.

Aussi, afin de mieux appréhender ces pathologies, les symptômes de la myopathie de Bethleem nécessitent d'être étudiés à l'échelle physiologique. A cette fin, deux lignées de poisson-zèbre ont été générées par invalidation ou mutation d'un gène conduisant au développement de la myopathie. Les poissons homozygotes seront élevés et des tissus seront prélevés à différents stades de développement par biopsie post-mortem afin d'effectuer des analyses électrophysiologiques, histologiques et métaboliques sur le tissu musculaire. Les performances de nage seront également testées afin d'évaluer les atteintes musculaires en situation d'exercice. Des lignées transgéniques seront créées afin d'étudier plus facilement, par fluorescence, les atteintes mitochondriales qui sont associées à ces myopathies.

Remplacement : il est important de développer des modèles qui permettent de comprendre la progression de ces maladies dans un contexte physiologique complet soit chez l'animal entier plutôt que d'utiliser des modèles *in vitro*. En effet, seuls les modèles animaux permettent d'envisager et de comprendre les causes dans les variations inter-individuelles d'expressivité de la maladie. Parmi les modèles animaux, le modèle de ces maladies préalablement établi chez le poisson-zèbre présente plusieurs avantages par rapport aux modèles établis chez la souris. En effet, les souches de poisson-zèbre utilisées en recherche présentent une diversité génétique importante, largement supérieure à celle des lignées de souris, aboutissant à des variations inter-individuelles plus grandes. Cet aspect est important pour se rapprocher au maximum du contexte dans lequel ces

maladies se développent chez les malades. Ainsi de façon similaire aux malades humains, les poissons-zèbres vont montrer une grande variabilité dans l'âge auquel les premiers symptômes vont apparaître.

Réduction : afin de réduire le nombre d'animaux porteurs des mutations causales de la maladie, un même sujet expérimental sera utilisé pour plusieurs types d'analyses (électrophysiologiques, histologiques, métaboliques,...).

Raffinement : des points limites adaptés à chaque procédure suffisamment prédictifs et précoces ont été établis afin d'éviter tout mal-être de l'animal. Le nombre d'animaux utilisés dans le projet sera de 2400 poissons-zèbres sur 5 ans.

17677 Un dysfonctionnement du système immunitaire peut provoquer la rupture de la tolérance au soi et être à l'origine du développement des maladies auto-immunes. Ainsi, la connaissance approfondie des mécanismes immunologiques impliqués dans la tolérance représente un enjeu capital pour améliorer à la fois la compréhension et le traitement des maladies auto-immunes.

L'objectif de ce projet est d'effectuer une induction in vivo de cellules Foxp3+ par injection d'IL2 humaine en doses croissantes. Ces cellules foxp3+, ont déjà été décrite comme étant des cellules T régulatrices (TCD4 ou TCD8) qui jouent un rôle clé dans le maintien de la tolérance immunitaire et la régulation des réponses immunes. Ce modèle d'induction des cellules Trégulatrices par de l'IL2 humaine a déjà été utilisé chez la souris a pu démontré son efficacité.

Nous souhaitons utilisés ce protocole afin de démontrer que ces cellules Foxp3+ du rat possède les mêmes capacités physiologiques d'induction, régulatrices et suppressives, ce qui n'est pas à l'heure actuelle démontrée. Cela concerne les cellules T régulateurs TCD4+ CD25+ CD127 low Foxp3+ ou les T régulateurs T CD8 CD45RC low Foxp3+. Tous en sachant que le modèle rat a permis la caractérisation des T régulateurs TCD8 CD45RC low qui n'avait pas été caractérisée dans le modèle souris.

Cela va nous servir comme modèle d'étude pour l'étude des cellules T régulatrices dans des modèles de rats génétiquement modifiés ou non afin de voir l'impact sur ces cellules T régulatrices.

Nous prendrons en compte tous les éléments nécessaires afin de limiter au maximum la douleur de l'animal. Nous limiterons donc au maximum le nombre d'animaux utilisés sur 5 ans à 176rats (femelles et mâles). Dans cette saisine, la règle des 3R a été suivie:

- Remplacer: Des études fonctionnelles in vitro ont été réalisées au préalable. Mais du fait de l'absence du contexte physiologique et de la complexité du système immunitaire, ces études ne peuvent remplacer les études in vivo.

- Réduire: le nombre d'animaux a été réduit à 176 rats, nombre nécessaire et suffisant pour permettre la génération à façon selon les besoins des différents partenaires de la plateforme. Nous avons également dans ce contexte pu mettre

en place une nouvelle technologie qui permet de diminuer de manière très significative le nombre d'animaux utilisés pour la création de ces modèles.

-Raffiner: Un suivi clinique et comportemental des animaux (poils hérissés, dos vouté, agressivité. . .) sera réalisé. Les animaux montrant des signes caractéristiques d'un mal être tel qu'un changement de comportement ou de souffrance

pourront être euthanasiés. De plus, afin de réduire l'angoisse, un produit d'enrichissement (tube en carton ou igloo en PVC (cages portoirs ventilées)) sera utilisé et placé dans les cages.

17678 Le glioblastome est une tumeur cérébrale qui se développe à partir des astrocytes et s'accompagne d'une neuroinflammation. C'est le cancer cérébral le plus fréquent (mais restant malgré cela rare) chez l'adulte, mais aussi le plus agressif. Son pronostic reste très mauvais, l'espérance de vie étant estimée à un, voire deux ans après sa détection. Les méthodes d'imagerie moléculaire nucléaire (notamment en tomographie par émission de positon (TEP) des tumeurs cérébrales peuvent contribuer à leur détection précoce ainsi qu'au suivi des patients après une intervention thérapeutique visant à augmenter l'espérance de vie du patient. Un certain nombre d'études (surtout

précliniques) ont récemment démontré l'efficacité d'imagerie en TEP des glioblastomes en utilisant des radioligands de la protéine translocatrice de 18kDa (TSPO). La TSPO est une protéine de la mitochondrie qui n'est pas exprimée dans le cerveau sain. En revanche, son expression peut être augmentée dans certaines pathologies, telles que les tumeurs cérébrales et la neuroinflammation. Cependant son rôle dans ces phénomènes neuro-inflammatoires reste flou. Le but de ce protocole est de suivre l'évolution d'un gliome induit par la mesure du TSPO, de la prolifération et de l'apoptose par imagerie TEP/TDMX chez le rat Wistar. 6 traceurs différents couplés au 18-Fluor seront utilisés pour comprendre le rôle de TSPO dans le glioblastome. Des études de biodistribution et de mesure des métabolites seront également réalisées.

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

-Réduire: Nous n'utiliserons que 6 animaux par groupe. Ce nombre est suffisant pour pouvoir faire des études statistiques dans ce modèle. De plus, l'imagerie nous permet de suivre un même animal plusieurs fois, ce qui réduit le nombre d'animaux à inclure.

-Raffiner: Enrichir l'environnement des animaux avec des tubes en plastique, former des groupes sociaux (3 animaux par cage). La nourriture et l'eau sont donnés ad libitum. Le cycle jour/nuit est 12/12h. Les animaux sont suivis quotidiennement par un personnel qualifié à l'aide de grille de cotation incluant des points limites. Ces points limites permettent de quantifier l'apparition de signe de souffrance et de mettre en place des actions correctives pour le bien être de l'animal. La chirurgie est réalisée sous anesthésie et analgésie et un suivi post-opératoire des animaux est effectué.

-Remplacement : nous sommes obligés d'utiliser des rats car l'objectif de l'étude est de visualiser la protéine TSPO au niveau cérébral par des mesures d'imagerie in vivo et d'étudier le métabolisme des radioligands. Cette étude ne peut pas se faire sur des cellules en culture.

Un total de 179 rats Wistar maximum sera utilisé dans cette étude sur 5 ans.

Les résultats seront analysés statistiquement selon le test non paramétrique de Mann and Withney, adéquat pour les petits effectifs.

17679 L'arrêt de la castration chirurgicale des porcelets mâles, qui est une intervention invasive avec des conséquences négatives en termes de douleur et de santé, pose des problèmes de bien-être liés au comportement spécifique de ces animaux. Les problèmes les plus cruciaux sont liés au comportement sexuel car les chevauchements à répétition peuvent être entrainer des chutes, elles-mêmes à l'origine de blessures importantes, comme des boiteries sévères ou des paralysies partielles de l'arrière train. De plus ces montes provoquent de l'agitation et peuvent être à l'origine de comportements agressifs. Une solution serait d'inhiber le comportement sexuel par un traitement à base d'extrait de gattilier ou « poivre des moines » (*Vitex agnus-castus*). Cette plante faisait partie de la pharmacopée traditionnelle pour réduire les « ardeurs sexuelles » des moines au Moyen-Age. De nombreux travaux scientifiques ont montré des effets significatifs des extraits de gattilier sur la fonction de reproduction mais ces travaux concernent essentiellement la femme. A notre connaissance, il n'existe pas de preuve scientifique d'une inhibition du comportement sexuel des mâles. Aussi, nous proposons de réaliser un premier test pour faire la preuve du concept. Si ce premier essai est concluant, d'autres expériences sont envisagées. Les mesures seront focalisées sur le comportement sexuel mais nous prévoyons également de contrôler la concentration plasmatique de testostérone et d'oestradiol en fin d'expérience car les effets du gattilier sur le comportement sexuel pourraient passer par leur inhibition.

L'essai sera conduit sur 36 porcs mâles non castrés dans une station expérimentale porcine. Les porcs seront répartis dans quatre loges de huit. Les porcs de deux loges recevront le traitement expérimental contrairement à ceux des deux autres loges. Le traitement sera appliqué pendant toute la phase d'engraissement (environ 4 mois). Des observations comportementales seront réalisées à différents stades pour quantifier la fréquence des comportements sexuels et une prise de sang sera effectuée en fin d'engraissement pour mesurer la concentration des hormones sexuelles.

La règle des 3 Rs a été prise en compte :

-remplacer : le projet concernant spécifiquement le comportement sexuel du porc en croissance, son utilisation ne peut être remplacée par une approche in vitro ou de modélisation,

-réduire : le nombre de porcs a été limité à trois cases de 6 porcs par traitement afin de vérifier que les effets comportementaux sont répétables d'un groupe à l'autre et de réaliser des tests statistiques sur les concentrations hormonales (18 porcs par traitement).

-raffiner : le nombre de prise de sang a été réduit à une seule par porc en fin de traitement, c'est l'objet de cette demande. Les porcs sont élevés sous chaïer des charges biologiques; ils ont accès à des courettes, de larges surfaces de litère paillées et des jouets.

17680 La desloréline est commercialisée chez le chien sous la forme d'un implant agoniste à la GnRH (Gonadotropine Releasing Hormone). La desloréline est un peptide à 12 acides aminés qui agit en se fixant sur les récepteurs à la GnRH avec une grande affinité. La molécule a un effet agoniste, mais devient antagoniste en cas d'exposition prolongée (comme avec un implant avec libération prolongée). L'exposition continue à la desloréline provoque une invagination des récepteurs à la GnRH et par conséquent l'inhibition de la synthèse de LH et FSH et, indirectement, de testostérone. A l'arrêt de l'exposition à la desloréline, les récepteurs à la GnRH sont de nouveau exprimés à la surface des cellules et la synthèse de FSH-LH-Testostérone reprend.

Cette molécule peut présenter un intérêt pour la production porcine dans le cadre d'une alternative à la castration chirurgicale pratiquée aujourd'hui majoritairement dans 80 % des élevages en France. En janvier 2022, les éleveurs en France ne pourront plus castrer les porcs sans envisager une anesthésie générale ou locale très contraignante pour les éleveurs et dont ils n'ont pas d'autorisation ni de formation à ce stade. La production de mâles entiers serait une voie possible mais cette production nécessite la mise en place d'un cahier des charges à la production ainsi qu'une détection des carcasses fiable par nez humain (seule technique à ce jour en abattoir disponible). Un frein important des clients des abatteurs à utiliser de la viande de mâles entiers persiste pour des raisons de la fiabilité de la détection en abattoir mais également de viandes maigres ou au gras de moins bonnes qualités technologiques pour les mâles entiers. A ce jour une technologie immunologique est présente sur le terrain mais son utilisation par les éleveurs est jugée contraignante (2 injections dont la seconde sur des animaux lourds 5 semaines avant l'abattage). La pose d'un implant une seule fois à un âge jeune constitue une nouvelle alternative plus séduisante pour les éleveurs.

L'entreprise qui commercialise la desloréline dispose d'une première étude sur l'efficacité de l'implant qui laisse espérer une très bonne efficacité sur la réduction du développement testiculaire, et par conséquent sur les teneurs en composés odorants à la base du développement des odeurs de verrats dans le gras à la cuisson. Les premiers résultats sur les niveaux de performances des animaux traités laissent espérer un effet sur la croissance des animaux. Les résultats sur les mesures de qualité de viande ne laissent pas entrevoir de défauts majeurs mais l'essai mérite d'être reconduit sur un plus grand nombre d'animaux et dans des conditions de production et d'abattage conventionnelles.

Cette étude vise donc à valider l'efficacité sur un échantillon plus important de porcs et de génétique européenne classique, de l'implant avec desloréline, à la fois sur les performances en élevage (vitesse de croissance, indice de consommation) mais également, sur les caractéristiques des carcasses et des pièces de découpe, ainsi que sur la qualité des viandes (exsudat, couleur, potentiel hydrogène ou pH) et des gras (risque d'odeur sexuelle de verrot dans le gras, teneur en gras de la longe, profils d'acides gras). Pour cela, 120 porcs mâles seront suivis de 25 et 120 kg de poids vif. 90 porcs seront des mâles non castrés et 30 des mâles castrés.

Ce type d'étude nécessite d'être réalisé sur l'espèce porcine et sur animaux (Remplacement). Les conditions d'élevage doivent être contrôlées de façon à satisfaire les besoins de confort des porcs à ce stade, en termes de logement, d'alimentation, d'abreuvement et de conditions d'ambiance (Raffinement). Cet essai implique l'utilisation de 120 animaux répartis en 4 groupes expérimentaux de 30, effectif considéré comme nécessaire pour une exploitation statistique des données à partir d'expériences menées dans des conditions similaires (Réduction). Les performances et la santé

des animaux seront suivies de façon régulière. Des prélèvements de sang en nombre réduit (Réduction) seront réalisés pour le dosage de la testostérone et de la Desloréline. Les animaux seront suivis par du personnel expérimenté (Raffinement).

17681 La leucodystrophie métachromatique est une maladie neurodégénérative conduisant à une perte de myéline (isolant de la gaine nerveuse) conduisant à des symptômes très sévères chez le jeune enfant avec une dégradation très rapide dans les 6 mois suivant les premiers symptômes et un décès des patients dans les 2 ans maximum.

Il n'existe à l'heure actuelle pas de traitement pour les formes symptomatiques de la pathologie pour lesquels nous souhaitons développer une approche.

Préalablement nous avons établi une preuve de concept de l'efficacité de la thérapie génique dans le modèle murin de la pathologie avec un vecteur adéno-associé (AAV) administré en intracérébral. Ceci a conduit à un essai clinique chez l'homme mais l'expression de la protéine (ARSA) n'est pas suffisante. C'est pourquoi aujourd'hui nous souhaitons évaluer de nouveaux vecteurs qui passent la barrière hématoencéphalique après administration intraveineuse et devraient permettre une expression de la protéine dans l'ensemble du système nerveux central et périphérique. Cette étape se fera tout d'abord chez la souris avec une étude en pré et post symptomatique afin d'évaluer un bénéfice thérapeutique.

1) Remplacement: Pour le réaliser, nous souhaitons utiliser un modèle animal (souris), car aucun modèle in vitro ou de culture cellulaire ne permet aujourd'hui d'étudier les symptômes de cette maladie mais aussi les marqueurs moléculaires et cellulaires. De plus, la souris est un modèle déjà utilisé et bien étudié, du fait des similitudes avec la pathologie humaine.

2) Réduction: Enfin, le nombre d'animaux utilisés est optimisé pour obtenir des résultats statistiques. En effet, des travaux précédents ont permis d'établir les doses de virus à injecter, les temps d'analyses. Ils ont également montré que l'étude de groupes de 15 animaux permettait d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. Ainsi, dans ce projet, nous prévoyons un total de 165 souris. De plus, un maximum d'analyses sera réalisé sur les cerveaux et la moelle épinière prélevés pour éviter des doublons des procédures expérimentales.

3) Raffinement: En cas d'observation de la moindre douleur, les souris recevront un traitement analgésique et anti-inflammatoire, et si cette douleur devait persister, les animaux seraient euthanasiés pour éviter toute souffrance. Notre modèle ne présente de plus pas de phénotype dommageable.

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

17682 L'agriculture est depuis toujours en constante évolution. Pour l'aider dans cette mutation la recherche agronomique a initiée de nombreux programmes de recherche, auparavant orientés vers l'augmentation des performances et l'amélioration de la productivité des espèces animales élevées et destinées à produire du lait et/ou de la viande. Aujourd'hui, elle s'orienterait plutôt à maintenir le niveau de production des animaux (ovins, bovins...) tout en prenant plus en compte les contraintes du milieu, les risques environnementaux (production des gaz à effet de serre, pollution des sols...) ou attentes sociétales (bien être animale, qualité des produits, traçabilité de l'alimentation...).

Pour répondre à une partie de ces enjeux, notre établissement utilisateur a un besoin constant d'animaux. Pour réaliser des études fines des mécanismes physiologiques d'ingestion et de la digestion des aliments chez les ruminants, les animaux modèles utilisés sont, ici des bovins laitiers. C'est un modèle animal de référence pour établir les valeurs de digestibilité et d'ingestibilité des aliments pour ruminants, et pour comprendre les processus digestifs afin de les modéliser.

Le projet dure 5 ans. Les expérimentations conduites nécessitent de disposer chaque année d'un troupeau de 70 vaches laitières et de leur descendance. Une partie de cet effectif est renouvelé chaque année. Dans le cas où les animaux disponibles sur la ferme expérimentale ne répondent pas en totalité aux attentes des scientifiques, en terme de nombre, de numéro de lactation, de date

de mises-bas... Nous ferons venir 25 bovins laitiers par an en provenance d'une autre ferme expérimentale, soit sur les 5 années du projet 125 animaux. Une fois le projet terminée, ceux-ci repartiront dans leur élevage d'origine.

Afin de réduire ou remplacer au maximum le nombre d'animaux utilisés et la sévérité des procédures appliquées, il existe des méthodes alternatives de type in vitro mais dont la précision des résultats ne permet pas toujours la généralisation.

La règle des 3R a été prise en compte pour l'élaboration du projet et de cette demande :

- i) recours à des méthodes invitro si possible (cf ci-dessus) ;
- ii) raffinement des procédures expérimentales pour réduire la douleur (antalgiques, anesthésiques, suivi post-opératoire), la souffrance et l'angoisse des animaux (habituation aux procédures, conditions d'hébergement et de contention adaptées, maintien du contact entre eux quand c'est possible, réduction du temps de présence en stalle de digestibilité, temps de repos suffisant entre les procédures appliquées et surveillance quotidienne de leur bonne santé) ;
- iii) schémas expérimentaux minimisant le nombre d'animaux : notamment approche en carré latin largement utilisée.

17683 L'impact de l'insuffisance rénale chronique (IRC) en Santé Publique est majeur puisque que l'IRC touche des millions d'individus au monde. L'IRC correspond au remplacement du tissu fonctionnel rénal par des protéines de la matrice extra-cellulaire, composant la fibrose, quelle que soit la cause de l'agression rénale initiale. Malgré des efforts de recherche considérable, il existe toujours très peu d'options thérapeutiques contre la fibrose rénale à l'heure actuelle. Les récepteurs cannabinoïdes 1 et 2 (CB1-2) ont émergé depuis peu comme une cible thérapeutique prometteuse dans les complications rénales des maladies métaboliques et du diabète, bien qu'ils aient été initialement découverts dans le cerveau. Le cannabis est les cannabinoïdes endogènes se lient naturellement sur ces récepteurs. Ils jouent un rôle important dans l'humeur, la mémoire et l'appétit mais sont aussi exprimé dans le rein, et notamment le rein malade. Il a été récemment démontré que l'inhibition de CB1 diminue la fibrose rénale dans un modèle de fibrose rénal expérimental chez la souris. Toutefois, il n'existe toujours pas à ce jour de preuve que l'inhibition de CB1 peut ralentir la progression de l'IRC et les mécanismes de cette action bénéfique sont inconnus.

L'hypothèse formulée est que CB1 conduit au développement de l'IRC et que son blocage peut protéger le rein, faisant de cette voie un nouveau traitement prometteur.

Les objectifs du projet sont donc les suivants :

- 1) démontrer que le blocage de CB1 réduit la fibrose rénale in vivo dans deux modèles d'IRC
- 2) identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans cette action bénéfique
- 3) vérifier que l'expression de CB1 peut être un marqueur précoce d'IRC chez l'homme.

A la fin des 5 ans alloués au projet, les résultats suivants sont escomptés : Établir que CB1 est un nouveau traitement dans l'IRC et la fibrose rénale et bien comprendre les mécanismes impliqués et utiliser l'expression de CB1 comme marqueur d'IRC chez l'homme.

Afin de remplacer si possible le plus grands nombre d'animaux, des expériences in vitro sur cellules de souris pour les mécanismes, et des biopsies rénales humaines seront utilisées pour la dernière partie du projet. Toutefois, les tests de traitements sur les maladies rénales ne peuvent être faites que sur l'animal mais le nombre d'animaux a été calculé de sorte à respecter la règle des 3R (réduction) avec le plus petit nombre d'animaux possible.

Afin de garantir le bien-être animal et respecter le principe de raffinement, les animaux seront hébergés dans des cages ventilées avec un enrichissement tel que des morceaux de bois pour leur permettre de ronger et des billes de cellulose pour les obliger à les déployer pour faire des nids.

Une surveillance pluri-quotidienne du bien-être animal, ainsi qu'une analgésie optimale est aussi prévue dans cette optique au cours des différentes procédures.

Au total, 471 souris seront utilisées pour ce projet.

17684 La neurotoxicité iatrogène est un réel problème en pratique clinique. Par exemple, certains anticancéreux neurotoxiques sont responsables de neuropathies périphériques chimio-induites (CIPN) correspondant à des lésions des nerfs périphériques. Ces CIPN sont très difficiles à traiter et peuvent perdurer longtemps après la fin des traitements et devenir de véritables séquelles des traitements pour les patients.

Ainsi, la détection précoce de cette neurotoxicité (neuropathie périphérique) lors du développement des médicaments est un enjeu stratégique pour l'industrie pharmaceutique et cela pour éviter de mettre sur le marché des médicaments responsables d'effets indésirables neurologiques. Cependant à ce jour, cette neurotoxicité est très difficile à mettre en évidence chez l'animal et surtout aucun biomarqueur précoce n'est clairement validé pour anticiper l'apparition d'une neuropathie périphérique chez l'animal et au final chez l'homme.

L'objectif de ces travaux consistera à étudier des biomarqueurs de neuropathie périphérique sur un modèle animal de CIPN induite par le paclitaxel. Le paclitaxel est un médicament anticancéreux utilisé contre de nombreux cancers et pourvoyeur de CIPN très invalidante pour les patients. Parmi les agents anticancéreux neurotoxiques, le paclitaxel a été choisi car c'est un anticancéreux de première intention dans la prise en charge des cancers bronchopulmonaires, du sein et de l'ovaire et celui-ci présente une forte neurotoxicité (40% des patients traités développent des CIPN).

Pour ce projet 120 rats males Wistar Han seront nécessaires.

Le nombre d'animaux a été choisi pour un nombre maximal de n=12 rats par groupe de traitement (2 groupes de traitement : contrôle, paclitaxel 5 mg/kg) avec la répétition de 5 modèles animaux pour couvrir un panel de tests comportementaux.

Pour l'ensemble des expérimentations envisagées, la règle des 3R sera appliquée afin de limiter le nombre d'animaux utilisés (nombre maximal d'animaux utilisés n=12 par groupe et possibilité de réduire le nombre lors d'analyse intermédiaire), d'avoir recours à des tests validés dans la littérature scientifique et de limiter la souffrance animale (même si l'objet de ces travaux est la neuropathie périphérique souvent associé à de la douleur neuropathique, les choix des doses d'anticancéreux ont été validés dans la littérature scientifique afin d'avoir des animaux dans un bon état général, indispensable pour la qualité et l'exploitabilité des résultats).

Le recours à l'animal demeure indispensable pour reproduire la complexité des symptômes présentés par les patients en clinique, c'est-à-dire l'administration intraveineuse d'un agent anticancéreux, un métabolisme et une symptomatologie clinique avec des anomalies comportementales non accessibles par des tests *in vitro*, *ex vivo* ou *in silico*. L'étude du comportement nécessite l'emploi d'animaux vigiles.

Les animaux seront suivis quotidiennement (week-end compris) afin de détecter tout comportement douloureux anormal. Le développement des modèles de CIPN impose des injections régulières (à minima 2 fois par semaines) avec une pesée des animaux permettant un suivi rapproché de l'animal (pelage, souillure et contrôle des points limites). De plus, le lendemain de chaque injection, un contrôle de l'état des animaux sera réalisé. Ce suivi est réalisé classiquement avec ce type de modèle animal. Comme l'objectif de l'étude est l'évaluation des troubles neuropathiques, il ne sera pas envisageable de prendre en charge les douleurs par un traitement antalgique conventionnel. Néanmoins l'environnement des animaux sera enrichi par l'ajout de jeux dans la cage des animaux.

Si un animal manifeste des troubles comportementaux en lien avec une douleur excessive (prostration, vocalisation, isolement dans la cage, pelage souillé, hérissé du poil), il sera alors euthanasié par inhalation de CO₂. Ces modèles sont suffisamment évolués (raffinement du choix des doses d'anticancéreux), de telle sorte que ce genre de comportement ne se rencontre que très rarement. Aussi, les tests comportementaux permettant d'évaluer les troubles neuropathiques chez les animaux nécessitent d'avoir des animaux dans un bon état général.

Les animaux seront stabulés dans des conditions standards d'au maximum 4 animaux par cage, dans une salle climatisée et auront un libre accès à la boisson et à la nourriture tout au long des expérimentations.

A l'issue du projet les animaux seront euthanasiés pour réaliser des prélèvements tissulaires souhaités pour l'étude (notamment tissus nerveux) et de sang pour des analyses ultérieures et dans l'objectif d'exploiter au maximum les modèles animaux réalisés.

17685 La vaccination consiste à administrer chez l'hôte une partie ou la totalité d'un microbe sous forme non-infectieuse, en présence d'un adjuvant. Les adjuvants vaccinaux sont des substances connues qui permettent d'augmenter la réponse immunitaire contre l'antigène microbien contenu dans le vaccin. Ils vont aider à développer une immunité spécifique en absence d'infection qui se traduira par la production des anticorps dirigés contre ce microbe. Enfin, les adjuvants sont essentiels pour le bon fonctionnement du vaccin.

Néanmoins des données épidémiologiques montrent que la vaccination contre un pathogène précis peut induire une certaine protection contre un autre agent infectieux. Cette protection croisée liée à la vaccination pourrait s'expliquer par une activation non spécifique de l'immunité par l'adjuvant.

Notre objectif dans ce protocole sera d'étudier si une vaccination par voie respiratoire contre le virus de la grippe peut induire une protection contre une infection respiratoire par un autre agent infectieux. Nous allons prendre comme modèle des agents infectieux respiratoires un autre virus respiratoire adapté à la souris et une bactérie responsable d'infections respiratoires chez l'homme. Nous voulons étudier si cette possible protection croisée s'explique par l'adjuvant vaccinal utilisé pendant la vaccination antigrippale.

D'un point de vue pratique, des souris seront vaccinées par voie respiratoire (oropharyngée) (deux doses à 10 jours d'intervalle) soit avec le vaccin complet, soit avec l'antigène seul, soit avec l'adjuvant seul ou soit non vaccinées (4 groupes). Nous allons tester 4 formulations vaccinales antigrippales contenant 4 adjuvants différents. Par la suite, les souris seront infectées par la grippe par voie intranasale et sacrifiées 4 jours, 8 jours ou 15 jours après infection. Avec la meilleure formulation vaccinale nous allons vacciner des souris avec le même protocole et par la suite, elles seront infectées par voie respiratoire (intranasale) soit par un autre virus respiratoire soit par une bactérie. Ces souris seront sacrifiées soit 4 jours ou 8 jours après infection (infections virales) soit 1 jour ou 2 jours après infection (infections bactériennes). Les infections se feront sur des souris anesthésiées pour éviter que les souris ne rejettent tout ou partie de la solution contenant le pathogène et avoir des charges virales/bactériennes homogènes entre les groupes de souris. Des analyses sur l'activation du système immunitaire et d'une éventuelle protection contre l'infection seront effectués après vaccination ou après infection dans les jours indiquées. Un prélèvement sanguin à l'œil est prévu avant sacrifice sur des souris vaccinées non infectées ou infectées par les virus respiratoires (4 jours, 8 jours ou 15 jours après infection). Afin de mieux comprendre les cellules immunitaires impliquées dans les mécanismes de protection vaccinal, des études complémentaires seront effectués sur des souris déficientes en certains cellules immunitaires.

Dans ce projet, l'ensemble des expérimentations a été mis au point afin de respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement pour permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal.

Par rapport au remplacement, la mise en place d'une réponse immunitaire est un processus complexe qui ne peut pas être récapitulé in vitro. Nous utilisons donc un modèle de souris qui est un animal très utilisé dans notre laboratoire et qui permet l'utilisation de nombreux outils disponibles pour l'exploration immunologique du modèle (mesure de la production d'anticorps, recrutement et activation de cellules immunitaires). De plus, l'infection par voie respiratoire du modèle souris fait intervenir de nombreux mécanismes physiopathologiques rencontrés dans l'infection humaine que nous ne pouvons pas reproduire par des techniques in vitro.

Nous avons estimé un nombre de 660 animaux pour les 5 années de durée du projet. Ce nombre a été calculé pour avoir 6 souris par groupe expérimental avec des expériences de 4 groupes (24 souris par expérience). L'estimation du nombre de souris nécessaires a été possible grâce à l'expertise de l'équipe dans d'autres protocoles d'immunisation.

Pour ce qui concerne le raffinement, les souris seront hébergées dans des cages propres (2-6 souris par cage) sur portoir ventilé dans une salle réservée à l'hébergement de souris. Une observation

journalière sera assurée par le personnel animalier. Comme mesure d'enrichissement de l'environnement de la cage nous mettrons du coton. Une période d'acclimatation (au moins de 7 jours) sera respectée avant le début du protocole. L'administration du vaccin par voie respiratoire et le prélèvement du sang au niveau de l'œil, seront effectués sous anesthésie générale (mélange d'anesthésique et antidouleur) pour réduire la douleur et la souffrance des souris. Suite au prélèvement du sang, l'animal sera euthanasié pour l'analyse de la réponse immunitaire. Pour les infections par voie respiratoire les souris seront soumises à une anesthésie légère et de courte durée à l'isoflurane pour assurer une respiration calme et ample.

Le raffinement sera aussi assuré par une surveillance quotidienne des animaux par le personnel de l'animalerie et un suivi clinique assuré par l'expérimentateur deux fois par semaine après administration du vaccin, puis un suivi clinique quotidien 6 jours après l'infection car les infections par les virus respiratoires de notre étude entraînent une perte de poids progressive de la souris notamment 6 jours après l'infection. Pour le suivi clinique, les souris seront observées et pesées. Une feuille de suivi de procédures sera disponible à l'animalerie pour suivre les procédures. Cette feuille sera signée par l'expérimentateur à chaque acte réalisé sur la souris. Un numéro de téléphone de contact sera disponible sur la feuille.

Ce protocole inclut des points limites qui seront évalués à l'aide d'une grille de score. Si le score limite est atteint, les animaux seront euthanasiés après constat de souffrance. A la fin de chaque procédure les souris seront euthanasiées pour l'analyse de la réponse immunitaire.

17686 L'accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique est provoqué par un défaut d'oxygénation d'une zone cérébrale, dû à l'obstruction d'une artère amenant le sang au cerveau. L'AVC induit fréquemment des déficits moteurs et cognitifs sévères. La majorité des patients AVC présentant des troubles moteurs et cognitifs modérés (bien qu'handicapants) ne sont pas pris en charge en centre de rééducation et sont donc exposés à des complications motrices, cardiovasculaires et métaboliques, affectant leur indépendance sur le long terme. Il paraît alors indispensable d'optimiser la rééducation dont l'exercice physique et les tâches cognitives font partie intégrante.

Nous avons récemment montré que les exercices de hautes intensités (relatives aux capacités physiques des animaux lésés) sont efficaces pour optimiser les capacités physiques d'endurance, la force musculaire et les mécanismes de neuroplasticité principalement dans l'hémisphère controlésionnel bien que les fonctions cognitives ne soient pas significativement améliorées. Cependant, il est fortement recommandé de combiner ces exercices d'endurance efficaces avec des exercices cognitifs afin de potentialiser les effets bénéfiques des exercices cognitifs.

L'objectif de ce projet est de définir l'efficacité de la combinaison d'exercices d'endurance (course sur tapis roulant) et d'exercice de mémoire sur la récupération fonctionnelle dans un modèle d'ischémie cérébrale chez le rat.

Dans un premier temps le modèle d'ischémie cérébrale (MCAO : occlusion transitoire de l'artère carotide moyenne) chez le rat âgé de 6 mois sera caractérisé par une évaluation comportementale et par imagerie médicale (imagerie isotopique).

Puis dans un deuxième temps, nous testerons les effets des entraînements physiques intenses (test d'endurance) et / ou cognitif (test de mémoire) sur la récupération fonctionnelle et métabolique post-ischémique. A la fin du protocole les animaux seront mis à mort afin de récupérer les tissus cérébraux pour faire des analyses moléculaires et des imageries ex vivo.

L'imagerie isotopique consiste à injecter une molécule radiomarquée (radiotraceur) au patient qui va s'accrocher spécifiquement dans différentes régions de l'organisme, le patient est ensuite placé sous une caméra capable de détecter la radioactivité qui donne une image 3D de la localisation du radiotraceur dans l'organisme. En fonction du radiotraceur utilisé, différentes régions peuvent être ciblées, par exemple : des cellules tumorales, des zones de nécroses ou encore des zones d'inflammations.

Il existe 2 types de caméras pour détecter les radiotraceurs : la TEP (Tomographie par Emission de Positons) et la TEMP (Tomographie par Emission Monophotonique) encore appelée SPECT ou

scintigraphie. L'imagerie isotopique est généralement associée à un scanner (CT) qui permet d'avoir une image anatomique.

La TEP et la SPECT sont les modalités d'imagerie corps entier les plus sensibles à ce jour et donc les plus appropriées quand il s'agit de détecter et localiser un phénomène moléculaire ou métabolique dont elles permettent une quantification absolue.

La règle des 3R sera respectée dans ce projet :

REMPLACEMENT : il n'existe à l'heure actuelle aucun modèle de substitution in vitro ou in silico pour étudier l'impact d'entraînements d'endurance et cognitifs post-ischémie cérébrale. Le rat est un modèle de choix car les adaptations physiologiques au niveau musculaire et cérébral induit par l'entraînement sont proches de ceux qui sont observées chez l'être humain et que le modèle d'ischémie cérébrale est bien documenté et maîtrisé par notre équipe.

REDUCTION : Sur l'ensemble de ce projet, nous utiliserons 252 rates Sprague Dawley âgées de 6 mois (adulte mature). Ce nombre d'animaux a été déterminé par méthodes statistiques afin de réduire au maximum l'effectif nécessaire sans compromettre la validité des expériences qui seront menées. Il tient compte du suivi des 6 groupes avec 5 radiotraceurs différents et d'une étude immunohistochimique et d'analyse par western blot. L'imagerie TEP et SPECT permet de suivre un même animal de manière longitudinale, contribuant à hautement réduire le nombre d'animaux nécessaires. Le protocole sera arrêté si l'animal présente des difficultés à respirer (visualisées par une augmentation du rythme respiratoire au niveau des flancs de l'animal), si le rat est prostré ou en retrait, si ses poils sont hérissés.

RAFFINEMENT : Au cours de l'étude, les rats seront hébergés par 2 dans des cages enrichies de dômes et copeaux, sur portoir ventilé, dans une pièce avec des cycles de lumière-obscurité de 12h, dont la température et l'hygrométrie sont contrôlées en permanence et avec un accès libre illimité à la nourriture et à l'eau. Le bien-être des animaux sera surveillé quotidiennement par du personnel qualifié ce qui nous permettra d'intervenir immédiatement dès le moindre signe de souffrance pour la prendre en charge. Pour limiter au maximum la souffrance et le stress des animaux, la chirurgie pour l'ischémie cérébrale se fera sous anesthésie et analgésie selon des protocoles internes validés avec notre vétérinaire référent avec une surveillance accrue des animaux jusqu'à leur réveil. La nourriture (humidifiée) sera à disposition de l'animal directement dans la cage après l'ischémie cérébrale. Toutes les imageries seront faites sous anesthésie gazeuse. Afin d'éviter la souffrance, tout signe et comportement anormal et /ou perte de poids supérieure à 20% du poids initial des animaux, entraîneront l'exclusion de ces derniers, et leur mise à mort sans délai.

17687 Ce projet a pour objectif d'évaluer l'efficacité de molécules thérapeutiques innovantes dans un modèle rat de spasticité induite par lésion de la moelle épinière.

1. La spasticité : un important besoin médical non satisfait

La spasticité est un trouble moteur associé aux lésions du cerveau et de la moelle épinière. Cette conséquence physiologique se caractérise par des contractions involontaires et permanentes des muscles, des postures anormales et des spasmes. Elle handicape lourdement 12 millions de patients dans le monde pour lesquels il n'existe pas de traitement satisfaisant. Chez les patients, le diagnostic fait intervenir des échelles de score et une évaluation électromyographique qui étudie le réflexe myotatique. Leur prise en charge doit être la plus précoce possible. Elle est pluridisciplinaire et fait intervenir : la kinésio thérapie, la pharmacologie et la chirurgie en dernier recours. Malheureusement, aucun de ces traitements ne soulage de façon satisfaisante la spasticité et les médicaments ont d'importants effets secondaires. La spasticité reste donc un important besoin médical non satisfait que nous adressons dans ce projet.

2. Le projet

La spasticité est une pathologie complexe qui implique de nombreux systèmes et pour laquelle les mécanismes sous-jacents ne sont pas complètement élucidés. Il n'existe donc pas de modèle de remplacement. Seule l'expérimentation animale permet de définir l'efficacité et l'innocuité de nouvelles molécules avant les premiers essais cliniques. Ces molécules sont en premier lieu identifiées par criblage moléculaire et cellulaire, avant d'être caractérisées in vitro et ex vivo.

Finalement, dans le but de sécuriser les essais chez les patients, ces composés doivent être étudiés dans un organisme entier afin de déterminer leur efficacité (dose, voie d'administration) et leur toxicité. Cette dernière étape est l'objectif visé par cette demande d'autorisation de projet.

a. Généralités

La spasticité, avant et après traitement pharmacologique, sera étudiée dans un modèle rat de transection complète de la moelle épinière. Ce modèle induit une spasticité stable 5 semaines après lésion. Il est reproductible et prédictif de la pathologie humaine. La spasticité sera quantifiée par électromyographie au travers de ses 2 symptômes majeurs : le Diminution Fréquence Dépendante (DFD) du réflexe de Hoffmann (réflexe-H) et les spasmes. Ce modèle a été validé entre nos mains avec des médicaments de référence comme le Baclofène. Nous utiliserons ces mêmes molécules comme contrôle positif.

b. Livrables

Dans un modèle rat de spasticité induite par transection médullaire complète, nous définirons :

- la cinétique d'établissement de la spasticité au cours du temps par électromyographie (DFD du réflexe-H, spasmes)
- l'efficacité (dose réponse) des molécules thérapeutiques candidates Vs contrôle (véhicule seul) Vs médicaments de référence : baclofène (2 mg/kg, SC ; 18 mg/kg, PO) et/ou (Tizanidine 1 mg/kg, SC ; 12, mg/kg PO)
- la toxicité des molécules thérapeutiques (Functional Observational Battery ; FOB)

c. Nombre d'animaux

Chaque série expérimentale permettra d'étudier l'efficacité d'un composé thérapeutique et comportera au maximum 75 rats répartis en 5 groupes :

- 15 animaux pour la phase pilote (non obligatoire) = 3 rats X 5 doses de la molécule candidate
- 36 rats tests : 12 animaux traités avec la molécule candidate X 3 doses
- 12 animaux contrôles négatifs (véhicule seul)
- 12 animaux traités avec un médicament de référence (contrôle positif)

Nous anticipons la réalisation de 2 séries expérimentales par an, soit un total de 750 rats sur 5 ans.

d. Remplacement, Réduction, Raffinement

La spasticité est une pathologie complexe, impliquant de nombreux organes, pour laquelle les mécanismes sous-jacents ne sont pas complètement élucidés. Il n'existe donc pas de modèle de remplacement permettant de modéliser la pathologie, et d'étudier l'efficacité de composés thérapeutiques. Néanmoins, afin de réduire le nombre d'animaux, nous nous assurerons de la validité et de la prédictivité des études in vitro avant de démarrer toute expérimentation, afin d'éviter de tester des composés non pertinents ou potentiellement toxiques. De plus, pour sécuriser les projets, des études pilotes pourront être réalisées (5 groupes de doses, n=3). Elles auront pour objectif d'évaluer la toxicité des composés et de rechercher les doses les plus prometteuses (dose range finding) afin de maximiser nos chances de succès. Finalement, le raffinement de nos procédures inclue :

- la gestion du stress et de l'angoisse: les animaux seront acclimatés (animalerie, nouveaux congénères, environnements de test) pendant 2 semaines, et habitués à la manipulation et à la contention. Ils seront également hébergés à 3 par cage, pour augmenter les interactions sociales, dans un environnement enrichi : coton, Enviro-dri, Cello House, poplar sticks
- la prise en charge précoce de la douleur : un même opérateur observera matin et soir chaque animal. La douleur sera objectivée en fonction de modifications de l'apparence, de la posture et du comportement (Miller, 2011). En parallèle, une échelle de douleur Rat Grimace Scale (Sotoclinial, 2011) sera employée. Dès les premiers signes de douleur, les rats seront traités à la buprénorphine (SC, 0.05 mg/kg/8h) pendant 7 jours.
- 2 évaluations cliniques quotidiennes : activité, poids, hydratation, transit, activité vésicale/infections urinaires, cicatrisation

- des soins vétérinaires adaptés : compléments alimentaires, sérum physiologique, antibiotique (amoxicilline, SC, 100 mg/kg), analgésique (buprénorphine, SC, 0.05 mg/kg/8h)
- l'intégration de points limites stricts : une grille précise d'évaluation sera utilisée afin d'anticiper la mise à mort si nécessaire. Dans tous les cas, l'ensemble des animaux seront mis à mort à la fin de l'expérimentation

17688 Les populations de saumon Atlantique et de truites de mer (Salmonidés) ont chuté de 70% depuis les années 1970. Différentes mesures de gestion peuvent être prises pour restaurer les populations, parmi lesquelles la reconnexion des habitats essentiels à l'accomplissement du cycle de vie. La France abrite des populations de truite de mer et surtout de saumon qui localement ont une très forte valeur patrimoniale. Ces espèces sont en effet emblématiques de nombreux fleuves. Les autres espèces de poissons migrateurs sont également menacées, comme les aloses (*Alosa alosa* et *Alosa fallax*) par exemple.

Le Ministre de la Transition Ecologique et Solidaire a, il y a quelques semaines, annoncé le démantèlement de barrages qui bloquent la colonisation de petits fleuves côtiers. Un des grands arguments en faveur de ces démantèlements est justement la reconquête de la continuité écologique. L'hypothèse d'une recolonisation de ces zones a été un élément fort pour motiver l'arasement étant donnée la problématique de conservation des populations de salmonidés. Ainsi, analyser, à différentes échelles spatiales et temporelles, les déplacements individuels et l'utilisation de l'habitat des poissons migrateurs dans les petits fleuves côtiers après l'arasement est une étape incontournable de l'évaluation de l'effet des mesures de gestion, très fortement attendue par les gestionnaires et les riverains.

Dans ce but, le comportement des saumons, truites de mer et aloses pendant leur migration estuarienne et fluviale sera étudié par télémétrie (radiopistage). Le signal émis par émetteur implanté dans les poissons est réceptionné lors du passage à proximité des stations d'écoute disposées stratégiquement sur leur route migratoire dans les fleuves, permettant ainsi d'analyser les déplacements des poissons.

En 2021-2022, un total de 100 poissons du genre *Salmo* (50 par année), et 60 poissons du genre *Alosa* (30 chaque année) sera ainsi marqué et suivi. En ce qui concerne les *Salmo*, il est attendu que la grande majorité des poissons capturés seront des saumons atlantiques, néanmoins, des truites de mer pourraient également être marquées.

Remplacement : l'objectif étant l'apport de connaissances sur les comportements migratoires et l'utilisation de l'habitat de ces deux espèces en milieu naturel, le remplacement est impossible.

Réduction : le nombre annuel d'adultes du genre *Salmo* (50) a été défini pour acquérir suffisamment de données pour fournir une image de la diversité des comportements. En ce qui concerne les aloses, le chiffre de 30 individus annuellement est jugé suffisant pour des tests de faisabilité.

Raffinement : les poissons capturés seront anesthésiés avant toute manipulation avec une solution de benzocaïne (concentration de 40 mg/L), puis seront surveillés par une personne compétente pendant leur récupération avant remise à l'eau quelques minutes plus tard.

17689 Plusieurs cas de pneumonies virales ont été décrits fin 2019 dans la ville de Wuhan en Chine. L'agent causal est un nouveau coronavirus (SARS-CoV-2) et la maladie associée, appelée COVID-19, s'est depuis propagée rapidement. L'organisation mondiale de la santé (OMS) a déclaré le 30 janvier 2020 que l'épidémie était une urgence de santé publique de portée internationale et le 11 mars 2020 qu'il s'agissait d'une pandémie. Début novembre 2020, plus de 46 millions de personnes avaient été infectées, parmi lesquelles plus d'un million sont décédées. En France, plus d'un million de cas d'infections ont été confirmés dont 50,000 décès.

Les coronavirus provoquent habituellement des infections hivernales bénignes telles que des rhumes. Toutefois, au cours des 20 dernières années, deux autres émergences d'infections respiratoires aiguës sévères ont été causées par des coronavirus : le SARS (« severe acute respiratory syndrome») en 2003 et le MERS (« Middle East respiratory syndrome») en 2012.

Les signes cliniques habituels de l'infection par le virus SARS-CoV-2 sont de la fièvre et de la toux. L'infection peut se compliquer de difficultés respiratoires, d'une détresse respiratoire aiguë sévère (DRAS) et d'une défaillance multiviscérale. De multiples troubles ont été décrits chez des personnes infectées (problèmes cutanés, sanguins...). Les complications graves touchent préférentiellement les personnes âgées, fragiles, obèses ou atteintes de maladies chroniques telles que le diabète et l'hypertension.

Actuellement, la communauté internationale ne dispose d'aucun traitement efficace contre ce virus pour contrer l'épidémie. Il est donc primordial d'explorer un maximum de stratégies pour prévenir et traiter l'infection par le SARS-CoV-2.

Depuis le début de la pandémie, de nombreux projets nationaux et internationaux ont été lancés et nous avons été sollicités pour plusieurs d'entre eux.

Cette demande d'autorisation concerne deux projets européens, dont un de très grande ampleur (H2020), et pour lesquels les financements ont été acceptés. L'objectif de ces projets est d'abord de mettre en place un modèle de forme sévère de la Covid19 et en parallèle d'évaluer, dans un modèle primate non-humain, l'efficacité de multiples approches thérapeutiques contre le virus SARS-CoV-2. Il est aujourd'hui impossible de reproduire in vitro la complexité d'une infection virale et d'une réponse immunitaire. Le recours à des modèles animaux (rongeur puis primate non-humain) est donc nécessaire pour apporter un maximum d'informations avant la réalisation des essais cliniques chez l'humain, et ne peut être remplacé par tout autre modèle ne représentant que partiellement un organisme. Le modèle primate non-humain, par sa proximité génétique avec l'être humain, représente un modèle plus pertinent que le modèle murin, dont le système immunitaire est très éloigné de celui de l'humain. En effet, l'infection du primate non-humain par le SARS-CoV-2 reproduit les symptômes observés chez l'humain pour les formes peu sévères. Ce modèle a déjà été validé dans notre laboratoire. De plus, certains des traitements qui seront testés ici ont déjà été évalués chez le modèle primate non-humain dans le cadre de recherches sur d'autres maladies.

Deux étapes sont prévues dans le cadre de cette demande d'autorisation :

- approfondir et mieux caractériser le modèle d'infection du primate non-humain par le SARS-CoV-2, qui reproduit les symptômes humains. Notre approche tentera de modéliser également des formes plus sévères de la maladie
- évaluer plusieurs traitements et leurs modes de délivrance afin de cibler spécifiquement les organes touchés (tractus respiratoire principalement)

Au maximum seize traitements seront testés, dans le cadre des deux projets. Pour cela, il est prévu d'utiliser au maximum 232 animaux, nés et élevés en captivité dans un établissement agréé, sur une durée de 5 ans (soit en moyenne 46 animaux/an). Ce nombre prend en compte les différents scénarios des projets. Il est donc attendu que, potentiellement, moins d'animaux soient utilisés. Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux sera réduit au minimum nécessaire pour permettre une interprétation statistique fiable des résultats. Les méthodes expérimentales ont été définies de manière à éviter toute souffrance lors des interventions (limitation des volumes sanguins prélevés ; imagerie in vivo afin de limiter le plus possible le recours à des biopsies tissulaires, expositions au virus et administration d'antiviraux réalisées sous anesthésie générale si invasives, pose de puces électroniques de suivi de la température). Les critères d'alerte vétérinaire et d'arrêt sont prévus dans le projet en cas de progression de la maladie ou d'éventuels effets inattendus des molécules thérapeutiques testées. Les vétérinaires de l'installation seront alertés et mettront en œuvre des traitements en adéquation avec l'expérience. Les animaux seront hébergés en groupe lors des phases d'immunisation et en individuel dans des modules contigus permettant des interactions sociales lors de la phase d'infection aiguë (durée attendue d'une quinzaine de jours). Ils bénéficieront d'un programme défini par la cellule « bien-être animal » de l'établissement pour l'enrichissement de leur milieu de vie et qui sera renforcé lors des phases d'hébergement individuel.

17690 La leucémie est un cancer caractérisé par la prolifération excessive et le blocage de la différenciation des cellules immatures du sang, localisées dans la moelle osseuse. Selon la cellule

d'origine à partir de laquelle la maladie se développe et selon la vitesse de ce processus, on peut distinguer les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) et myéloblastiques (LAM) et les leucémies chroniques lymphoïdes (LLC) et myéloïdes (LMC). Parmi les LAL, on distingue les LAL-B (qui touchent les progéniteurs des cellules qui produisent normalement les anticorps) des LAL-T (qui touchent les progéniteurs des cellules impliquées dans l'immunité cellulaire). Au niveau moléculaire, cette maladie résulte de mutations qui activent des oncogènes ou inactivent des gènes suppresseurs de tumeur, à travers des mécanismes qui, aujourd'hui, ne sont pas encore complètement compris.

Les leucémies affectent enfants et adultes, et malgré le fait que dans les dernières années beaucoup de progrès ont été fait du point de vue thérapeutique, des rechutes fatales sont observées dans 20 % des cas pédiatriques et 50% des LAL-T de l'adulte. Il est donc essentiel de poursuivre la dissection des mécanismes moléculaires conduisant à ces pathologies pour concevoir des thérapies ciblées pouvant améliorer la survie des patients leucémiques.

Résumé de la recherche.

Remplacement : Des données bibliographiques et des données expérimentales in vitro montrent que des protéines appartenant à la famille BCL-2 sont essentielles pour la survie des cellules leucémiques. Cependant, les expériences in vitro utilisées dans le cadre du « Remplacement » ne sont qu'une vue simplifiée de la « vie » d'une cellule leucémique et ne tiennent pas compte de l'interaction d'une cellule cancéreuse avec son environnement qui lui apporte des éléments de survie grâce à la production de facteurs de croissance etc.... L'utilisation de modèle in vivo est donc nécessaire afin de vérifier si l'inhibition des membres de la famille BCL-2 est efficace aussi dans ces conditions. L'objectif est de tester ces molécules sur les modèles les plus pertinents à savoir des cellules provenant directement de patients (biopsies) et inoculées à des souris permettant leur greffe.

Réduction : Cette leucémie étant génétiquement hétérogène il est nécessaire de tester au moins 15 types différents de LAL-T afin d'analyser si ces inhibiteurs ont un spectre large ou spécifique. Chaque tumeur sera injectée à une cohorte de souris qui sera ensuite séparée en groupe contrôle (non traité) ou traité avec chacun des inhibiteurs test. Le nombre de souris par groupe (5) permet une analyse statistiquement pertinente (Anova/Test Tukey) et prévient la répétition des expériences (Réduction). Dans le cadre de la règle de « Réduction », seules les tumeurs présentant une réponse à l'un de ces inhibiteurs seront étudiées plus en détail en combinatoire avec d'autres traitements, un maximum de 1434 souris seront donc concernées par ce projet.

Raffinement : Tous les animaux sont quotidiennement examinés en accord avec une grille de score pré-établie, dans le cadre de la prise en charge de la douleur afin de détecter une potentielle souffrance (Raffinement).

17691 L'insuffisance rénale aiguë (IRA) est une complication majeure très fréquente dans les services de soins intensifs (SI) et en réanimation. Elle est à l'origine d'une morbi-mortalité importante chez les patients. Il n'existe actuellement aucun traitement efficace de l'IRA. Seule une approche préventive pourrait limiter les effets délétères de l'IRA chez le patient hospitalisé en SI.

Pour faciliter certains soins invasifs, tels que la ventilation, et diminuer l'anxiété, les patients en SI sont la plupart du temps sédatisés. Cependant, les médecins ont observé que la survenue de complications rénales en SI peuvent différer en fonction du sédatif utilisé. Certains sédatifs peuvent entraîner des complications rénales à cause de leurs effets sur la pression artérielle. A l'inverse, d'autres sédatifs, tels que le Propofol, semblent jouer un rôle protecteur sur le rein, via des mécanismes qui restent à identifier.

Il est cependant indispensable de mener des études in vivo, sur un modèle animal, pour établir de manière définitive le lien de causalité entre l'administration du propofol et la protection vis-à-vis de l'IRA.

Notre projet a pour objectif de comparer les effets des deux sédatifs les plus utilisés (Propofol et Midazolam) sur la survenue et les conséquences d'une agression rénale afin de tester le rôle protecteur du Propofol.

Nous projetons de tester cette hypothèse chez la souris, dans un modèle animal reproduisant une agression dans le rein semblable à l'IRA. Le modèle d'agression rénale que nous avons choisi d'utiliser est celui de l'ischémie-reperfusion, à savoir l'interruption de la circulation sanguine (ischémie) dans le rein pendant 20 minutes suivie du rétablissement de cette circulation (reperfusion). Nous comparerons l'effet du Midazolam et du Propofol sur la fonction et la structure du rein de souris contrôles et de souris qui ont subi une ischémie rénale.

Notre projet a été élaboré de façon à respecter au maximum la règle des 3R. Nous allons notamment réaliser une partie de la caractérisation du rôle des deux sédatifs dans la protection rénale dans des modèles cellulaires in vitro. Mais ces expériences in vitro ne peuvent pas à elles seules démontrer l'hypothèse décrite ci-dessus. Il faut réaliser les mêmes tests dans l'organe complexe qu'est le rein, composé de plusieurs types de cellules chargés chacun d'une mission spécifique (cellule épithéliale tubulaire, cellules de la paroi des vaisseaux et cellules du système immunitaire). Le nombre de souris nécessaires à notre étude (80) a été calculé de sorte à réduire au maximum l'utilisation des animaux. Il tient compte des variations inter-individuelles et inter-expériences de la pathologie rénale, et de la nécessité d'utiliser des tests non paramétriques (la quantification des lésions rénales ne suivant pas une distribution normale). Il est nécessaire de prévoir par expérience 10 animaux dans chaque groupe (4 groupes au total), et d'effectuer 2 fois les expériences.

Le bien-être des animaux est assuré par un enrichissement de leur environnement grâce à l'utilisation d'une litière à base de cellulose composée de plusieurs éléments, de tailles différentes (matière compacte initialement, décompactée par les animaux) et de morceaux de bois à ronger. Les animaux sont observés quotidiennement par des personnes habilitées (responsables projet et personnel de l'animalerie).

Pour assurer le bien-être des animaux pendant et après la chirurgie, des antalgiques seront administrés avant et après l'opération. Les procédures chirurgicales sont réalisées sous anesthésie générale.

17692 Nous formons des étudiants au métier de technicien agronome. Des enseignements de production animale leur sont dispensés et ceux-ci consistent notamment en la description des méthodes permettant la maîtrise de la reproduction des mammifères. Une partie de nos diplômés est destinée à travailler en centre de sélection ou dans des élevages où sont réalisées des créations de lignées. La manipulation d'embryons murins permettra donc de former nos étudiants à diverses méthodes associées à ces activités.

Ce projet décrit des travaux pratiques consistant en l'apprentissage de la réalisation de prélèvements de gamètes et d'une Fécondation In Vitro chez la souris. Les étapes de réimplantation d'embryons seront également abordées.

Au préalable, les étudiants auront progressivement appris à manipuler, anesthésier, prendre soin des animaux en expérimentation, grâce au suivi d'une formation à l'expérimentation animale de niveau A, préparée en parallèle de leur diplôme = Raffinement.

Durant une première séance de TP, les étudiants seront entraînés aux prélèvements de gonades sur support non vivant (cadavres d'animaux décongelés, réformés de laboratoires de recherche) et après visionnage de vidéos = Remplacement.

En vue de la seconde séance de TP, 26 souris femelles seront chaque année traitées pour une superovulation (soit, sur 5 ans, 130 souris), via 2 injections sous-cutanées d'hormones. Ces injections seront réalisées par les techniciens de l'animalerie ou par l'enseignant.

En début de séance de TP, ces souris femelles seront mises à mort par les étudiants, dans une zone au calme et de manière humainement acceptable = Raffinement.

Des prélèvements d'oviductes seront alors réalisés par les étudiants pour en extraire les gamètes puis des FIV seront réalisées et le développement des embryons obtenus sera suivi pendant trois jours avant congélation (stades préimplantatoires).

La dernière séance de TP consistera en un entraînement de réimplantation intra-utérine des embryons décongelés sur support non-vivant (cadavres de souris décongelés, récupérées de laboratoires de recherche) = Remplacement.

Ces travaux pratiques seront par ailleurs réalisés en effectif réduit, sous la tutelle d'enseignants expérimentés portant grande attention au bien-être de l'animal = Raffinement.

Pour une promotion annuelle de 52 étudiants, 26 souris femelles seront utilisées, ce qui correspond, sur 5 années d'enseignement, à un effectif de 130 souris. En effet, par souci de Réduction, nous ne souhaitons pas distribuer une souris par étudiant mais seulement une souris par binôme.

Le bien-être des animaux sera évalué tout au long des procédures, une analgésie adaptée sera mise en place si nécessaire et des points limites auront été définis à l'avance = Raffinement.

17693 La dépression touche 100 millions de personnes en Europe chaque année, cependant il n'existe pas aujourd'hui de traitement réellement efficace. C'est pourquoi il est urgent de mieux comprendre les mécanismes neurobiologiques qui sous-tendent le développement de la dépression chez certains individus et au contraire, la résilience chez d'autres. Dans ce contexte, notre laboratoire a récemment démontré que chez la souris, une supplémentation en oméga-3 permettait d'augmenter la résistance des animaux face au développement de comportements de type anxieux et dépressifs qui sont induits par un protocole de stress chronique de défaite sociale.

Le protocole de défaite sociale est reconnu pour induire des comportements de type anxieux et dépressifs chez le rongeur et il bénéficie d'une bonne validité éthologique. Ce protocole permet de différencier les animaux en deux sous-populations, car 30 à 50 % d'entre eux sont résilients et ne développent pas de troubles du comportement. Le protocole de stress chronique de défaite sociale permet donc d'étudier dans de bonnes conditions les mécanismes neurobiologiques de la résilience et de la susceptibilité aux troubles anxieux et dépressifs. De plus, après 10 jours consécutifs de protocole, les phénotypes anxieux persistent dans le temps, jusqu'à 8 semaines après la fin du protocole de stress. Toutefois, ce protocole ne peut être remplacé par des études in vitro ou ex vivo, en raison des composantes cognitives requises pour un parallélisme à minima des pathologies humaines (dépression et/ou anxiété). Une attention particulière sera portée aux animaux subissant la défaite sociale pour que leurs conditions de vie soient les meilleurs possibles en dehors du développement de troubles anxieux et dépressifs. En minimisant le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir des résultats concluants et atteindre une signification statistique, tout en respectant la règle des 3R (remplacement, réduction et raffinement), nous estimons que 12 animaux par groupe expérimental seront nécessaires pour obtenir des puissances statistiques suffisantes.

L'objectif de notre projet est désormais d'aller plus loin dans la compréhension des mécanismes neurobiologiques par lesquels les oméga-3 contenus dans l'alimentation permettent de protéger les animaux. L'objectif à long terme de ce projet est de transférer les connaissances acquises chez le rongeur à l'homme pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques et nutritionnelles. Ces données pré-cliniques nous permettront de comprendre un peu plus en quoi la nutrition influence les fonctions cognitives et la physiologie de la transmission synaptique. De plus, des applications thérapeutiques peuvent être envisagées, en particulier pour déterminer si une thérapie nutritionnelle peut atténuer les pathologies liées au stress chronique, comme par exemple les troubles de stress post-traumatiques. De façon similaire, des stratégies préventives, liées à une nutrition adaptée et équilibrée en lipides, pourraient être envisagées afin de limiter, réduire ou même d'endiguer l'apparition de troubles dépressifs et/ou anxieux.

Dans ce projet, nous souhaiterions identifier les mécanismes neurobiologiques par lesquels les oméga-3 ont un rôle protecteur dans le développement de la dépression. Plus globalement, nous étudions les relations entre nutrition et fonctions cérébrales. Ce projet, qui se découlera sur quatre ans, implique la mise en œuvre du protocole de stress chronique de défaite sociale chez des souris mâles adultes C57Bl6/j par des souris Swiss CD1 mâles (anciens reproducteurs). Nous utiliserons pour cela un total de 1728 animaux, dont 1368 sont des souris C57Bl6/j et 360 sont des souris Swiss CD1. Le protocole de défaite sociale consiste à placer une souris dite "agresseur" en présence d'une souris de plus petit gabarit et pendant 5 minutes. Les souris sont ensuite séparées

par une paroi de plexiglass afin de maintenir un contact visuel et olfactif entre les deux souris, pendant 2 heures. L'agression de 5 minutes suivie du contact sensoriel de 2 heures sont répétés pendant 10 jours consécutifs, ce qui constitue le protocole de défaite sociale. Ce projet consistera d'abord à mettre les souris sous différents régimes alimentaires, pendant 8 semaines, puis la mise en place du protocole de défaite sociale. Ensuite, des tests de comportement seront réalisés, suivis d'une séance d'imagerie (IRM). Enfin, les souris seront euthanasiées afin de réaliser des prélèvements de tissus ainsi que des enregistrements d'activités électriques dans le cerveau.

Respect des 3 R:

1/ Remplacer. Les expériences ne peuvent pas être effectuées sur des cultures cellulaires ou dans des modèles computationnels ou encore chez l'homme, car aucune de ces approches ne permet de réaliser toutes ces expériences chez un même sujet. Le recours à des modèles animaux pertinents et adaptés à l'étude des troubles de l'humeur reste une nécessité expérimentale majeure.

2/ Réduire. Pour respecter la règle de réduction du nombre d'animaux utilisés, les souris Swiss CD1 agresseurs seront employées durant deux sessions consécutives de défaites sociales et seront proposées aux autres chercheurs en fin de protocole, puisqu'elles n'auront pas reçu de traitements particuliers. Statistiquement, des études menées précédemment dans notre laboratoire montrent que pour avoir une puissance statistique suffisante, 12 souris C57Bl6/j sont nécessaire par groupe. Ceci conduit à 1368 souris C57Bl6/j (voir plus haut).

3/ Raffiner. Les souris C57Bl6/j seront hébergées par paires, conformément à la réglementation en vigueur. La souffrance et la douleur seront étroitement surveillées. Si une souris s'avère blessée, elle sera soignée (désinfection et analgésique) et surveillée par la suite. En dehors du protocole de défaite sociale, toutes les souris ont accès à de l'enrichissement (maison pour s'abriter, carton (sizzle) pour nicher, barre à ronger). Enfin, la litière est changée une fois par semaine.

17694 Le virus de la bursite infectieuse aviaire (IBDV) est le principal virus immunodépresseur chez le poulet (*Gallus gallus*). Il détruit les lymphocytes B (cellules du système immunitaire, responsables de certaines réactions de défense de l'organisme contre les substances qu'il considère comme étrangères) de la bourse de Fabricius (BdF, organe producteur des lymphocytes B chez les oiseaux) qui en temps normal produisent les anticorps protégeant les animaux des infections microbiennes. Les signes cliniques de la maladie, appelée également maladie de Gumboro, sont, durant la phase précoce, anorexie, plumes ébouriffées, dépression et, diarrhée, suivies d'une prostration de l'animal. La mortalité varie de 0 à 60% suivant la virulence de la souche. Durant la phase chronique de la maladie, les sujets survivants, du fait de la destruction de leurs lymphocytes B par le virus, sont immunodéprimés et développent des infections secondaires, aux manifestations cliniques variables.

L'objectif du projet est de produire un stock de souches d'IBDV et de sérums immuns nécessaires aux travaux du laboratoire sur cette maladie. La seule méthode possible pour constituer des stocks suffisamment riches en matériel viral à partir de ces souches et les étudier plus avant est la propagation in vivo par infection de poulets ou de dindonneaux exempts d'organismes pathogènes spécifiques. Ce protocole standardisé est réalisé en conditions confinées et met en oeuvre des stratégies de raffinement (présence de jeux et d'aire de grattage). Il prévoit une mise à mort des animaux avec récolte des BdF où est concentré le virus, dès le déclenchement des signes cliniques, entre 3-4 jours post-infection (jpi). Un point-limite basé sur l'intensité des signes cliniques de la maladie est défini et, au-delà de ce point limite, une mise à mort compassionnelle sera pratiquée. Les effectifs des animaux sont limités au minimum permettant de produire le volume de stock viral nécessaire aux besoins du laboratoire, ce qui correspond à un nombre maximal de 850 poulets et 200 dindonneaux pour une durée de 5 ans. Dans certains cas, les poulets les moins affectés cliniquement peuvent être maintenus jusqu'à 49 jpi, avec jusqu'à deux rappels d'inoculation à 21 jpi et 35 jpi, afin de collecter un sérum post-infectieux.

17695 La bonne pratique d'expérimentation nécessite une bonne connaissance de la biologie des espèces utilisées et aussi la connaissance théorique et pratique des méthodes d'exploration sur le modèle

animal. Ce projet porte sur la formation technique et la formation continue du personnel amené à utiliser les animaux dans les procédures expérimentales, sur l'apprentissage de nouvelles techniques et à la mise à niveau des techniciens déjà formés.

Chaque technicien doit maîtriser les techniques faiblement invasives telles que les techniques d'administration des produits, chez le rat et la souris.

Nous utiliserons un nombre total de 750 souris et 350 rats sur une période de 5 ans.

La formation de chaque technicien sera encadrée par le personnel formé ayant les compétences reconnues

Ce projet répond aux exigences des 3R :

-Réduire : Le nombre d'animaux a été optimisé afin de permettre aux expérimentateurs de s'entraîner suffisamment afin de pouvoir acquérir les techniques rapidement.

-Raffiner : Les modèles sélectionnés pour ces formations sont les souris et les rats qui sont les deux espèces hébergées au sein de notre animalerie. Les animaux seront hébergés en groupe et auront les enrichissements nécessaires à leur bien-être. Des points limites ont été définis pour chaque procédure afin de s'assurer du bien-être des animaux. Ces administrations se feront dans le calme de façon à diminuer au maximum tout stress. Elles se feront dans une salle séparée des hébergements afin d'éviter tout bruits. Si nécessaire, des analgésiques pourront être utilisés afin d'éviter toute souffrance et inconfort aux animaux.

-Remplacer : La formation pratique sur animaux vivants est indispensable pour l'apprentissage des techniques d'administration. Il n'est donc pas possible de remplacer le modèle.

17696 L'objectif de ce projet est de tester l'effet d'une carence en vitamine D chez la souris femelle sur le métabolisme de sa descendance. Nous étudierons l'impact de cette carence sur la descendance à différents niveaux tels que la masse corporelle, l'adiposité, l'expression génique du tissu adipeux et l'empreinte épigénétique du tissu adipeux.

Les souris femelles C57Bl6j seront nourries pendant 6 semaines avec un régime déficient en vitamine D avant d'être accouplées avec des souris mâles. Ce projet nécessitera l'utilisation de 3 cohortes de 48 animaux, repartis en 3 groupes (femelles alimentation standard, femelles carencées et mâles alimentation standard). Les paramètres tels que l'évolution de la masse corporelle, de la prise alimentaire, l'adiposité, l'expression génique du tissu adipeux et l'empreinte épigénétique du tissu adipeux seront étudiés sur la descendance, soumise à une alimentation standard, à différentes étapes de la vie (juste après la naissance, à la fin de la période de sevrage et à 8 semaines). Des groupes de 10 animaux de chaque sexe sont nécessaires afin de pouvoir mettre en évidence des différences statistiquement significatives sur les différents paramètres étudiés. Au total ce protocole nécessitera 204 animaux. Les animaux seront hébergés en cage conventionnelle par groupe de 3 ou 4 individus et l'environnement sera enrichi par ajout d'igloo et de nid végétal.

Les données obtenues dans le cadre de ce projet permettront de connaître l'impact de déficiences en vitamine D sur la descendance. Cela servira de base pour émettre des recommandations nutritionnelles aux femmes en âge de procréer.

Cette étude prend en compte la règle des 3 Rs :

Remplacement : il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode de substitution in vitro pour étudier l'impact de la nutrition périnatale. La souris est un modèle de choix car elle présente des mécanismes physiologiques proches de ceux qui sont observables chez l'homme.

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

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

17697 Dans ce projet, nous étudions les mécanismes spinaux et supra-spinaux de la douleur. Une fois détectée par le système nerveux périphérique, l'information douloureuse est transmise au cerveau via la corne dorsale de la moelle épinière. A ce niveau il existe des processus d'intégration et de

sensibilisation qui jouent un rôle important dans le développement des douleurs chroniques. La corne dorsale de la moelle épinière constitue donc un point clé du neuraxe de la douleur où l'information douloureuse en provenance de la périphérie entre dans le système nerveux central. Il s'agit d'un réseau neuronal extrêmement complexe organisé en laminae et dont le fonctionnement reste encore mal compris. De plus, l'activité de ce réseau est sous contrôle de centres supra-spinaux constituant les "contrôles descendants" de la douleur en provenance du cerveau (amygdale, PAG, RVM). Les connexions entre ces "contrôles descendants" et le réseau neuronal de la corne dorsale de la moelle épinière sont au cœur des processus de sensibilisation de la douleur, de l'apparition des douleurs chroniques et des co-morbidités anxiété-douleur. Nous avons d'ores et déjà démontré la présence de canaux ioniques particuliers dans les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière où ils participent à certains processus douloureux (articles en préparation). Cependant, leur(s) rôle(s) dans les mécanismes de sensibilisation spinale en relation avec le cerveau et les contrôles descendants de la douleur reste(nt) inconnu(s) à ce jour.

Ce projet de recherche propose donc d'étudier le(s) rôle(s) d'une famille de canaux ioniques dans les processus de sensibilisation spinale de la douleur en relation avec les centres supra-spinaux via les contrôles descendants de la douleur. Pour cela, nous utiliserons une approche d'électrophysiologie permettant l'enregistrement des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière sur des rongeurs (rat et souris) anesthésiés. Cette approche est utilisée en routine au laboratoire et nous avons déjà obtenu une autorisation de projet de 5 ans à ce sujet. Un nouveau projet va nous permettre de poursuivre et d'aller plus loin dans nos recherches sur les mécanismes de sensibilisation centrale de la douleur en étudiant, non seulement les processus spinaux, mais également les mécanismes supra-spinaux des contrôles descendants de la douleur.

Ce projet sera réalisé sur un total de 1360 animaux sur une durée de 5 ans (280 souris et 1180 rats) et il est conçu de façon à respecter au maximum la règle des 3 R :

Remplacement => Le choix des expériences a été fait de façon ciblée pour répondre à des hypothèses scientifiques dans des modèles animaux incontournables en accord avec des observations *in vitro*. A notre connaissance, il n'existe pas de méthode alternative permettant de répondre à notre problématique.

Réduction => Les différentes procédures du projet ont été conçues de façon à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés (nombre minimal pour avoir une pertinence scientifique avec une puissance statistique d'au moins 80% pour un risque alpha de 0.05), et éviter tout double emploi injustifié.

Raffinement => Les animaux évoluent dans des milieux enrichis où ils sont surveillés très régulièrement dès leur arrivée à l'animalerie jusqu'à la réalisation des procédures. Ces procédures tiennent compte du bien être animal puisque nous réalisons des expériences sous anesthésie générale et sans réveil, deux critères du concept de raffinement.

17698 Les directives communautaires révisées imposent aux fabricants de médicaments le contrôle de la production des nouveaux lots de médicaments et la démonstration du maintien de l'activité thérapeutique pendant la durée de stockage de ses produits, garantissant ainsi la continuité de la sécurité des médicaments. Ces contrôles devant permettre la libération de différents lots de produits. Dans ce cadre réglementaire, ce projet vise à caractériser l'activité thérapeutique immunostimulante de produits pharmaceutiques par la technique des plages d'hémolyse (PFC = Plaque Forming Cells) conformément au dossier d'AMM (Autorisations de Mise sur le Marché) validé par les autorités compétentes. Le principe du test consiste à exposer *in vivo* des souris BALB/c aux produits biologiques à tester (administration par voie orale), dont la propriété est de stimuler le système immunitaire. Cette stimulation permet de produire des lymphocytes B qui sont des cellules de la famille des leucocytes (globules blancs) très abondantes dans le sang et les tissus lymphoïdes (rate). Ces cellules sont responsables de la production des anticorps qui confèrent l'immunité humorale. Dans un second temps on mesure chez ces souris la réponse anticorps produite par les lymphocytes B de la rate vis à vis d'un corps étranger à l'organisme appelé antigène. Dans notre étude l'antigène correspond à des globules rouges de mouton (GRM) et la réponse est enregistrée après avoir immunisé (inoculé) les souris avec ces globules rouges de

mouton. Le caractère immunostimulant du produit biologique testé sera évalué (après la mise à mort des animaux), *in vitro*, au laboratoire sur des suspensions de cellules spléniques (en provenance de la rate) des souris traitées et non traitées (témoins) grâce à des tests PFC. Cette technique repose sur les propriétés lytiques du système du complément après reconnaissance d'un complexe antigène-anticorps où l'antigène est constitué par les globules rouges de mouton. Chaque test (essai) PFC nécessite l'utilisation de 120 souris. Nous réalisons 30 tests par an. Pour cela un total maximal de 3600 souris sera utilisé. Pour se conformer à la règle des 3R, notamment à la nécessité de réduction d'animaux utilisés à des fins scientifiques, 4 lots de chaque produit pharmaceutique sont évalués simultanément, ainsi les résultats sont comparés à un seul groupe témoin (positif) unique. Dans le même objectif les groupes des témoins négatifs (témoins absolus) ne recevant aucun traitement ont été écartés, la réaction de ces témoins étant quasiment nulle. Au cours de la réalisation de ce projet, le bien-être de l'animal est bien pris en compte durant toute la durée de l'expérimentation. Les souris sont maintenues en groupe sociale de huit individus dans des cages répondant aux normes en vigueur et peuvent bénéficier d'enrichissement spécifique. Tous nos animaux sont observés quotidiennement et les signes anormaux sont notés et corrigés dans les meilleurs délais.

Les produits biologiques testés dans ce projet sont des médicaments dont les effets thérapeutiques sont approuvés notamment dans les infections, respiratoires ou urinaires. Ces produits ont aussi la particularité d'être utilisés comme stimulants du système immunitaire pour augmenter les défenses naturelles chez l'individu. En conséquence, et pour atteindre l'objectif du projet, à savoir une stimulation du système immunitaire très complexe chez les êtres vivants, il est nécessaire d'inoculer ces médicaments aux animaux vivants pour avoir un effet sur la réponse immunitaire, avant de procéder aux tests au laboratoire sur les cellules lymphoïdes stimulées provenant de la rate de ces souris.

Une méthode alternative sur cellule est en cours de développement, néanmoins les résultats ne sont pas suffisamment probants pour remplacer le modèle animal et la technique d'analyse des plaques de lyse reste la seule validée dans les différentes AMM.

17699 L'hépatite auto-immune (HAI) est une pathologie dont l'étiologie reste méconnue, caractérisée par une attaque immunitaire conduisant à des niveaux élevés de transaminases ASAT/ALAT et d'immunoglobulines G, une séropositivité pour des auto-antigènes et une hépatite d'interface. Les patients répondent pour la plupart bien aux traitements immunosuppresseurs non spécifiques (corticoïdes, azathioprine). Toutefois, ces traitements à long terme ne sont pas sans effet délétère. De plus, 40% des patients rechutent dans les 3 ans qui suivent le traitement, et la maladie évolue vers une insuffisance hépatique terminale nécessitant la transplantation dans 10% des cas.

Les lymphocytes T (LT) CD4+ sont classiquement considérés comme responsables des lésions hépatiques, mais les mécanismes moléculaires et cellulaires, notamment antigène-spécifiques, impliqués restent largement incompris, ou font l'objet d'actives controverses, comme c'est le cas pour l'implication d'un dysfonctionnement des LT régulateurs. Toutefois, des auto-antigènes (CYP2D6, FTCD), cibles dans cette pathologie, ont été découverts. Enfin, il a été montré que le mimétisme moléculaire, l'expression hépatique d'un antigène concomitante à celle d'un vecteur viral et l'inflammation semblent être les causes les plus probables du développement de l'HAI et que les LT CD4+ sont des cellules centrales dans l'initiation de la maladie.

Notre but est donc de mettre en place des modèles murins d'HAI permettant d'étudier particulièrement le rôle des LT CD4+ antigène-spécifiques dans le développement de la pathologie. Nous utiliserons pour cela deux modèles d'expression hépatique de l'antigène hémagglutinine (HA) : soit par nutrition au tamoxifène de souris TTR-Creind/ROSA-HAfloxé (issues du croisement d'une souche TTR-Creind et d'une souche Rosa-HAfloxé) permettant l'expression hépatique de HA ; soit par injection d'un adénovirus (Ad) codant pour la recombinaise Cre (Ad Cre) chez ces mêmes souris, permettant l'expression hépatique de HA dans un contexte inflammatoire. Ces modèles vont nous permettre d'étudier et de suivre les réponses HA-spécifiques (cellulaire et humorale) générées suite à l'expression hépatique d'un antigène. Cette expression hépatique pourra se faire en association ou non avec divers médiateurs afin d'induire de manière rapide une réaction auto-immune via

l'induction d'une inflammation hépatique non-spécifique (D-galactosamine/LPS) ou le blocage de la mise en place d'une tolérance hépatique (anticorps anti-PD-L1 in vivo). Enfin, le phénotype et la fonction des LT CD4+ HA-spécifiques seront particulièrement étudiés dans ces modèles, ainsi que dans des expériences de transfert adoptif.

Ce type d'étude nécessite une preuve d'efficacité in vivo dans des modèles précliniques, c'est pourquoi nous voulons mettre au point ces modèles pertinents de la pathologie chez la souris. Le nombre d'animaux utilisés sera de 547 souris pour combiner un nombre réduit d'animaux avec une pertinence statistique. Il est nécessaire d'utiliser des animaux pour atteindre les objectifs du projet car c'est une étude portant sur l'évaluation du rôle de cellules immunitaires antigène-spécifiques dans le développement d'une pathologie auto-immune visant le foie. Le suivi des animaux sera quotidien et la gestion de la douleur maîtrisée le plus adéquatement possible afin d'apporter les soins nécessaires le plus rapidement aux animaux. Pour limiter le stress et l'inconfort, les animaux sont maintenus dans des cages ventilées dans un cycle jour/nuit de 12h/12h avec un accès à l'eau et à la nourriture à volonté ainsi qu'un nombre maximum de 5 animaux/cage et des enrichissements (brindilles en papier, dômes) afin de parfaire les conditions de vie des animaux.

17700 La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative aussi fréquente que la sclérose en plaques. Elle est caractérisée par une mort sélective des motoneurones (cellules nerveuses qui contrôlent les muscles). Son issue est fatale en quelques années après le diagnostic, par paralysie progressive provoquant une insuffisance respiratoire. L'incidence et la prévalence de la SLA sont dans le monde respectivement de 2 et 8/100 000 personnes et concernent principalement les personnes de plus de 40 ans. La durée de vie moyenne après le diagnostic est d'environ 2 ans, ce qui fait de cette maladie l'un des troubles neurologiques les plus mortels associés au besoin médical non satisfait le plus élevé. En effet, malgré les efforts déployés pour comprendre la physiopathologie de la SLA et identifier de nouvelles cibles, il n'existe à ce jour aucun traitement efficace. La prise en charge des patients repose majoritairement sur des traitements améliorant leur qualité de vie et une thérapie pluridisciplinaire prodiguées par des professionnels de santé. La compréhension de la physiopathologie de la maladie est donc indispensable à la conception d'un traitement adapté à chaque forme de SLA.

Certains cas de SLA sont présents au sein d'une même famille, on parle de SLA familiale. Elle est due majoritairement à des mutations de quatre gènes connus : SOD1, TDP43, C9ORF72 et FUS. Les mutations FUS provoquent des SLA extrêmement sévères, avec un début des symptômes entre l'adolescence et la quarantaine, et une progression très rapide menant au décès en quelques mois suivant le diagnostic. Afin de reproduire la mutation FUS présente chez le patient, un modèle conditionnel de souris SLA présentant une mutation FUS a été généré. Ces souris développent un phénotype moteur associé à une perte progressive des motoneurones. Nous avons démontré dans notre laboratoire qu'une manipulation génétique était capable de reverser le phénotype moteur et d'améliorer la survie des souris Fus-SLA. Par conséquent, dans ce projet nous proposons de transposer ces résultats pour mettre au point une thérapie génique de la SLA-FUS.

Dans ce projet, nous utiliserons au maximum 432 souris sur 5 ans.

Conformément à la règle des 3 R :

-Afin de Réduire le nombre d'animaux dans ce projet, les animaux destinés aux analyses biochimiques ou biologie moléculaires seront au préalable inclus dans les études comportementales. Le nombre de souris incluses dans ce projet tient compte des tests statistiques utilisés lors de l'analyse des résultats ainsi que de la variabilité interindividuelle de ces modèles génétiques.

- La SLA est une maladie d'origine multifactorielle et multicellulaire. Les cultures cellulaires ne permettent pas de modéliser l'aspect intégré de cette pathologie. Nous avons donc besoin de recourir à des modèles animaux qui présentent, en outre, une organisation du système nerveux proche de celle de l'homme pour réaliser ce projet de recherche. Nous avons Remplacé, dès que possible, le modèle animal par un modèle cellulaire. Cependant, pour la compréhension du mécanisme complexe que nous étudions, le modèle animal reste indispensable. La plupart de nos

expériences ne peuvent être remplacées par des manipulations de culture cellulaire du fait de la complexité de la maladie.

- Les animaux auront accès ad libitum à l'eau et à la nourriture, bénéficieront de conditions d'hébergement conformes à la réglementation en vigueur. Nous avons amélioré leur bien-être (Raffinement) en procédant à un enrichissement de leur milieu de vie (bâtonnets à ronger, coton compressé pour faire des nids, maisons en plastique rouge), le maintien des interactions sociales et la surveillance quotidienne des animaux permettront de s'assurer de leurs bien-être et de détecter rapidement tout changement de comportement associé ou non à la pathologie étudiée afin qu'il puisse être pris en charge. Des points limites permettant de soustraire l'animal à la souffrance ont été établis. De plus, nous appliquerons également le principe de raffinement au niveau des méthodes de pré-anesthésie, d'anesthésie et de prise en charge analgésique. Enfin, nous avons réduit le stress procuré à l'animal en limitant le bruit dans l'animalerie et en les manipulant avec calme et soin.

17701 La rigidité myocardique est un paramètre clé de la fonction cardiaque. Cette propriété biomécanique est souvent une des premières à être altérée dans le cas de pathologies cardiaques telles que les cardiomyopathies ou l'insuffisance cardiaque. Mais à ce jour il n'existe aucun outil clinique pour quantifier la rigidité myocardique et détecter de manière précoce son augmentation. L'élastographie ultrasonore du myocarde est une modalité d'imagerie développée récemment avec un premier prototype d'échocardiographe dénommé cardioscope qui devrait permettre de quantifier la rigidité myocardique. Il a été conçu par notre équipe pour une utilisation sur des patients dans le cadre de protocole de recherche sur l'homme. Cet appareil repose sur une nouvelle technologie ultrasonore, l'échographie ultrarapide qui permet de réaliser des images échographiques à une cadence de 5000 images par seconde. Cette technologie a été validée sur des gels in vitro, des échantillons de tissus ex vivo et a été récemment mise en œuvre sur des patients atteints de cardiomyopathie hypertrophique et des volontaires sains démontrant ainsi l'intérêt clinique de cette approche. Cependant, un certain nombre de questions importantes restent à éclaircir, notamment le lien entre la rigidité myocardique et les paramètres physiologiques de la fonction cardiaque.

L'objectif de ce projet est de démontrer que l'élastographie du myocarde permet d'accéder à des paramètres de fonction cardiaque qui ne sont pas mesurables par d'autres techniques non-invasives. Le recours à l'animal est donc justifié par la nécessité d'appliquer cette technique sur cœur battant dans des conditions physiologiques contrôlées et de corrélérer les mesures ultrasonores avec des mesures invasives (courbes pression-volume). Le projet prévoit d'utiliser au maximum 14 porcs. La fréquence cardiaque, la taille du cœur, l'anatomie coronaire, l'innervation, la circulation collatérale native du porc sont très proches de celle de l'Homme. Ce projet a été conçu en suivant la règle des 3R : la technique a d'abord été validée sur des tissus artificiels (gels) et des tissus biologiques in vitro, le nombre d'animaux a été réduit au minimum possible pour pouvoir établir une validation claire de la technique, et enfin le principe de raffinement a été respecté par la prise en charge de la douleur des animaux. L'anesthésie et l'analgésie sont adaptées afin de n'induire aucune souffrance, et des vétérinaires contrôlent régulièrement l'état de santé des animaux. Ils seront hébergés selon les normes en cours (enclos >2m² avec sciure et jouet), et nous veillerons à la bonne qualité des soins et à leur bien-être pendant toute l'expérimentation. A terme, cette technique d'imagerie et ces résultats expérimentaux permettront de mieux diagnostiquer les patients atteints de pathologies cardiaques telles que l'insuffisance cardiaque diastolique, ce qui reste aujourd'hui très difficile à réaliser par les techniques d'imagerie existantes.

17702 *Streptococcus suis* (S. suis) est une bactérie dite zoonotique, ou transmissible à l'Homme, répandue dans les élevages porcins. Elle est responsable de graves affections (méningite, septicémie et polysérites) pouvant entraîner des pertes économiques importantes (réduction des performances zootechniques des animaux affectés, détérioration de la qualité des carcasses, élévation du taux de pertes et de saisies à l'abattoir, etc.). S. suis est généralement enveloppé d'une capsule recouverte d'antigènes. En fonction de la nature de ces antigènes, 29 sérotypes ont été décrits au sein de l'espèce S. suis. Le sérotype le plus souvent impliqué dans les infections à S. suis en France

est le sérotype 2. Cependant, une émergence du sérotype 9 a été observée ces deux dernières années. Au sein d'un même sérotype, il a également été mis en évidence des niveaux de virulence variables en fonction des souches impliquées.

Le contrôle de l'infection des animaux par cette bactérie est généralement difficile et la prévention aléatoire. En élevage, l'antibiothérapie constitue un des éléments de l'arsenal thérapeutique. Cependant, son utilisation doit être limitée en raison de résistances développées par les bactéries vis-à-vis de certains antibiotiques. De plus, les porcs ayant survécu à l'infection et séjournant dans l'élevage, continuent à héberger la bactérie au niveau des voies respiratoires supérieures et des amygdales (portage amygdalien). Les porcs cliniquement sains et porteurs de *S. suis* représentent un danger pour leurs congénères qui sont généralement contaminés par contact direct. La contamination des porcelets peut également avoir lieu dès la naissance par transmission de la bactérie de la truie à ses porcelets.

Une des méthodes alternatives pour lutter contre *S. suis* repose sur la vaccination et tout particulièrement sur l'utilisation d'autovaccins. Ces derniers sont préparés à partir de germes pathogènes isolés d'un sujet malade d'un élevage et sont administrés aux animaux de ce même élevage. Les autovaccins sont utilisés pour prévenir les infections à *S. suis* chez les truies ou les porcelets. A ce jour, aucune étude a été conduite pour évaluer l'impact de ces autovaccins sur le portage amygdalien des animaux et peu de données d'appréciation de leur efficacité sont disponibles.

Ce projet est dans le prolongement d'une précédente saisine soumise au Comité d'éthique et qui n'a pu être menée à son terme par manque de temps. Par ailleurs, nos premières investigations rattachées à cette saisine montre un effet significatif de la quantité de *S. suis* inoculée sur la réponse des animaux. Par conséquent, l'objet de cette présente saisine est d'évaluer, d'une part, la dose minimale infectante, de la souche de sérotype 9 utilisée, chez des porcelets et, d'autre part, d'apprécier l'efficacité d'un autovaccin administré à des truies en gestation sur leurs descendances.

Le projet fait donc l'objet de deux procédures expérimentales. Dans la première procédure, il s'agira d'estimer la quantité minimale de la souche de *S. suis* nécessaire pour induire une réponse chez des porcelets. Quatre titres bactériens seront testés. La seconde procédure sera menée sur deux groupes de truies. Le premier groupe sera composé de truies non infectées et vaccinées et le second groupe de truies infectées et vaccinées. Dans ce dernier groupe, les truies seront inoculées trois semaines avant leur mise à la reproduction. Puis dans les deux groupes, un autovaccin sera administré aux truies à 6 semaines et trois semaines avant la mise bas. Dans chacun des groupes, deux semaines après le sevrage, des porcelets seront inoculés à la dose minimale infectante définie à l'issue de la procédure 1, des porcelets seront placés en contact direct avec les animaux inoculés et des porcelets constitueront le groupe témoin. Les animaux seront observés quotidiennement afin de détecter le plus précocement possible des signes nerveux, d'hypothermie ou d'hyperthermie, des pertes d'appétit ou de poids, etc. . Des prises de sang et des prélèvements au niveau des amygdales seront également réalisés.

Au total, 8 truies et 51 porcelets exempts d'organismes pathogènes spécifiés feront l'objet de ces procédures.

L'infection expérimentale avec *S. suis* est généralement symptomatique chez les porcelets de 6 semaines. Cependant la sévérité clinique peut être limitée lorsque la dose d'inoculation est ajustée à la dose minimale infectante. Dans les cas où l'infection conduirait à une altération importante de l'état de santé, les animaux concernés seront traités par administration d'anti-inflammatoire et d'antibiotique. Le cas échéant, ils seront mis à mort si leur état le nécessite. Ce protocole expérimental est pensé de façon à minimiser le nombre de porcs utilisés tout en menant une étude suffisamment robuste pour avoir des résultats statistiquement significatifs. A l'issue de nos études préliminaires, il est apparu indispensable d'avoir au minimum trois porcelets par truie et des groupes de 6 porcelets pour considérer la variabilité inter-individuelle des animaux et pour avoir une pression d'infection suffisante pour reproduire une colonisation des amygdales et/ou la maladie. Les porcelets seront élevés en groupes stables, disposeront d'objets manipulables et de lampes chauffantes ainsi que de plaques de couchage. Ils auront accès à de l'eau et à l'alimentation à volonté. Il n'existe pas d'alternative à cette étude expérimentale sur l'animal dans la mesure où nous

cherchons à évaluer l'état de santé général de l'animal cible qu'est le porc ainsi que ses réponses immunologiques.

17703 Dans le traitement de nombreux cancers, le traitement consiste en des injections intraveineuses de molécules agissant sur des mécanismes impliqués directement dans la prolifération des cellules. A l'heure actuelle, ces traitements se révèlent efficaces pour limiter la croissance des tumeurs. Cela se fait malheureusement au prix de lourds effets secondaires, à la fois à cause des traitements qui agissent sur les cellules saines et cancéreuses, mais surtout à cause de la voie d'administration intraveineuse qui conduit à une distribution de la molécule active dans tout l'organisme.

Durant ces quinze dernières années, de plus en plus de travaux rapportent l'efficacité de la délivrance d'anticancéreux directement dans l'abdomen, pour le traitement d'une catégorie de cancer localisée au niveau de la face interne de l'abdomen. Il peut s'agir à la fois de métastases issues de cancer colorectal, gastrique ou des ovaires, mais également de cancers qui se sont développés directement au niveau du péritoine. Pour ces cancers, l'administration des traitements directement dans l'abdomen permet de maximiser l'efficacité en réduisant les effets secondaires.

Cependant, les dispositifs utilisés aujourd'hui pour ce type de traitement consistent en des cathéters mis en place par chirurgie au niveau de l'abdomen du patient. Les études réalisées avec ces systèmes mettent en évidence des problèmes d'infection et de bouchage des cathéters lié au site d'implantation au contact des organes.

Afin de répondre à ces problématiques, nous avons conçu un dispositif de délivrance totalement implantable afin de limiter les risques d'infection. Il est basé sur des membranes poreuses permettant une délivrance plus diffuse du traitement et est implanté à distance des organes afin d'éviter le bouchage du système. Ce dispositif a déjà été validé en pré-clinique pour la délivrance physiologique d'insuline et fera l'objet d'une étude clinique chez des patients diabétiques de type 1 en fin d'année 2020. La solution testée dans cette saisine nécessite la mise en place d'un dispositif plus gros qu'un cathéter, et pourrait limiter le volume de solution injectable. Cependant le recours à un dispositif totalement implantable, basé sur des membranes, et qui n'est pas en contact direct avec les organes devrait diminuer les infections et prévenir les phénomènes d'obstruction. La balance bénéfique risque devrait donc être favorable. L'objectif de cette étude est d'évaluer la capacité de notre dispositif à assurer une délivrance d'anticancéreux comparable à une injection directe dans l'abdomen.

Pour cela le dispositif sera implanté sous anesthésie au site extrapéritonéal (situé entre le péritoine et les muscles abdominaux). Trois agents anticancéreux différents ayant prouvé leur efficacité en clinique sur ce type de cancer seront étudiés séparément. Leur compatibilité avec notre dispositif a été validée in vitro et la biointégration du dispositif a été validée in vivo chez le rat et le porc.

Suite à l'injection des molécules, ces dernières seront dosées dans le sang, dans l'abdomen et dans différents organes et tissus, prélevés après mise à mort de l'animal (foie, intestins, cœur et tissus au contact direct du dispositif). Afin de servir de contrôle, un groupe d'animaux recevra une injection de la même molécule, à la même concentration en intrapéritonéal et un autre en intraveineuse, puis les mêmes prélèvements seront réalisés. Pour chacune des 3 molécules, 12 rats seront utilisés pour chacune des quatre modalités d'administration pour un total de 4 temps après injection. Cette étude nécessitera donc l'utilisation de 192 rats par molécule testée et 576 rats au total pour tester les 3 molécules.

Remplacement : la distribution de molécules thérapeutiques selon leur modalité d'administration met en jeu l'ensemble de la circulation sanguine, différents tissus et organes, elle ne peut donc être modélisée in vitro.

Réduction : le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum tout en permettant, grâce à des tests statistiques adaptés, de mettre en évidence des différences significatives au niveau des paramètres étudiés.

Raffinement : L'étude est intégralement réalisée sous anesthésie générale, réalisée au gaz pour un meilleur contrôle. En complément de l'anesthésie générale, un antidouleur est également administré. Le raffinement intervient également un niveau de l'hébergement avec un enrichissement

des cages à l'aide de cylindres en PVC rouge, qui servent de refuge aux animaux et permet ainsi de diminuer leur stress.

17704 Les retardateurs de flamme organophosphorés (RF) sont ajoutés aux matériaux inflammables (ex : polymères) pour améliorer leur comportement au feu. Ils sont utilisés de façon massive dans de nombreux secteurs (électriques et électroniques, du bâtiment, du transport, des textiles, des meubles, etc). Les RF et/ou leurs produits de dégradation sont omniprésents dans les environnements domestiques (ex : poussières des maisons) et plusieurs études de biosurveillance de populations générales incluant des femmes enceintes et des enfants, montre que l'exposition à ces polluants est très répandue.

Il existe des incertitudes concernant l'impact possible des RF sur la santé. Certains RF sont toxiques pour la reproduction et le développement prénatal dans des études chez le rongeur, et ils peuvent modifier le taux des hormones sexuelles mâles (ex: testostérone). Toutefois, la disponibilité des données de toxicité varie beaucoup d'une substance à l'autre. Pour de nombreux RF, il manque des informations concernant leurs effets sur l'appareil reproducteur et le système endocrinien des descendants mâles lors d'expositions maternelles pendant la grossesse, alors que la période fœtale est considérée comme une période de vulnérabilité accrue. La production de testostérone pendant cette période est absolument nécessaire au développement normal de la sphère génitale. L'objectif de ce projet est d'évaluer les effets de deux RF sur le développement du testicule et sa capacité à sécréter de la testostérone, chez le fœtus de rat, après des expositions in utero. Les données toxicologiques générées contribueront à mieux identifier les dangers potentiels liés à l'exposition des femmes enceintes à ces RF.

Nous utiliserons un modèle expérimental qui a déjà été appliqué chez le rat pour évaluer la toxicité d'autres substances, et pour lequel nous avons accumulé des données historiques. Le rat est l'espèce privilégiée pour les études de toxicité prénatale.

La procédure expérimentale mise en œuvre est l'administration par gavage. Une solution de la substance à tester sera administrée aux rates gestantes quotidiennement par voie orale, plusieurs jours consécutifs pendant la gestation. A la fin du traitement, les animaux seront mis à mort. Les tissus d'intérêt maternels et fœtaux seront prélevés post mortem et seront soumis à diverses analyses (hormonales, histopathologiques et moléculaires). Les femelles gestantes seront obtenues au cours d'accouplements datés réalisés au laboratoire.

Au total, le nombre maximum d'animaux requis pour ce projet de 3 ans est de 358 rats adultes : 64 rats mâles reproducteurs, 294 rates pour obtenir 240 rates accouplées porteuses chacune de 15 fœtus. Il tient compte des animaux reproducteurs nécessaires pour obtenir l'effectif expérimental inclus dans le projet.

Ce projet intègre la règle des 3 R:

Remplacement: L'utilisation d'animaux est indispensable car il n'existe pas de modèle alternatif (ex : in vitro) reproduisant les interactions complexes entre la mère, le placenta et le fœtus, ou couvrant l'ensemble des étapes du développement fœtal.

Réduction: Nous nous baserons sur l'expertise acquise depuis plusieurs années pour limiter au strict minimum le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir des résultats solides statistiquement exploitables et garantir la validité des conclusions qui seront tirées. Dans la mesure du possible, le maximum d'informations sera obtenu à partir du même animal (mère et fœtus).

Raffinement: la durée du traitement sera limitée à la période du développement du testicule fœtal (entre GD12 et la mise à mort des animaux), l'hébergement sera adapté aux femelles gestantes, et elles feront l'objet d'un suivi quotidien pour vérifier leur état de santé et s'assurer de leur bien-être. En cas d'atteinte de l'un des points limites préalablement établis (l'arrêt de la prise de nourriture, une perte de poids de plus de 20 % durant plus de 3 jours par rapport au poids des témoins, des signes cliniques traduisant une souffrance, une détresse, ou une détérioration de l'état général de l'animal), l'arrêt du traitement voire la mise à mort de l'animal seront appliqués pour limiter au maximum la souffrance de l'animal.

17705 A l'heure actuelle le bien-être animal ne se résume plus seulement au maintien d'un logement et d'une alimentation adéquats, d'une bonne santé et à l'absence d'émotions négatives mais également à la présence d'états émotionnels positifs. L'expérience d'évènements plaisants et leur répétition, apparaît être un levier essentiel pour pouvoir induire un état de bien-être durable sur le long terme. Cependant, les émotions positives, de par leur subtilité, restent bien moins étudiées que les émotions négatives. Ces deux dernières décennies, un des grands défis dans ce domaine a été de pouvoir identifier des marqueurs comportementaux ou physiologiques non invasifs permettant d'inférer les émotions positives chez les animaux d'élevage. Ce manque de marqueurs pertinents est particulièrement prononcé chez les oiseaux. L'objectif du projet est d'explorer deux nouveaux marqueurs d'émotions non-invasifs chez la poule domestique : les expressions faciales et les concentrations en immunoglobulines A sécrétoires. A ce jour, il reste difficile de déterminer si la présence humaine répétée peut vraiment être perçue comme un facteur positif par les poules. Dans ce cadre, nous tâcherons de déterminer si l'utilisation conjointe des expressions faciales et de la production d'immunoglobulines A sécrétoires peut permettre d'évaluer l'impact de la relation Homme-animal sur le bien-être des poules. Pour se faire nous comparerons les expressions faciales (couleur de la peau, position des plumes) et les concentrations en immunoglobulines A sécrétoires d'un lot de poules préalablement habituées à l'Homme pendant 5 semaines (N=12) à un lot de poules non-habituées à l'Homme (N=12). Dans les deux lots, nous caractérisons les émotions transitoires par l'observation des expressions faciales (acquisition d'images) et le dosage des immunoglobulines A sécrétoires suite à des tests comportementaux de courtes durées. L'impact à long terme de la relation Homme-animal sur l'état de santé des animaux sera également évalué en début et en fin de traitement par un prélèvement sanguin et des prélèvements de fèces. L'étude porte sur 24 poules.

Remplacement : étudier l'expression émotionnelle des animaux repose sur l'observation du comportement de l'animal vivant.

Réduction : La taille des effectifs (n=24 avec 12 sujets par groupe expérimental) est optimisée pour garantir un nombre suffisant d'images et de prélèvements.

Raffinement : Les conditions d'élevage des animaux seront optimales avec un accès à un parcours en plein air, par groupe de 12 poules ainsi que d'une cabane équipée de perchoirs, de pondoirs et d'abris en libre accès. Les poules seront suivies quotidiennement par des grilles de bien-être afin de détecter précocement toute altération de leur état de santé ou de leur comportement. Les poules évolueront en liberté ce qui leur permettra de se soustraire à une éventuelle stimulation stressante si besoin. Tous les prélèvements sont réalisés avec douceur et calme par des personnes compétentes et entraînées. Les contentions seront de courte durée (1 à 2 minutes). Les animaux recevront une récompense alimentaire à la suite des prélèvements. Notre objectif est d'avoir, tout au long de l'étude, des interventions qui soient le moins contraignantes possibles pour les animaux.

17706 L'imagerie intravitale permet de réaliser le suivi spatiotemporel d'évènements biologiques à l'échelle de la cellule ou du tissu sur animal vivant. L'analyse d'un tissu au sein d'une chambre dorsale implantée chez la souris apporte des informations qualitatives et quantitatives sur les modifications vasculaires et structurales ainsi que sur les interactions cellulaires et moléculaires au cours du temps. C'est un outil technologique d'imagerie in vivo haute résolution qui a des applications potentielles dans de multiples domaines notamment en cancérologie. En effet, le tissu qui est placé dans la fenêtre de la chambre dorsale peut être observé (après anesthésie de l'animal) grâce à différents types de techniques microscopiques de pointe.

Nous avons mis en place un modèle, très bien toléré par l'animal, qui permet de suivre les processus biologiques (sains ou pathologiques) sur plusieurs semaines. Toutefois, les greffes tumorales en chambre dorsale sont actuellement réalisées sans prendre en compte le microenvironnement naturel de la tumeur. Ainsi, pour s'approcher au mieux de la réalité biologique, nous nous proposons de développer un modèle de greffe pseudo-orthotopique par lequel un fragment du tissu sain de la même origine tissulaire sera greffé simultanément aux cellules cancéreuses. Les interactions cellulaires/moléculaires entre tumeur et stroma permettront d'étudier les processus physiopathologiques à l'origine de la dissémination métastatique et la capacité d'invasion

des tumeurs. C'est par une meilleure compréhension de ces processus complexes que de nouveaux traitements pourront être proposés aux patients.

Cette étude se fera chez la souris immunodéficiente, de façon à ne pas rejeter les greffes de cellules humaines.

Les souris, suite à l'implantation d'une chambre dorsale, vont recevoir une injection intradermique de cellules tumorales humaines conjointement au stroma de l'organe dans lequel la tumeur s'est développée. La croissance tumorale et les modifications du microenvironnement seront suivies par micro et macroscopie pendant une durée limitée par la croissance tumorale c'est à dire jusqu'à ce que l'exploitation des images obtenues reste possible.

Les processus physiopathologiques du développement du cancer découlent d'interactions vasculaires, tissulaires, cellulaires et moléculaires entre la tumeur et son microenvironnement. Le modèle animal permet de prendre en compte leur complexité et leurs interactions. Afin de pouvoir interpréter les résultats de manière satisfaisante, le calcul du nombre d'animaux implantés a dû prendre en compte la variabilité interindividuelle de la pousse tumorale et la morbidité due à la chirurgie. Pour proposer ce modèle à la communauté scientifique, il est important d'étudier les types tumoraux les plus pertinents pour nos thématiques à savoir les cancer du sein, de la vessie, de la prostate et du colon. Le nombre d'animaux sains prélevés pour leur stroma a été évalué en prenant en compte le volume du tissu prélevé et la conception de l'étude a été faite de manière à minimiser le nombre d'animaux utilisés (nombre minimum nécessaire et suffisant). Il a été déterminé que 369 souris au maximum seraient nécessaires pour mener ce projet à bien.

La chirurgie sera pratiquée sous anesthésie générale (isoflurane), de la lidocaïne sera administrée localement par voie sous-cutanée avant l'incision de la peau et de la Tolfédine sera administrée par voie sous-cutanée à la fin de la chirurgie, avant le réveil. Compte-tenu des contraintes d'hébergement, de l'enrichissement sera ajouté dans la cage au moment du change. De la nourriture gélatinisée sera mise à disposition après la chirurgie afin de favoriser la récupération. Les animaux seront surveillés quotidiennement et pesés a minima une fois/semaine. Leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer qu'il n'y a aucun signe de stress. L'imagerie des animaux se fera sous anesthésie générale, 2 fois par semaine afin de visualiser les modifications anatomiques et vasculaires tout en respectant un temps de récupération suffisant entre 2 périodes d'acquisition d'images.

17707 La cicatrisation des plaies cutanées est un phénomène naturel de reconstruction de la barrière cutanée mais si les plaies sont mal soignées, cela peut aboutir à des complications. La cicatrisation cutanée fait intervenir différentes phases qui entraînent la disparition de la lésion et le remplacement des cellules atteintes par des cellules saines. On distingue 4 stades dans le processus de cicatrisation des plaies cutanées, faisant suite à une phase inflammatoire au cours de laquelle la lésion est recouverte par un caillot sanguin : (1) la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants permettant l'apport en nutriments et oxygène, indispensables aux cellules, (2) la phase de migration au cours de laquelle le caillot sanguin devient une croûte en raison de la prolifération des filaments de fibrine, c'est le début de l'élaboration de la cicatrice, et sous la croûte les vaisseaux vont proliférer, (3) la phase de prolifération, massive, de cellules, de vaisseaux sanguins et de fibres, et enfin (4) la phase de maturation, phase la plus longue qui peut se poursuivre pendant plus d'un an, avec au début la croûte qui tombe et la peau qui va retrouver ses différentes couches.

Il est donc très important de tester de nouvelles substances, de nouveaux pansements ou de nouveaux dispositifs médicaux sur des modèles de plaies simples et chroniques représentatifs chez l'animal qui pourront être utilisés par la suite chez l'Homme et ainsi permettre d'améliorer la cicatrisation de ces plaies. Parmi ces nouveaux produits, il y a des composés pouvant être appliqués directement sur les plaies cutanées et se présentant sous forme liquide, de crème, de pommade ou encore de gel, et également des produits pouvant être administrés par voie orale, générale (intrapéritonéale) ou sous-cutanée.

L'objectif de notre projet est d'évaluer les effets de 8 formulations, administrées par 2 voies différentes, voie générale (intrapéritonéale) ou voie cutanée (topique), sur le processus de cicatrisation sur le modèle de plaie cutanée induite par incision cutanée chez la souris Hairless Skh-1, car ce type d'étude ne peut être effectué sur des modèles in vitro (remplacement). Ces formulations contiennent des substances actives devant favoriser la cicatrisation et possédant également un effet analgésique permettant ainsi de supprimer la douleur éventuelle liée aux plaies cutanées induites.

Ce projet nécessite l'utilisation de 200 souris femelles Hairless Skh-1 âgées de 6-7 semaines, en 2 séries expérimentales de 100 souris chacune. Après une période de quarantaine et d'acclimatation de 7 jours, les plaies cutanées seront induites, sous anesthésie gazeuse, par incision cutanée sur les flancs gauche et droit de l'ensemble des animaux afin de réduire le nombre d'animaux utilisés mais permettant d'avoir un nombre suffisant de plaies pour mesurer les effets des formulations testées (réduction) (Procédure 1).

Chaque groupe expérimental sera ainsi composé au départ de 20 souris qui seront mises à mort à différents temps après l'induction des plaies cutanées et le début des traitements (J0) afin d'évaluer les effets des composés testés sur les étapes clés du processus de cicatrisation : 4 souris par groupe de traitement seront ainsi mises à mort à J1 = phase inflammatoire importante, 4 autres à J3 = fin de la phase inflammatoire et début de la phase de prolifération cellulaire, 4 autres à J6 = phase de prolifération cellulaire importante avec réépithélialisation, 4 autres à J10 = fin de la phase de prolifération cellulaire et de réépithélialisation, proche de la cicatrisation complète, et les 4 dernières à J20 = phase de remodelage.

Les formulations à tester seront soit injectées par voie générale (intrapéritonéale), soit par voie cutanée (topique) directement sur les plaies cutanées induites sous forme de gel, en comparaison avec un véhicule ou un gel neutre dépourvus des principes actifs. Les formulations seront injectées ou appliquées quotidiennement après induction des plaies cutanées pendant 1 à 20 jours en fonction des temps de mise à mort (Procédure 2).

Des paramètres seront mesurés et scorés quotidiennement au niveau des plaies cutanées induites de l'ensemble des souris pendant 1 à 20 jours : longueur, largeur et boursoufflement de la plaie, présence d'une croûte sur la plaie et visibilité de la plaie, ainsi que le temps nécessaire à la cicatrisation complète de chaque plaie cutanée induite pour les souris suivies pendant 20 jours (Procédure 3).

Pour chaque temps de mise à mort, J1, J3, J6, J10 et J20, un prélèvement sanguin sera effectué par ponction intracardiaque sur l'ensemble des souris placées sous anesthésie gazeuse, avant injection si nécessaire d'une surdose d'euthanasique pour induire la mort, et avant réalisation de prélèvements cutanés au large des zones d'induction des plaies cutanées, pour la réalisation d'analyses biologiques sanguines, histologiques et immunohistochimiques (Procédure 4).

Les souris seront placées à 2 par cage (18.9 x 29.6 x 12.8 cm) pour l'ensemble des groupes expérimentaux, en cycle de lumière inversé pour observer leur comportement suite aux traitements effectués pendant leur phase active et ainsi respecter leur horloge biologique (chronobiologie), et des morceaux de papier absorbant seront placés dans leur cage comme enrichissement pour assurer leur bien-être (Raffinement).

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

17708 Les formations spécifiques en expérimentation animale constituent une obligation réglementaire à laquelle doivent se soumettre tous les acteurs de la recherche in vivo afin d'acquérir les outils nécessaires à la mise en place d'une démarche éthique prenant en considération la sensibilité animale.

Ceci implique notamment, pour les personnes concevant ou réalisant des interventions chirurgicales dans le cadre des projets scientifiques, l'obligation réglementaire de suivre préalablement un enseignement théorique et pratique à la chirurgie expérimentale.

Ce projet concerne les travaux pratiques d'une formation à destination de ces personnes, aux bases de la chirurgie expérimentale avec utilisation d'animaux vivants, qui s'inscrit dans ce cadre réglementaire et éthique et qui a obtenu l'approbation du Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation.

Les travaux pratiques de cette formation, d'une durée totale de 8h, permettent aux personnels d'apprendre à mettre en oeuvre les gestes de base, encadrés par des formateurs expérimentés. Ils seront réalisés sur rats et souris, les espèces les plus utilisées en recherche.

La première, et majeure, partie des travaux pratiques se déroule sur substituts synthétiques inertes, pièces de boucherie et cadavres d'animaux (issus d'euthanasies indépendantes des besoins de la formation).

Ceci permet tout d'abord une réduction du nombre d'animaux utilisés à des fins pédagogiques, une réutilisation des animaux éliminés dans les animaleries, un remplacement de l'animal par des méthodes alternatives autant que possible, et s'inscrit donc parfaitement dans la culture éthique et la règle des 3R.

Au terme de cette première partie de travaux pratiques réalisés sans animaux vivants, un seul rongeur vivant par participant sera utilisé pour la réalisation d'une chirurgie complète. Ces animaux seront préférentiellement, dans un souci de réduction également, issus du stock d'animaux de réforme destinés à être éliminés.

A ce stade, le participant a acquis toutes les notions et gestes indispensables à la bonne mise en oeuvre et surveillance d'une anesthésie et analgésie adaptée, ainsi qu'à la réalisation d'une chirurgie aseptique et atraumatique.

La procédure chirurgicale réalisée est une ovariectomie.

Les animaux seront anesthésiés et ils recevront une injection sous-cutanée d'un analgésique afin de raffiner au mieux la technique et d'éviter toute douleur à l'animal.

Les stagiaires observeront les phases de l'anesthésie, s'assureront de l'état de profondeur de celle-ci puis réalise la chirurgie, pour laquelle il s'est d'abord entraîné sur cadavre, dans le respect des structures anatomiques.

Ils surveilleront ensuite le réveil de l'animal, puis les animaux seront mis à mort.

Le nombre de stagiaires par session de formation est estimé à 32. 4 sessions au maximum sont prévues par an, ce qui, sur une période de 5 ans, représente au maximum 680 rongeurs vivants.

17709 Les diarrhées associées à des infections bactériennes se caractérisent par une gastro-entérite, plus précisément une rectocolite aiguë. Elles se transmettent par voie féco-orale, principalement dans les pays en voie de développement ou chez les voyageurs. Chaque année, elles tuent plusieurs millions de personnes, essentiellement des enfants de moins de 5 ans. La shigellose ; causée par la bactérie *Shigella*, est responsable d'une vaste majorité de ces cas. Il n'existe à l'heure actuelle aucun vaccin commercialisé protégeant des infections par *Shigella*, mais de nombreuses approches sont en cours d'étude.

Aucun vaccin contre *Shigella* n'est commercialisé, notamment du fait de l'absence d'un modèle animal d'infection qui permettrait d'évaluer leur efficacité. La souris n'est pas sensible à l'infection par *Shigella*. A la différence de l'homme, la souris est capable de produire la vitamine C, ou ascorbate. Nous évaluerons dans ce projet l'impact de la carence en ascorbate sur la sévérité de l'infection par *Shigella*, en utilisant des souris Gulo-/-, qui ne synthétisent pas la vitamine C.

La virulence de *Shigella* a été étudiée depuis de nombreuses années dans divers modèles animaux (primate, lapin, souris, cobaye) qui, même imparfaits ont permis de mieux comprendre les mécanismes de la virulence de ce pathogène. Toutefois, aucun d'entre eux ne permet de récapituler l'infection du colon suite à l'ingestion de *Shigella*. Le modèle de souris carencées modérément en ascorbate permettra de suivre les étapes précoces et tardives des infections par *Shigella*.

L'objectif de ce projet est de caractériser et valider le modèle murin Gulo-/. Il s'agira ensuite d'expliquer pourquoi une carence en vitamine C peut induire une augmentation des symptômes de la shigellose, comme cela a pu être suggéré par des récits historiques (marins, militaires XVIIIème siècle), sans être précisément défini ou expliqué.

Dans ce projet, nous réaliserons des infections par *Shigella* chez la souris Gulo-/ carencée modérément en ascorbate. L'avantage d'utiliser des souris Gulo-/ est la possibilité de changer la concentration de vitamine C dans l'eau que les souris boivent et de voir l'impact que cette vitamine C. La carence modérée sera donc induite avec différentes concentrations de vitamine C dans l'eau que ces souris boivent. Les carences modérées en ascorbate induites n'entraînent pas de souffrance des animaux, qui ont des croissances similaires aux animaux contrôle.

Ce modèle pourra être utilisés pour évaluer l'efficacité de candidats vaccin actuellement en phase de développement.

L'infection des souris carencées modérément en ascorbate avec *Shigella* n'est pas létale, toutefois nous attendons des signes de diarrhée plus sévères et d'éventuelles pertes de poids, associés à la colonisation et à la destruction de la muqueuse intestinale par *Shigella*.

Les infections orales seront réalisées sur animaux vigiles, puis l'infection est étudiée sur plusieurs jours (évolution du poids des animaux). Nous analyserons les réponses inflammatoires et la destruction de la barrière épithéliale intestinale au niveau de l'ileum et du colon pour évaluer le caractère invasif et virulent des souches testées. Les dosages d'ascorbate plasmatiques seront également réalisés. La présence éventuelle de *Shigella* dans la circulation sanguine sera évaluée (septicémie).

Remplacement

Le recours à l'animal est nécessaire car les modèles cellulaires d'infection de *Shigella* ne rendent pas compte de la modulation des mécanismes de virulence de ces pathogènes dans le contexte inflammatoire.

Réduction

Au total, au cours des 5 prochaines années, 576 souris (mâle ou femelle) seront utilisées dans le cadre de ce projet. Le nombre d'animaux que nous estimons nécessaire repose sur notre connaissance du modèle. Nous avons conçu ces procédures avec un biostatisticien pour être sûrs d'utiliser le nombre minimum d'animaux nécessaire pour atteindre l'objectif fixé.

Raffinement

Les souris seront hébergées en groupe de 5 avec une litière appropriée avec des enrichissements (matériel de nidification, barreaux à ronger). Des points-limites ont été établis pour permettre de soustraire l'animal à la souffrance dès l'apparition des premiers signes.

17710 Entendre, c'est pouvoir identifier et localiser les sources sonores dans l'espace, de jour comme de nuit ; l'audition contribue ainsi à la sécurité des individus. L'audition est devenue chez l'homme le sens prépondérant sur lequel repose la communication inter-individuelle. Chez l'enfant, elle est essentielle à l'acquisition du langage, et chez l'adulte, elle est indispensable au maintien de son lien social dont la rupture menace son autonomie. Or, l'importance de l'audition continue d'être fortement sous-estimée : le risque que la perte de l'audition fait peser sur les individus, risque qui inclut le déclin des fonctions cognitives, n'est ni compris, ni anticipé et les campagnes d'information et de prévention ont été jusqu'ici peu fructueuses. Par leur ampleur et leurs conséquences, les atteintes de l'audition constitueront, avant 2030, la 7ème cause la plus importante d'invalidité au quotidien, selon l'organisation mondiale de la santé (OMS).

La grande majorité des surdités est liée à une atteinte de l'organe neurosensoriel de l'oreille. On distingue les surdités génétiques et des surdités d'origine environnementale. Actuellement, en l'absence de traitement curatif, la surdité neurosensorielle nécessite d'être compensée par une prothèse auditive. Ces surdités neurosensorielles représentent au moins 80% des surdités dans le monde. La surexposition au bruit est la première cause environnementale de troubles de l'audition.

De ce fait, un encadrement législatif de protection des travailleurs dans le milieu professionnel existe dans de nombreux pays.

L'objectif de notre projet est de mieux comprendre les effets du bruit sur le fonctionnement du système auditif périphérique et central. Il est constitué de deux axes principaux :

- i) Développer des outils de diagnostic permettant de mieux appréhender les processus physiopathologiques induits par un traumatisme sonore intense.
- ii) Caractériser les effets d'expositions sonores de longue durée à des niveaux considérés comme non traumatisants.

Cette étude permettra de fournir des nouveaux outils innovants afin de mieux prendre en charge les patients ayant été exposés à des intensités sonores traumatisantes en fournissant de nouvelles méthodes de diagnostic. De plus, il permettra de s'assurer que les niveaux sonores actuels réglementaires en milieu professionnel (<85 dB) ne présentent réellement aucun danger pour les travailleurs. Les résultats obtenus pourront appuyer un changement de réglementation si nécessaire.

Cette étude s'effectuera chez la souris. Nous mettrons en œuvre dès que c'est possible et de façon systématique la règle des 3Rs (réduire, raffiner, remplacer). Les gènes responsables de surdité chez l'homme sont aussi responsables de déficits auditifs chez la souris, et l'architecture des systèmes auditifs périphérique et central de rongeurs, similaire à celle de l'homme, permet d'étudier chez ces animaux l'audition. Aujourd'hui, il n'existe aucune alternative à l'expérimentation animale pour étudier le système auditif dans son ensemble (de l'oreille interne au cortex auditif), ce dont nous avons besoin dans cette étude. De plus, il n'est pas possible de mettre en culture les systèmes auditifs périphériques et centraux, et aucun modèle informatique n'existe pour simuler le fonctionnement du système auditif dans son ensemble. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, les animaux seront systématiquement génotypés, les mâles et les femelles seront utilisés sans distinction et des méthodes d'analyse statistique sont utilisées afin de déterminer la taille optimale des groupes expérimentaux pour répondre aux questions scientifiques. Afin de prévenir toute souffrance, les animaux impliqués dans le projet seront suivis quotidiennement, et seront anesthésiés et/ou recevront des traitements antalgiques, lorsque c'est nécessaire. Le projet prévoit une utilisation de 4208 animaux à travers 6 procédures (1 procédure classée légère de 1600 animaux et 5 procédures classées modérées comportant dans leur ensemble 2608 animaux).

17711 La bonne pratique d'expérimentation nécessite une bonne connaissance de la biologie des espèces utilisées et aussi la connaissance théorique et pratique des méthodes d'exploration sur le modèle animal. Ce projet porte sur la formation technique et la formation continue du personnel amené à utiliser les animaux dans les procédures expérimentales, sur l'apprentissage de nouvelles techniques et à la mise à niveau des techniciens déjà formés.

Chaque technicien doit maîtriser les techniques faiblement invasives telles que les techniques d'administration des produits, chez le rat et la souris.

Nous utiliserons un nombre total de 750 souris et 350 rats sur une période de 5 ans.

La formation de chaque technicien sera encadrée par le personnel formé ayant les compétences reconnues

Ce projet répond aux exigences des 3R :

-Réduire : Le nombre d'animaux a été optimisé afin de permettre aux expérimentateurs de s'entraîner suffisamment afin de pouvoir acquérir les techniques rapidement.

-Raffiner : Les modèles sélectionnés pour ces formations sont les souris et les rats qui sont les deux espèces hébergées au sein de notre animalerie. Les animaux seront hébergés en groupe et auront les enrichissements nécessaires à leur bien-être. Des points limites ont été définis pour chaque procédure afin de s'assurer du bien-être des animaux. Ces administrations se feront dans le calme de façon à diminuer au maximum tout stress. Elles se feront dans une salle séparée des hébergements afin d'éviter tout bruits. Si nécessaire, des analgésiques pourront être utilisés afin d'éviter toute souffrance et inconfort aux animaux. .

-Remplacer : La formation pratique sur animaux vivants est indispensable pour l'apprentissage des techniques d'administration. Il n'est donc pas possible de remplacer le modèle.

17712 La mort subite inattendue en épilepsie (MSIE) est une cause de décès importante pour laquelle peu de recherche existe. Son incidence est évaluée autour de 1 cas pour 1000 patients épileptiques, et elle est plus importante dans certaines encéphalopathies chez l'enfant, comme le syndrome de Dravet.

Plusieurs hypothèses ont été émises sur les causes de ces MSIE. Une anomalie du rythme cardiaque, secondaire à une crise généralisée, un arrêt respiratoire, ou encore une dépression générale des activités électriques cérébrales pourraient expliquer le décès.

Le but de ce projet est d'étudier les causes de MSIE et les effets d'un médicament antiépileptique sur les caractéristiques physiologiques pouvant intervenir dans ce phénomène.

Pour mieux comprendre les causes de la MSIE, il est nécessaire d'utiliser des modèles animaux d'épilepsie. Seul un modèle animal va permettre d'étudier simultanément tous les différents systèmes physiologiques.

Les animaux choisis sont les rongeurs (rats et souris), pour lesquels des modèles ont préalablement été développés et validés, permettant ainsi une réduction du nombre total d'animaux nécessaires dans ce projet.

Le bien-être des animaux sera assuré par un hébergement en groupe et la présence d'enrichissement (tunnels, coton, sizzle dry ou mouchoirs). Un suivi quotidien est réalisé dès leur arrivée, et permet d'évaluer l'apparition de signes de stress ou de douleurs, en se basant sur une échelle établie à partir de points spécifiques basés sur le comportement ou l'aspect de l'animal.

La chirurgie permettant l'implantation d'électrodes pour l'enregistrement de l'électroencéphalogramme (EEG) ou l'électrocardiogramme (ECG) est réalisée sous anesthésie générale, et sous traitement antidouleur pendant plusieurs jours.

Plusieurs modèles animaux vont être utilisés et le rythme cardiaque et respiratoire, ainsi que le tracé électroencéphalographique vont être étudiés lors de crises générales convulsives pouvant entraîner la mort. Les études seront réalisées sur des animaux jeunes (tout juste sevrés) ou adultes. Pour chaque modèle, le nombre d'animaux utilisés (12 par groupe) est le nombre minimum permettant d'obtenir un effet statistiquement significatif.

Deux lignées génétiques de souris vont ainsi être utilisées (soit 2x12 animaux x 6 (1 groupe non traité + 3 doses produits étudié + 2 produits de référence) x 3 procédures (EEG, ECG ou rythme respiratoire) x 2 sexes x 2 âges différents : soit 1728 souris.

Et 2 souches de rats susceptibles à la MSIE, selon le même schéma expérimental, soit 1728 animaux également, sur une durée totale de 5 ans.

Le nombre total d'animaux pour ce projet est donc de 3456.

17713 La consommation d'alcool par la mère lors de la grossesse est connue pour affecter le développement du fœtus, pouvant mener à un spectre de déficits cognitifs et comportementaux permanents appelés troubles causés par l'alcoolisation foetale (TCAF). Le fonctionnement de notre système nerveux et nos comportements repose sur des schémas hautement complexes et organisés de connexions neuronales. L'une des étapes clés dans le développement des réseaux neuronaux est le guidage des axones depuis leurs corps cellulaires jusqu'à leurs cibles. Or, s'il est reconnu que l'Exposition prénatale à l'alcool (EPA) peut perturber différentes étapes précoces du développement neuronal (comme la genèse des neurones, leur positionnement, et leur survie), on ignore si et comment l'alcool affecte l'étape de guidage des axones et l'assemblage des circuits cérébraux. Ce projet a pour but de répondre à ces questions et d'élucider les mécanismes sous-jacents. Les effets de l'alcoolisation foetale sont notamment médiés par différents mécanismes épigénétiques, dont la dérégulation de petites molécules appelées microARNs. Nous disposons de résultats préliminaires soutenant une hypothèse d'un rôle d'une dérégulation des miARNs axonaux dans l'étiologie de ces pathologies.

Ce projet a pour but de développer un modèle murin afin de caractériser l'étendue du recâblage cérébral induit par l'alcool, identifier les microARNs axonaux dérégulés par l'EPA, et déterminer leur implication dans le développement normal et pathologique de la connectivité cérébrale.

Notre projet nécessite l'utilisation d'animaux. En effet, les études in vitro ne permettent pas de récapituler l'ensemble des interactions cellulaires existantes lors du développement des connexions cérébrales. Par ailleurs, les animaux génétiquement modifiés représentent des atouts pertinents pour obtenir une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués. Cela dit, la qualité de notre plan expérimental ainsi qu'une étude statistique du nombre d'animaux nécessaires à l'obtention d'un résultat scientifique valable nous permettent d'optimiser le nombre d'animaux utilisés et de suivre la règle des 3R. Les souris utilisées dans ce projet sont élevées en groupes sociaux, dans des environnements complexes pour leur permettre de se comporter normalement. Les animaux sont élevés en présence d'objets permettant l'enrichissement de leur environnement (bouts de bois, nids, coton en alternance). Les élevages sont effectués au sein d'un établissement agréé et 5 personnes sont dédiées à l'organisation et l'entretien des élevages et vérifient ainsi tous les jours l'état sanitaire et le bien-être des animaux. Tout au long de l'expérimentation nous nous attacherons à reconnaître la douleur quotidiennement, la quantifier via une échelle de score et agir lorsque les critères d'interruption prédéfinis sont atteints (mise en place d'une analgésie en cas de douleur, et définition de points limites de la douleur au delà desquels une euthanasie sera effectuée).

Ce projet utilisera i) 259 souris adultes non génétiquement modifiées dont 233 seront gestantes et porteront 3029 foetus, et ii) 75 souris gestantes génétiquement modifiées qui porteront 600 foetus. Soit un total de 3288 souris non génétiquement modifiées et 675 souris génétiquement modifiées.

17714 Ce projet a pour but d'évaluer les effets de différents candidats médicaments sur les paramètres cardio-vasculaires chez le primate non-humain vigile en utilisant la télémétrie. La télémétrie permet de mesurer différents paramètres physiologiques chez l'animal vigile non contraint.

Au cours de chaque étude, les primates, une fois instrumentés de manière chirurgicale, sont traités avec le candidat-médicament testé à différentes doses ou avec un véhicule qui a servi à préparer la formulation de la molécule testée. Chaque animal reçoit tous les traitements ou une dose unique du traitement et un total de 84 animaux est prévu pour le projet.

Plusieurs administrations pourront être effectuées sur un même animal en respectant une durée minimale de 48 heures de récupération entre 2 administrations, ce qui permet de raffiner l'expérience.

D'autres évaluations pourront être réalisées en parallèle de l'enregistrement des paramètres cardio-vasculaires par télémétrie, tels que des observations et réalisations de tests neuro-comportementaux ou des évaluations pharmacocinétiques.

Règle des 3 R: remplacement, réduction et raffinement

Remplacement : dans le cadre du développement de certains nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le primate car il n'existe pas de méthode de substitution (in vitro ou in silico) pour évaluer les effets cardiovasculaires.

Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité d'un candidat médicament. A ce jour, le primate est une des espèces de non-rongeurs adaptée à ce type de modèle d'étude.

Réduction : un nombre minimal et homogène d'animaux est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique. D'autre part, les animaux peuvent être utilisés à plusieurs reprises pour tester différentes doses du candidat-médicament ou différentes molécules.

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

- la mise au point de procédures rigoureuses
- la formation du personnel
- un suivi quotidien de l'état de santé des animaux

- la validation du système de télémétrie et validation pharmacologique du modèle
- la recherche des points limites
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire
- le suivi post-opératoire de l'état de santé des animaux ainsi que des soins adaptés afin de permettre une bonne récupération des animaux.

17715 L'épilepsie est un trouble chronique du cerveau touchant plus de 50 millions de personnes dans le monde. Elle se caractérise par la survenue de crises récurrentes se manifestant par des tremblements involontaires ou une perte de conscience. Ces crises sont le signe d'une synchronisation excessive des décharges des neurones dont l'origine peut être congénitale ou suite à un traumatisme. De nombreux traitements existent mais 40% des adultes ont des crises pharmacorésistantes, c'est à dire qu'elles ne peuvent pas être atténuées par des médicaments, l'enjeu est donc d'améliorer les techniques de chirurgies de suppression de foyer épileptique comme l'exérèse et la thermocoagulation. Ces deux techniques reposent sur l'utilisation d'électrodes lors de la chirurgie : un autre point important à améliorer est donc l'histocompatibilité des électrodes avec le tissu nerveux. L'enjeu majeur est de ne limiter la destruction du foyer épileptique qu'au tissu épileptogène, en évitant de toucher le tissu sain.

Notre groupe se propose donc d'évaluer les techniques utilisées aujourd'hui dans le but de les améliorer mais aussi tester l'histocompatibilité des implants et leur efficacité thérapeutique. Ce projet se divise en trois grands axes : - Amélioration de la détection du foyer épileptique - Thermocoagulation du foyer épileptique - Analyse de la compatibilité électrode et tissu cérébral.

Une nouvelle approche non invasive de stimulation va être étudiée dans le cadre de ce projet. La Temporelle Interférence permet en effet de stimuler des zones profondes du cerveau sans avoir à y implanter des électrodes. Cette technique est à visée thérapeutique car elle permettra une stimulation cérébrale profonde comme appliquée chez les patients épileptiques sans avoir à implanter des électrodes de stimulation dans le cerveau.

Remplacer : L'utilisation de souris est indispensable afin de voir comment le cerveau réagit à ces différentes techniques.

Raffiner : Ainsi, de manière à s'assurer du bien-être des animaux, nous prendrons les dispositions nécessaires en vue de réduire, d'éviter et d'atténuer toute forme de souffrance en mettant en place des protocoles d'anesthésie et analgésie à chaque fois que cela est possible. En particulier, nous mettrons en place des moyens afin de réduire au maximum la douleur, l'angoisse et le stress des animaux. Nous donnerons une importance capitale aux conditions d'hébergement, d'élevage et de soin en enrichissant le milieu par exemple. Dans cette étude nous allons utiliser 770 souris qui seront réparties en lots selon nos objectifs, nous permettant par la suite de tirer des conclusions pertinentes.

Réduire : Dans notre étude, nous avons prévu le nombre nécessaire et suffisant d'animaux, afin de garder une puissance statistique dans le traitement des résultats. Les données que nous récolterons seront partagées avec une autre équipe de notre laboratoire afin de pouvoir réduire le nombre d'animaux à long terme. En effet, nos résultats permettront d'enrichir un modèle computationnel du connectome : la souris étant le spécimen le plus utilisé en recherche expérimentale animale, nous devons recueillir le plus d'informations possible afin de pouvoir dresser un modèle commun de son connectome pour s'affranchir de l'utilisation d'animaux vivants dans des études ultérieures.

17716 La myopathie myotubulaire (XLMTM ou MTM) est une maladie musculaire de l'enfant caractérisée par une faiblesse profonde apparaissant au début de la période néonatale avec de sévères handicaps (y compris la dépendance au fauteuil roulant et au respirateur artificiel) et un décès prématuré. Son incidence est estimée à 1/50 000 naissances de garçons. Un des gènes impliqués dans le développement de cette maladie a été décrit et un modèle de souris transgénique (souris « knockout » ou KO) est basé sur la mutation de ce même gène a été créé. Ce modèle reproduit fidèlement les symptômes humains.

Le projet consiste à évaluer dans ce modèle de souris génétiquement modifiées, l'effet bénéfique de nouveaux candidats-médicaments sur la réversion des symptômes musculaires associés à cette myopathie tels que la faiblesse musculaire.

Pour ce projet, il est prévu un nombre maximal de 600 animaux sur 5 ans.

Règle des 3 R:

Remplacement: dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez la souris car il n'existe pas de méthode de substitution (in vitro ou in silico) pour étudier l'impact d'un gène sur un organisme dans sa globalité. A ce jour, la souris est l'espèce la plus adaptée à ce type de modèle d'étude.

Réduction : Un nombre minimal et suffisant d'animaux par groupe est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et d'effectuer des analyses statistiques.

Raffinement : Le raffinement sera obtenu par la mise au point de procédures rigoureuses, un suivi quotidien de l'état de santé des animaux, le suivi des signes cliniques et la détermination des points limites dont certains, spécifiques à ce modèle, prennent en considération l'atteinte musculaire, les difficultés respiratoires et la douleur.

Dans ce projet, le raffinement sera également obtenu par une surveillance accrue des animaux :

Les souris présenteront une faiblesse musculaire, donc l'accès à l'eau et à la nourriture sera facilité. Les souris seront surveillées quotidiennement ; le niveau de douleur et de paralysie seront déterminés à l'aide d'une échelle d'évaluation spécifique à l'espèce et à la pathologie. Les mesures appropriées seront prises pour réduire tout inconfort ou toute douleur qui se développerait (par exemple: traitement par un analgésique).

17717 En oncologie, un des enjeux majeurs en imagerie concerne le diagnostic précoce et spécifique des tumeurs pour améliorer la prise en charge et le traitement de la maladie. Les axes de recherche actuels s'orientent vers le développement d'agents de contraste spécifiques : un anticorps reconnu par la tumeur est couplé à l'agent pour le diriger spécifiquement vers la tumeur. Ainsi, la lésion sera plus contrastée sur l'image et sera mieux différenciée du milieu environnant.

Cette stratégie adoptée par les industriels du médicament est plus ou moins aboutie suivant le type d'agent considéré (échographique, IRM, PET. . .) et plus précisément suivant ses propriétés physicochimiques permettant un couplage stable avec un anticorps et suffisamment performant pour être détecté en clinique. Parmi ces techniques d'imagerie, l'imagerie photonique offre un large panel de fluorophores, facilement fonctionnalisables avec des anticorps et exploitables pour l'imagerie in vivo. L'objectif du présent projet est d'évaluer des biomarqueurs dirigés vers des tumeurs hormono-dépendantes (cancer du sein principalement) développés par un industriel : il s'agira de tester puis sélectionner le ou les biomarqueurs les plus pertinents pour une détection optimale des tumeurs.

Ces agents étant dirigés vers des sites tumoraux (cellulaires et/ou vasculaires) doivent donc être évalués in vivo pour avoir une expression réaliste des sites de fixation. L'expression de ces sites résultant d'une cascade d'interactions cellulaires/moléculaires dans la tumeur ne peuvent être simulés ni reproduits sur cultures cellulaires ou organoïdes. Il n'est pas possible également d'élaborer des fantômes de réseaux vasculaires identiques (en terme de taille et de tortuosité de vaisseaux) à celui d'une tumeur in vivo. Or, la diffusion des biomarqueurs étudiés est directement liée à l'hémodynamique tumorale. Il est donc indispensable que le protocole soit conduit sur un modèle présentant les mêmes caractéristiques biologiques que les tumeurs des patients. Ainsi, l'utilisation de modèles animaux développant des tumeurs orthotopiques est incontournable. De plus et afin de limiter le nombre d'animaux, seuls les biomarqueurs ayant prouvé un intérêt manifeste sur cultures cellulaires seront inclus dans l'étude. Toujours dans l'optique de limiter le nombre d'animaux utilisés, deux greffes tumorales en contralatéral seront réalisées par souris ce qui permet de diviser par deux le nombre d'animaux inclus. Enfin, toutes les procédures mises en oeuvre dans ce projet ont par ailleurs été rédigées de sorte à minimiser les manipulations et ainsi le stress des animaux avec une surveillance quotidienne de leur état général. Cinq biomarqueurs seront évalués chaque année. Trois études successives seront réalisées pour déterminer la

cinétique, la dose optimale et la spécificité de chaque biomarqueur. Pour ce faire, 1530 souris au maximum seront nécessaires sur la totalité du projet.

17718 Chaque étude de ce projet a pour objectif principal d'étudier le devenir d'une molécule, candidat-médicament, chez le primate lorsque cette espèce est utilisée au cours du développement préclinique de cette molécule (pharmacocinétique).

Pour cela, des prélèvements sanguins sont réalisés chez le primate vigile ou anesthésié après l'administration du candidat-médicament et pourront être associés à des prélèvements d'autres liquides biologiques (ex: urines, liquide céphalo-rachidien).

Ces prélèvements sont utilisés pour mesurer dans le temps la concentration du candidat-médicament administré et/ou de ses métabolites et éventuellement la concentration de différents marqueurs biologiques pertinents.

L'étude pharmacocinétique est donc une étape importante, car une molécule peu absorbée ou rapidement éliminée a peu de chance de devenir un médicament. De façon générale, les études pharmacocinétiques sont effectuées chez deux groupes d'animaux, les rongeurs d'une part (souris, rat, cobaye) et les gros mammifères d'autre part (chien, miniporc, primate non-humain).

Le nombre prévisionnel maximum d'animaux est de 120 primates sur 5 ans.

La conception de ce projet prend en compte la règle des 3R.

- Remplacement : Dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le primate car il n'existe pas de méthode de substitution (in vitro ou in silico) pour évaluer la pharmacocinétique d'une nouvelle molécule. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité, la toxicité et la pharmacocinétique d'un candidat médicament. A ce jour, pour certains médicaments, le primate est l'une des espèces qui est la plus adaptée à ce type de modèle d'étude.

- Réduction : Un nombre minimal et suffisant d'animaux par groupe est utilisé afin d'analyser de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et de réaliser une analyse statistique.

- Raffinement : Dans ce projet, le raffinement est obtenu par :

- la réduction du volume sanguin prélevé grâce à l'amélioration de la sensibilité des méthodes d'analyse

- la familiarisation des animaux aux procédures expérimentales

- le recours à des procédures les moins invasives possibles

- le suivi d'éventuels signes cliniques

- la détermination des points limites

- le suivi post-anesthésie de l'état de santé des animaux dans le cas d'une anesthésie, permettant ainsi des soins adaptés pour une bonne récupération.

17719 La surface du système nerveux central (SNC) est protégée par des membranes : les méninges. La découverte récente de la diversité des populations immunes résidant dans les méninges et leur capacité à contrôler le cerveau (cognition, comportement) et l'inflammation du cerveau (migraine, méningites, sclérose en plaque, ...) ouvre de nouvelles perspectives en terme de recherche fondamentale et thérapeutique. Les cellules immunitaires les plus représentées dans les méninges sont les macrophages. Ils scannent en permanence la surface du SNC et peuvent détecter la présence de pathogènes avant qu'ils s'introduisent dans le cerveau et la moelle épinière. Mon projet a donc pour objectif de caractériser les macrophages des méninges à l'état de repos et suite à un stimulus microbien (virus de la chorioméningite lymphocytaire).

Afin d'évaluer les réponses inflammatoires dans le SNC et les méninges lors d'une simulation d'une infection microbienne in vivo, nous utiliserons des souris de type sauvage et transgéniques provenant d'établissements éleveurs et collaborateurs. Les souris seront infectées puis euthanasiées et leurs macrophages méningés seront triés pour analyse transcriptomique. Il est indispensable de travailler sur un organisme entier (modèle murin) pour comprendre l'induction des

réponses immunitaires dans les méninges en relation avec le SNC. Puisque nous ne pouvons pas nous affranchir du modèle animal, nous réduirons au maximum le nombre d'animaux utilisés en suivant la règle des 3R.

-Réduction : nous limiterons au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en effectuant des expériences pertinentes et complètes. Nous utiliserons des tests statistiques adéquats pour planifier nos expériences. Le nombre d'individus nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs est de 12 animaux par groupe pour l'analyse intravitale, et pour les analyses transcriptomiques, 80 souris par groupe sont nécessaires étant donné la faible quantité de tissu méningé par souris, d'où l'utilisation de 416 souris pour l'ensemble de ce projet. Nous utiliserons plusieurs tissus du même animal (méninges, cerveau) pour limiter le nombre d'animaux utilisés.

-Raffinement : Les souris seront hébergées dans l'animalerie de sécurité biologique de niveau 3. Les conditions de l'animalerie sont contrôlées (température, hygrométrie, photopériode). Les cages de 504cm² sont adaptées pour limiter le stress des animaux (100cm² de surface par animal au minimum et matériel pour la confection de nids). Les infections virales des souris sont asymptomatiques. La souffrance des animaux sera limitée autant que possible, par l'utilisation d'antalgiques et la détection d'un point limite précoce. Les infections virales seront nécessaires pour mieux comprendre la validité de notre modèle et le rôle des macrophages dans la physiopathologie des infections du SNC.

-Remplacement : le système que nous étudions est intégré au système nerveux central, rendant difficile toute tentative de remplacer notre modèle d'étude par d'autres organismes modèles (*C. elegans*, ...). De plus, il s'agit d'un système intégré, rendant toute approche *in vitro* peu utile pour la compréhension de ce système. Plusieurs études ont indiqué une forte similitude entre les mécanismes de l'inflammation des méninges chez l'humain et chez la souris, indiquant que notre modèle pourra aider à la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliquant l'inflammation du SNC chez l'Homme.

17720 Nous avons un projet portant sur le rôle de l'IL-1Ra dans les réponses humorales physiologiques et physiopathologiques et ainsi avoir des implications thérapeutiques pour le traitement des pathologies auto-immunes. L'évolution de ces pathologies autant que les thérapies proposées sont la résultante de nombreux mécanismes complexes impliquant l'interaction directe et/ou indirecte d'un grand nombre d'acteurs immunologiques. Il est donc indispensable, dans le cadre de ce projet, de réaliser les expériences sur des animaux. En effet, aucun modèle alternatif et aucune approche *in vitro* satisfaisante n'existent et ne peuvent être utilisées pour répondre aux questions posées. Seul le modèle animal permet d'évaluer l'efficacité des approches thérapeutiques. Nous avons choisi d'utiliser un modèle murin (petit animal), qui permet de répondre aux questions scientifiques posées et pour lequel nous avons toute l'expertise et les outils nécessaires. Rapidement nous nous sommes rendu compte que ces souris présentaient une hypofertilité. Nous aimerions donc majorer le rendement de notre élevage en substituant les souris déficientes. Ceci nous permettra de diminuer le nombre d'animaux vivants sacrifiés car de mauvais phénotypes ou d'âge extrême.

Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur le principe de réduction : « règle des 3 R ». Nous utiliserons au total 57 souris C57BL/6 transgéniques. Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal et tenant compte de l'effectif minimal pour obtenir le nombre de souris suffisant pour des expérimentations. Nous veillerons systématiquement à diminuer les contraintes et la douleur qui peuvent être liées à la mise en oeuvre expérimentale, notamment par une période d'habituation systématique avant expérimentation, un hébergement amélioré, des points d'arrêt anticipés et le recours à des anesthésie et analgésie pour limiter la douleur.

17721 En France, l'accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique, c'est-à-dire l'occlusion d'un vaisseau cérébral par un caillot sanguin, touche une personne toutes les 4 minutes. Les conséquences d'un AVC sont sévères, avec 40% des patients souffrant de handicap ou de démence des années après l'AVC. Les seuls traitements disponibles actuellement sont une molécule capable de détruire le

caillot sanguin bloquant l'artère, et une chirurgie pour retirer le caillot mécaniquement. Malheureusement, ces traitements ne sont possibles que dans les premières heures après l'AVC, ce qui limite considérablement leurs utilisations. Il est donc essentiel de développer de nouveaux traitements pouvant être administrés plus tardivement, ainsi que des traitements aidant à la réparation et/ou la récupération des dommages neurologiques post-AVC et ainsi éviter le handicap à long terme. Une piste possible est d'impliquer les plaquettes, qui jouent un rôle essentiel dans la coagulation du sang. En effet, elles sont aussi impliquées dans d'autres processus physiopathologiques, tels que l'inflammation et la régénération tissulaire. Des études récentes ont suggéré qu'elles pourraient aider à la réparation cérébrale post-AVC, mais cela n'a été que très peu étudié, et seulement peu de temps après l'AVC.

Ce projet est la partie imagerie d'un projet plus global déclaré et validé dans un autre établissement, dont les objectifs sont de déterminer la contribution des plaquettes dans le processus de réparation neurovasculaire post-AVC à long terme, et de tester de nouveaux traitements anti-plaquettaires dans l'AVC. L'objectif de la partie imagerie (imagerie par résonance magnétique, ou IRM) est de connaître l'atteinte cérébrale occasionnée par l'AVC avant qu'un traitement soit appliqué, pour connaître l'atteinte de base de chaque souris. Ceci est réalisé dans une partie des animaux du projet global.

Ce projet d'imagerie de 5 ans sera conduit sur 63 souris. Dans les 3 jours suivant la chirurgie induisant l'AVC (réalisée dans un autre établissement utilisateur), une unique session d'IRM sera réalisée sur des souris de 3 lignées différentes, avec AVC (7 souris par lignée) ou sans AVC (7 souris par lignée), ainsi que des souris contrôles avec AVC (7 souris par lignée). Chacune de ces 3 lignées présente un élément de la fonction des plaquettes qui est défaillant, permettant ainsi de comprendre quel élément plaquettaire est le plus essentiel pour la réparation post-AVC. Après le réveil de l'animal suite à l'IRM, l'animal sera réintégré à l'autre établissement utilisateur pour euthanasie et extraction des tissus pour diverses analyses.

Concernant la règle des 3R, ce modèle d'AVC n'est pas remplaçable. Aucune approche in vitro ne permet de rendre compte des processus de réparation et de remodelage neurovasculaire après AVC au cours du temps. Grâce à des résultats antérieurs obtenus avec ces modèles animaux, un calcul de puissance a été réalisé pour déterminer le nombre de sujets nécessaires par groupe. Des points-limites ont été définis selon des observations de poids, d'apparence et de comportement et un score à partir duquel l'animal sera euthanasié a été défini. Ceci sera pris en charge par l'autre établissement utilisateur. Concernant l'imagerie, le réveil de l'animal sera réalisé sous supervision. Les souris utilisées ont un phénotype non dommageable connu par l'équipe. En l'absence d'AVC, aucune surmortalité ni aucune modification du bien-être animal n'est attendue. L'imagerie par résonance magnétique est réalisée sous anesthésie à l'isoflurane de courte durée et n'occasionne aucune douleur ou angoisse chez les animaux.

17722 Durant un séjour en altitude, on observe une augmentation de la production de globules rouges (GR). Cette réponse est sous le contrôle de l'érythropoïétine (EPO) dont la production est régulée par l'hypoxie. Après leur entrée dans la circulation, ces GR circulent durant environ 120 jours chez l'Homme et 45 à 55 jours chez la souris. Durant cette période ils subissent de nombreuses modifications conduisant à leur sénescence (vieillesse cellulaire) puis leur élimination de la circulation. Les niveaux d'EPO réguleraient l'élimination érythrocytaire (clairance) afin de maintenir un équilibre entre les besoins et la fourniture en oxygène. En cas d'anémie ou d'hypoxie, l'augmentation d'EPO diminuerait la sénescence et le stockage des globules rouges endommagés en agissant sur les globules rouges eux-mêmes, via l'activité et/ou la sensibilité du système réticulo-endothéliale. Lors du retour au niveau de la mer, après un séjour en altitude, la diminution du taux d'EPO augmenterait la sénescence et la clairance érythrocytaire afin de diminuer le nombre de globules rouges en circulation. Dans ce contexte, nos objectifs sont d'identifier les effecteurs cellulaires et moléculaires de la désactivation des globules rouges induite par l'EPO et de caractériser un modèle physiopathologique de la clairance érythrocytaire. L'étude de systèmes physiologiques nécessitent l'utilisation de modèle animaux car c'est le seul moyen d'analyser des effets sur un organisme entier. De plus ce type d'étude ne peut se faire qu'in vivo. En effet, il n'existe

pas à ce jour de méthode alternatrice à l'expérimentation animale in vivo pour étudier l'impact de l'EPO sur la clairance érythrocytaire. Pour répondre à ces questions nous utiliserons un modèle murin anémique déficient en EPO. Ce projet nécessitera 170 animaux pour la totalité de la durée du projet (2 ans) et se fera en accord avec la règle des 3R. Pour cela, nous veillerons à réduire le nombre d'animaux utilisés. Nous disposons de données, publiées ou non, nous permettant de réaliser des calculs statistiques permettant de définir le nombre d'animaux nécessaire pour obtenir un effet statistiquement significatif et pour déterminer des points d'arrêt d'expérimentation. Toutes les procédures seront réalisées dans le respect total des règles du raffinement et les animaux seront hébergés dans un environnement enrichi. Le personnel travaillant avec les animaux possède les diplômes d'expérimentation animale requis. Les conditions de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute souffrance que pourrait ressentir les animaux

17723 En dépit des efforts réalisés ces dernières années dans la validation de nouvelles cibles pour le traitement du cancer, les échecs en clinique des thérapies innovantes sont encore trop nombreux en raison en particulier de l'acquisition de résistance secondaire. Il existe donc aujourd'hui un consensus selon lequel l'amélioration de nos systèmes d'évaluation passe par la mise au point de modèles in vivo mieux caractérisés et plus proches des pathologies cancéreuses étudiées. Les greffes de tumeurs humaines chez la souris permettent de conserver les caractéristiques des tumeurs humaines et constituent donc des modèles d'étude adaptés. Les thérapies ciblées ont connu un grand succès dans de multiples indications. Cependant, la cellule tumorale acquiert une résistance à ces thérapies ciblées et la maladie progresse habituellement dans les 5-7 mois. La compréhension des mécanismes qui régissent la résistance acquise à ces thérapies constitue donc un enjeu majeur. Un projet clinique a été mis en place sur l'étude des mécanismes de résistance aux thérapies ciblées. Ce projet est divisé en deux sous-parties:

-Une composante clinique où à l'aide des technologies à haut débit nous étudierons les mécanismes de résistance d'un point de vue génétique.

-Une composante préclinique qui a pour but de valider ces mécanismes de résistance à l'aide de modèles et de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le patient.

Une première phase est en cours où nous avons développé des modèles de tumeurs humaines greffées sur souris. A ce jour nous avons développé 70 modèles précliniques résistants à des thérapies innovantes. Nos axes de recherche ont permis de générer des modèles précliniques pour 4 cohortes: inhibiteur de l'EGFR, inhibiteur de ALK, inhibiteur FGFR et inhibiteur de l'AR. Dans les prochaines années nous espérons compléter ces cohortes et en ouvrir des nouvelles telles que : inhibiteur de PARP dans le cancer de la prostate, inhibiteur de RET/MET/ROS dans le cancer du poumon et de la thyroïde, inhibiteur de KRAS et des inhibiteurs de l'épigénétique. Pour chacun de nos modèles établis, des lignées cellulaires où des organoïdes seront développées pour réaliser un dépistage de médicament dirigé par les résultats de génétiques.

Par la suite ces résultats obtenus in vitro seront validés sur nos modèles de souris. Cette première étape in vitro permettra de sélectionner les composés les plus efficaces et cela aura pour conséquence de réduire le nombre d'animaux.

Nos résultats préliminaires suggèrent deux types de test pharmacologique différents :

1)Test de nouvelles molécules : nos résultats in vitro ont montré une efficacité d'un nouveau médicament ou d'une famille de médicament. Ainsi nous pourrions tester le ou les médicaments candidats en comparaison avec la thérapie de résistance du modèle. Nous utiliserons un maximum de 4200 souris pour nos 70 PDX issus de nos 4 cohortes.

2)Test de combinaisons thérapeutiques : nos résultats in vitro montrent qu'une combinaison thérapeutique peut restaurer la sensibilité de la tumeur. Nous utiliserons un maximum de 2800 souris pour nos 70 PDX issus de nos 4 cohortes.

Pour le bien-être animal, et le raffinement des expériences, nous prévoyons pour tous les actes pouvant engendrer un stress ou une douleur, l'utilisation d'anesthésie et/ou d'analgésique. Afin de réduire le stress de l'animal, l'environnement sera enrichi avec du coton leur permettant de se protéger et de créer un nid. Les animaux recevront de l'aliment type Diet gel energy en cas de

problème lié à l'alimentation. Avant de pouvoir tester les médicaments sur l'être humain, il est indispensable de faire cette évaluation sur un organisme complexe afin de confirmer les résultats obtenus in vitro. Il n'existe donc pas de méthode alternative de remplacement permettant d'éviter l'utilisation de l'animal. Les techniques de biologie moléculaire vont nous permettre d'émettre des hypothèses qui seront validées dans un premier temps in vitro puis in vivo. Ainsi pour répondre à toutes ses questions, nous pourrons utiliser un maximum de 7000 souris.

17724 Suite à une infection ou une vaccination, notre système immunitaire met en place une réponse impliquant différentes cellules et molécules qui combattent l'infection et nous protègent contre une future exposition. Les lymphocytes B jouent un rôle central dans cette réponse en reconnaissant de façon spécifique les agents infectieux et en produisant des anticorps qui vont se fixer à ces agents et ainsi favoriser leur neutralisation et leur élimination.

Nous travaillons sur une molécule qui contrôle la réponse immune au niveau des lymphocytes B en favorisant leur activation, différenciation et migration. Nous avons généré un modèle murin génétiquement modifié qui comporte une mutation gain de fonction pour cette molécule, n'ayant pas d'effet dommageable sur le bien-être animal. Cette mutation est retrouvée, dans le cas de la maladie de Waldenström (maladie caractérisée par une production excessive de lymphocytes B et d'anticorps anormaux), en association avec une mutation d'une autre molécule. Afin de comprendre comment ces molécules agissent sur la qualité de la réponse immune et la localisation des lymphocytes B, nous allons étudier la réponse vaccinale dans un modèle de souris génétiquement modifiées portant une mutation sur chacune de ces deux molécules. Après avoir caractérisé dans un premier temps cette nouvelle lignée de souris et démontré qu'elle pourrait être un modèle pertinent pour l'étude de la maladie de Waldenström, nous réaliserons des expériences d'immunisation. Cela consistera à injecter par voie intra-péritonéale (injection non douloureuse dans l'abdomen de souris éveillées) une substance qui mimera l'effet d'une infection bactérienne. Cette procédure expérimentale sera réalisée en présence ou non d'une substance contrecarrant l'effet d'une des 2 molécules mutées. Cette substance sera administrée par voie intra-péritonéale une fois par jour pendant 30 jours sur souris éveillées. Dans un troisième temps, nous réaliserons des expériences d'injections de lymphocytes B producteurs d'anticorps à des souris normales afin de définir si le gain de fonction des 2 molécules mutées joue un rôle dans leur migration dans l'organisme (injection non douloureuse par voie intraveineuse au niveau de la queue de souris éveillées).

En application de la règle des 3R (remplacement, réduction, raffinement), aucune procédure de remplacement permettant d'éviter le recours à l'expérimentation animale n'est connue à ce jour. En effet, les réponses immunitaires dépendent de l'environnement complexe des organes du système immunitaire, il est donc impossible de remplacer totalement le modèle animal.

Nous avons réduit au maximum le nombre d'animaux utilisés dans ce projet. Les groupes expérimentaux seront constitués de 8 souris, nombre minimum pour obtenir des résultats validés statistiquement. Ainsi pour mener à bien ce projet nous utiliserons 1360 souris sur une période de 5 ans : 64 souris (3 lignées génétiquement modifiées et une lignée contrôle) seront utilisées pour la caractérisation du modèle de la maladie de Waldenström ; 576 souris seront nécessaires pour étudier la qualité de la réponse immunitaire dans 4 lignées (3 temps d'analyse, 3 expériences indépendantes) ; 432 souris (3 lignées génétiquement modifiées et une lignée contrôle) pour l'étude de la réponse immunitaire en présence d'une substance contrecarrant l'effet d'une des molécules mutées ; et 288 souris normales pour caractériser la migration des cellules productrices d'anticorps (3 temps d'analyse, 3 expériences indépendantes).

Nous veillerons également au bien-être animal en élaborant des méthodes permettant de réduire, supprimer, soulager l'angoisse et la détresse subit par les animaux, par une surveillance régulière en utilisant une fiche d'évaluation se basant sur différents aspects (comportement, attitude physique...). Nous avons ainsi défini des critères d'arrêt qui lorsqu'ils sont atteints conduiront à l'euthanasie de la souris. Enfin, les procédures les plus longues s'étendent sur 12 mois. A l'issue de chaque procédure les animaux seront euthanasiés.

17725 La prévalence des maladies neurodégénératives est en constante augmentation à l'échelle planétaire. La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative qui affecte 1% de la population mondiale âgée de plus de 65 ans. En France, plus de 200 000 personnes sont atteintes et 10 000 cas supplémentaires sont diagnostiqués chaque année. L'âge étant le facteur de risque majeur, il est attendu que l'incidence de la maladie continue de croître. Les traitements disponibles à l'heure actuelle permettent uniquement de prendre en charge les symptômes moteurs de la maladie. Cependant, avec le temps, leur efficacité s'estompe et des effets secondaires peuvent apparaître. La découverte de nouvelles molécules/stratégies permettant de ralentir, voire stopper, la progression de la maladie constitue donc un enjeu sociétal majeur.

La maladie de Parkinson se caractérise notamment par une dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques (DA) de la substance noire (SN). Notre laboratoire a démontré le rôle essentiel de la protéine murine Engrailed 1 (mEN1) pour la survie de ces neurones. Ce projet a pour objectif la production de données précliniques sur l'activité neuroprotectrice de la protéine humaine recombinante Engrailed 1 (hEN1) permettant la soumission d'une demande d'essai clinique. Nous chercherons à i) caractériser le rôle endogène de EN1 dans la régulation de l'activité électrique des neurones DA et la physiologie de la SNpc, ii) caractériser l'effet pharmacologique de la protéine hEN1 sur la survie des neurones DA et iii) explorer de nouvelles approches permettant l'expression durable de EN1 dans le but de prolonger son effet neuroprotecteur. Nous prévoyons d'injecter la protéine hEN1 ainsi que des virus encodant la protéine dans le cerveau de souris par injection stéréotaxique, suivi par des études histologiques, physiologiques, et/ou comportementales.

Nos expériences devant permettre de soutenir une demande d'essai clinique, il est nécessaire qu'elles soient réalisées sur l'animal. De plus, l'expérimentation in vitro ne présente pas le contexte tridimensionnel et physiologique nécessaire à la caractérisation de l'activité neuroprotectrice de hEN1. La souris est un modèle de choix pour l'étude des mécanismes moléculaires régulant les grandes fonctions biologiques. Cette espèce animale permet également de créer des modèles d'étude des pathologies humaines. Ici, nous utiliserons un modèle murin de la maladie de Parkinson. Sur la base de notre expérience antérieure, nous prévoyons d'utiliser 8 souris par condition expérimentale afin d'obtenir une puissance statistique satisfaisante. Les données quantitatives obtenues feront l'objet d'une analyse de variance, suivie de tests posthoc. Les procédures ont été optimisées afin de minimiser le nombre d'animaux, la caractérisation de nos différents lots/type de virus étant notamment réalisée sur des effectifs réduits. Nous comptons utiliser un maximum de 268 souris, sur 5 ans.

Ces interventions nécessitent des procédures de classe modérée. Pour toutes nos expériences, les souris sont anesthésiées selon les bonnes pratiques vétérinaires. Toute souris ayant subi une expérience sous anesthésie est ensuite placée dans des conditions enrichies pour son bien-être. Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux. Les points limites sont décrits pour chaque procédure. Les souris sont hébergées dans une animalerie récemment rénovée. Elles sont sous contrôle de la température et de la lumière (en cycle jour/nuit). Elles bénéficient de l'équipement complet pour leur bien-être (cotons pour leur nid, nourriture et eau libre d'accès, nourriture plus riche si besoin). Dans le cadre du suivi des animaux selon les paramètres définis dans une grille d'évaluation du bien-être, à la suite d'une injection intracérébrale, les animaux seront observés quotidiennement pendant 5 jours (puis 3 fois par semaine). Les animaux seront utilisés uniquement pour ce projet.

Ce projet permettra la soumission de dossiers réglementaires pour essai clinique afin de limiter le nombre d'interventions chirurgicales à réaliser chez les patients atteints de la maladie de Parkinson.

17726 Les dispositifs médicaux (DM) prennent une place grandissante dans notre pratique de la médecine et de la chirurgie.

Ces dispositifs correspondent à tout instrument, implant, appareil, équipement, logiciel ou réactif utilisé, seul ou en association, à des fins médicales chez l'homme.

De nature et d'application très variées, les DM basés sur des approches mini invasives connaissent un développement croissant et répondent aux défis de l'innovation et des nouvelles technologies dans la prise en charge des patients. Il peut s'agir par exemple d'endoprothèses vasculaires, de stents digestifs permettant l'anastomose de compartiments, le drainage de collections, le traitement de tumeurs, de logiciels accompagnant la navigation per opératoire... De nouveaux instruments sont aussi en cours de développement pour améliorer la pratique de la chirurgie mini-invasive en laparoscopie ou par voie percutanée par exemple.

Pour permettre leur application en clinique, le développement de nouveaux DM s'appuie sur des phases de validation préclinique où la faisabilité, l'efficacité et la sécurité des équipements doivent être démontrées.

Cette évaluation préclinique passe par des essais permettant (i) la preuve de concept et la mise au point des techniques chirurgicales qui se veulent les moins invasives possibles, et (ii) la vérification que le dispositif est efficace et fiable pour l'indication thérapeutique visée.

Le but de ce projet est de tester sur modèle porcin de nouveaux dispositifs chirurgicaux implantés et médicaux innovants pour en étudier et tester l'efficacité, la compatibilité, la fiabilité et la sécurité. 350 animaux pourront être utilisés sur 5 ans dans le respect de la règle des 3 R :

Remplacement : Toute évaluation d'un dispositif médical doit apporter un faisceau de preuves suffisant de son efficacité et de sa sécurité pour autoriser son utilisation sur des patients avec un taux de réussite optimal (durée d'intervention, efficacité du geste). L'étude initiale du DM sur simulateurs et modèles ex vivo permet d'en tester le concept et la faisabilité technique. Elle doit être souvent complétée par des études de compatibilité, d'efficacité et de sécurité qui nécessitent une phase d'expérimentation sur organisme entier vivant. Les procédures innovantes sont ainsi reproduites dans des conditions proches de la clinique, précliniques, qui incluent également les situations parfois difficiles liées aux voies d'abord, repères anatomiques, hémorragie, nécrose, viabilité des organes, complications.

Réduction :

Le nombre d'animaux a été réduit au maximum afin d'obtenir des résultats statistiquement exploitables permettant d'envisager une application chez l'homme. Les interventions sont réalisées par des chirurgiens experts, ce qui limite le nombre d'animaux nécessaires en optimisant le taux de succès. Chaque DM sera testé préalablement sur un faible effectif d'animaux (2 à 6) avant d'engager une étude plus complète après avis d'experts et d'éventuelles améliorations du dispositif et/ou de la procédure.

Raffinement :

Le protocole prévoit des procédures mini-invasives réalisées sous anesthésie générale. Dans les études de faisabilité, de nombreux DM peuvent être évalués sans nécessité de réveiller l'animal en fin d'expérimentation.

Dans les études de compatibilité, d'efficacité et de sécurité du DM, les animaux seront réveillés après l'intervention et seront soumis à un suivi clinique quotidien par du personnel qualifié, sous couverture antalgique dès que nécessaire, et hébergés dans un environnement contrôlé (température, hygrométrie) et enrichi : Les porcs sont des animaux sociaux, propres, avec un instinct de fouissement et d'exploration des matériaux. L'enrichissement apporté pour favoriser leurs comportements naturels comprend une stabulation en groupe social, la mise à disposition de jouets à mâchouiller, à manipuler (balles, jouets. . .), des brosses pour se frotter, l'accès à des zones de repos distinctes des zones de défécation. L'environnement sonore en animalerie est aussi apaisé par la diffusion de musique.

Toute altération de leur état général sera reportée au vétérinaire et au responsable de l'intervention médicale qui mettront en œuvre des traitements adaptés. Des critères d'arrêt anticipé en cas de survenue de complications sont définis et validés par la structure en charge du bien-être animal.

17727 Les patients admis en réanimation suite à une inflammation aiguë (infection, traumatisme) voient se mettre en place une cicatrice immunitaire qui perdure plusieurs années. Cette cicatrice

immunitaire semble affecter l'immunité anti-cancéreuse car ces patients ont une incidence de cancer diminuée jusqu'à 10 ans après leur passage en réanimation.

Nous souhaitons analyser l'impact de cette inflammation sur la fonction anti-cancéreuse de lymphocytes humains dans un modèle de souris humanisées.

Les parties 1 et 2 de ce projet seront des mises en place. La 3ème partie aura pour but de répondre à notre question scientifique.

-Mise en place du modèle de greffe de cellules cancéreuses humaines dans les souris immunodéficientes

-Mise en place du protocole d'administration de lymphocytes humains dans les souris immunodéficientes pour les humaniser.

-Etude de l'impact d'une inflammation sur l'activité anti-cancéreuse de lymphocytes humains contre des cellules cancéreuses humaines dans des souris humanisées.

Au total, ce projet nécessitera 648 souris.

L'utilisation d'animaux pour l'évaluation de l'impact de l'inflammation sur l'activité anti-cancéreuse des lymphocytes humains nous permettra d'apporter de nouveaux éclairages dans la lutte contre le cancer et dans la prévention de ces derniers.

Remplacement : Les paramètres étudiés dans ce travail ne peuvent être aujourd'hui remplacés par des procédures *in vitro*. Réduction : Le nombre de souris a été réduit au minimum afin de garder une analyse statistique fiable et ce nombre a été optimisé en fonction des expériences précédentes. Raffinement : Pour leur confort, les animaux seront hébergés dans des cages adaptées (groupe de 5 max), avec enrichissement (frisottis et/ou dôme) et accès libre à l'eau et à la nourriture. De façon à diminuer le stress, la souffrance et la douleur, un certain nombre de procédures seront réalisées sous anesthésie générale et un traitement analgésique leur sera donné de façon adaptée en fonction de la procédure réalisée. Le bien-être des animaux est surveillé tout au long de l'étude avec une évaluation quotidienne des signes généraux.

17728 Ce projet a comme but principal d'étudier les mécanismes neurobiologiques impliqués dans le risque persistant de rechute. L'addiction est un trouble mental caractérisé par la prise compulsive de drogue qui persiste malgré des conséquences négatives. Quelques études ont montré que l'expression de protéines impliquées dans ce métabolisme était modifiée aussi bien chez l'Homme, que dans des modèles animaux d'addiction, en réponse à la cocaïne ou à l'alcool. Notre hypothèse de travail est que des dérégulations du métabolisme du cholestérol seraient impliquées dans le phénomène d'addiction et qu'en diminuant les taux de cholestérol cérébraux, il serait possible de reverser les « empreintes » laissées durablement par les drogues dans le cerveau et responsables de l'addiction.

Pour tester notre hypothèse, nous utiliserons un protocole d'addiction (auto-administration de cocaïne) et nous allons le coupler à des approches virales pour moduler l'expression d'une protéine impliquée dans la dégradation du cholestérol (=CYP46A1) dans 2 régions cérébrales spécifiquement (le Striatum dorsal et l'amygdale) pour mesurer l'impact de la modulation du métabolisme du cholestérol sur l'addiction. Ces expériences sont actuellement réalisées chez des mâles et des résultats préliminaires encourageants ont été obtenus. Comme cela est de plus en plus demandé dans la littérature, nous voulons tester si des résultats équivalents peuvent être obtenus chez des rats « femelles », afin d'étudier la généralisation de ces observations ou l'existence d'un impact du genre.

Afin de caractériser l'implication du métabolisme du cholestérol dans l'addiction, nous déterminerons : 1) si la modulation du métabolisme du cholestérol avant toute exposition aux drogues impacte le comportement d'addiction ; 2) si la modulation du métabolisme du cholestérol chez des rats femelles abstinents après une phase d'auto-administration de cocaïne peut modifier le comportement de recherche de drogues. En effet, l'un des problèmes majeurs dans le traitement de l'addiction est la prévention des rechutes qui peuvent être observées après une longue période d'abstinence.

Dans ce projet, nous avons pris en considération la règle des 3Rs (remplacer, réduire et raffiner). Ce type de recherche, visant à comprendre les bases d'une maladie psychiatrique telle que l'addiction, ne peut être menée que sur un animal vivant (remplacer).

Nous minimiserons le nombre d'animaux utilisés par des méthodes expérimentales validées et reproductibles. Et nous utiliserons des méthodes statistiques appropriées de type ANOVA qui nous permettront de faire des comparaisons multiples et de limiter le nombre d'animaux utilisés (réduire). Nous avons calculé que pour cette étude 240 rats femelles seront nécessaires pour obtenir des données analysables statistiquement.

Pour diminuer tout stress potentiel, des objets d'enrichissements (exemple : boules de cotons) seront ajoutés aux cages d'hébergement (raffiner). Par ailleurs, les animaux subissant une chirurgie sous anesthésie générale seront aussi traités en pré-opératoire avec des anti-inflammatoires pour soulager toutes douleurs pendant et après l'opération (raffiner). L'état des animaux sera régulièrement évalué selon une grille de score pendant toute la durée des expériences afin de décider de la nécessité de traitements post-opératoires.

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

17729 Le projet présenté ici constitue la partie pratique des formations initiales réglementaires en expérimentation animale (formations A et B). Ces formations étant spécialisées rongeurs, elles ciblent la connaissance des modèles de rats et souris. Elles ont reçu un avis favorable de la Commission Nationale de l'Expérimentation Animale et sont reconnues par le Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation (agrément ministériel délivré pour chaque formation). La formation A s'adresse à toute personne devant appliquer des procédures expérimentales aux animaux, la formation B aux personnels concevant des procédures expérimentales et des projets.

Ces formations sont indispensables pour la réalisation de projets scientifiques en recherche biomédicale et la dispense d'enseignement supérieur technique spécialisé en sciences du vivant. Elles constituent donc un pré requis incontournable pour les chercheurs, enseignants universitaires, étudiants de master et au-delà, ingénieurs et techniciens devant utiliser des animaux à des fins scientifiques.

Les objectifs de ces travaux pratiques sont :

- initier les participants à la manipulation de rat et souris
- illustrer les concepts fondamentaux abordés en cours : prise en compte de l'animal comme être sensible, règle des 3Rs, éthologie, points limites, anesthésie, méthodes de mise à mort, anatomie, physiologie,
- apprentissage des gestes techniques de base (identification, administration, prélèvements, mise à mort) et mise en pratique des notions éthiques de base de l'expérimentation animale sur modèles de rat et souris.
- s'assurer que les personnes suivant ces formations aient les connaissances pratiques nécessaires pour concevoir/réaliser/participer à des expérimentations animales dans le respect de l'animal et des textes en vigueur.

Ces TP permettront de former 75 personnes par an (50 formation A, 25 formation B) soit 375 personnes en 5 ans. Un total de 1395 souris sera utilisé sur 5 ans.

Trois procédures sont incluses dans ce projet et se déclinent sous forme de 3 séances de travaux pratiques de 4h chacune. Une séance de travaux dirigés précède la réalisation des procédures et consiste à détailler les gestes (support photo/vidéo) et à sensibiliser les apprenants aux notions d'éthique et réglementation à appliquer. Chaque procédure a été élaborée de façon à s'affranchir de toute souffrance inhérente à l'inexpérience des apprenants. Tous les formateurs sont titulaires de la formation B, utilisent des animaux à des fins scientifiques depuis plus de dix ans et encadrent ces travaux pratiques depuis de nombreuses années.

Remplacement : l'objectif pédagogique de ce projet est l'apprentissage de la manipulation de rat et souris donc par définition il s'agit d'un enseignement par la pratique. Il est donc indispensable d'avoir recours à des animaux vivants. Néanmoins, les souris seront les seuls animaux vivants manipulés. Le modèle de rat ne sera abordé que par supports inertes tels que les mannequins Koken, des photos/vidéos et un écorché anatomique de rat.

Réduction : seuls les gestes de base les plus courants sont pratiqués afin de diminuer le nombre de souris utilisées. Les gestes spécifiques particuliers seront gérés ultérieurement par les responsables de compétences de chaque établissement. Le nombre de souris utilisées a été calculé au plus juste pour satisfaire à la fois à la nécessité de réduction et à l'exigence d'une formation de qualité.

Raffinement : la chronologie des manipulations à enseigner sur les souris est définie de sorte que les gestes les plus délétaires soient réalisés en dernier et que la procédure soit terminale afin de s'affranchir de toute souffrance inhérente à l'inexpérience des apprenants. Tout geste/attitude permettant de s'affranchir ou le cas échéant de limiter au maximum souffrance, stress ou inconfort de l'animal, sera mis en exergue. Avant chaque séance pratique, une séance théorique d'une heure sous forme de photos/vidéo détaillera les gestes qui seront à réaliser.

Les modalités de mise en place et de suivi d'une anesthésie de courte durée seront particulièrement détaillées afin de sensibiliser les futurs expérimentateurs à ces méthodes de raffinement expérimental indispensables dans le domaine. Un encadrant est prévu pour quatre étudiants afin de dispenser un enseignement aussi personnalisé que possible et donc une surveillance rapprochée de chaque animal, chacun réalisant tour à tour les manipulations sous l'œil exercé des formateurs expérimentés.

17730 Ce projet couvre l'ensemble des essais réalisés dans le cadre d'une mise au point de technique ou de formation interne nécessaires à la réalisation des études réalisées dans l'établissement, études pour lesquelles il n'existe pas d'alternative validée scientifiquement, éthiquement et réglementairement à l'utilisation d'animaux. Ces études sont réalisées conformément aux principes éthiques. Tout expérimentateur est amené à acquérir, entretenir ou perfectionner une technique impliquant les modèles animaux. Ce projet est dédié à l'entraînement du personnel sur les gestes nécessaires à la bonne réalisation des procédures expérimentales, sur toutes les espèces présentes dans l'établissement. Ces gestes sont acquis à l'occasion de formations, animées par des formateurs soit internes à l'entreprise (transmission des compétences, tutorat) ou externes (mise au point de technique, harmonisation des méthodes d'administration et de prélèvement etc...). Ce projet s'inscrit dans l'obligation réglementaire décrite dans l'arrêté du 1er février 2013 relatif à l'acquisition et à la validation des compétences des personnels des établissements utilisateurs, élèves et fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques. Il permet de s'assurer et de valider la compétence du personnel.

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

Le type de geste est choisi et adapté en fonction des besoins d'apprentissage et/ou de perfectionnement. Les techniques d'administrations de produits incluent les administrations intrapéritonéale (IP), per os (PO), sous-cutanée (SC), intradermique (ID), intramusculaire (IM), intraveineuse (IV) et se font généralement sur animaux vigiles. Les techniques de prélèvements sanguins se font soit sur animaux vigiles, soit sur animaux anesthésiés, selon la technique et l'espèce, mais toujours en accord avec les recommandations des structures éthiques. L'apprentissage des techniques d'examen se fera généralement sur animaux vigiles et, si nécessaire, sous anesthésie. Les gestes pouvant entraîner un stress particulier seront réalisés sous anesthésie.

Ces mises au point/formations se faisant de manière occasionnelle, les animaux pourront être ré-utilisés, en accord avec les principes de la réglementation et sous contrôle des structures éthiques. Dans de rares cas (par exemple, formation aux méthodes d'euthanasie et/ou prélèvements

d'organes), les animaux seront euthanasiés mais cet apprentissage sera prévu sur des animaux déjà inclus dans un autre projet.

Le projet est prévu pour 5 ans. On peut estimer le nombre d'animaux utilisés chaque année dans le cadre de la formation/entretien de la formation du personnel et/ou mise au point de technique à un maximum de 200 rongeurs, 10 lapins, 10 chiens.

17731 L'implant cochléaire est un dispositif mis en place chez le sujet humain atteint de surdité profonde lorsque les aides auditives classiques (« contours d'oreilles ») ne peuvent plus améliorer l'audition d'un sujet. La population de sujets porteurs d'implants cochléaires est en croissance exponentielle; on l'estime actuellement à plus de 500 000 personnes dans le monde et le million sera atteint d'ici 1-2 ans. La principale limitation de l'implant est que les charges électriques injectées sur chaque électrode peuvent diffuser et contaminer les électrodes voisines. Il est donc nécessaire de limiter la diffusion des courants électriques. L'objectif de ce projet est de tester différentes formes de pulses électriques afin de limiter la diffusion des courant dans la cochlée. Pour cela, il est indispensable de travailler in vivo chez l'animal porteur d'un implant cochléaire, de stimuler son nerf auditif et d'enregistrer les réponses dans le cortex auditif, dernier étage de traitement des informations auditives et le plus relié à la perception. Dans ce projet, prévu pour 5 ans, 90 cobayes (*cavia porcellus*) âgés de 6 mois, 12mois et 24-36 mois seront implantés (30 par âge) afin de valider nos résultats sur des animaux jeunes mais aussi atteints de pertes liées au vieillissement avec des implants cochléaires similaires à ceux utilisés chez l'humain. Le cobaye est le rongeur qui a l'audiogramme le plus proche de l'homme. Sur chaque animal, nous quantifierons les réponses de 50 à 80 neurones au niveau des aires du cortex auditif (primaire et non-primaire) ce qui permettra de diminuer le nombre d'animaux utilisé. Les animaux seront hébergés au sein d'une colonie de 30-50 animaux où ils ont de riches interactions sociales et où ils disposent d'un milieu enrichi (boules à foin et huttes pour y dormir). L'utilisation d'analgésiques et analgésiques locaux lors de la pose de l'implant sous anesthésie générale profonde garantissent l'absence de souffrance pour l'animal. Les réponses physiologiques seront aussi enregistrés sous anesthésie générale ce qui contribuera aussi à réduire l'inconfort des animaux. Toutes des manipulations utilisent des procédures préalablement validées pour lesquelles des point limites ont été clairement établis. Les résultats obtenus permettront de mieux adapter des stratégies de stimulation au degré de surdité afin d'avoir des implants cochléaires plus efficaces pour mimer l'intensité des sons de l'environnement et avoir une meilleure résolution des sons grâce à des électrodes fonctionnant de façon plus indépendante les unes des autres.

17732 Chez l'homme et les rongeurs la prise de décision dépend principalement de deux types d'actions différentes. Les premières sont les actions dirigées vers un but. Dans ce cas, les actions sont intentionnelles et prennent en compte leurs effets. Par exemple, quand il fait nuit dans un nouvel environnement, on cherche où activer l'interrupteur. Les autres actions sont habituelles, nous répondons à des situations familières en utilisant des compétences automatiques. Avec le temps, trouver l'interrupteur dans le noir devient instinctif. Ainsi le cerveau doit décider quand il est approprié de créer et d'utiliser des habitudes ou de rester orienté vers un but. Un dysfonctionnement de l'équilibre entre ces deux stratégies est observé dans des maladies neuropsychiatriques comme les troubles obsessionnels compulsifs (TOC), l'autisme et la toxicomanie. Ces maladies se caractérisent toutes par l'exécution d'actions répétées et difficiles à stopper. D'autre part, les échecs dans l'exécution des habitudes sont des caractéristiques de la maladie de Huntington et de Parkinson.

L'activité du cerveau au moment de la prise de décision et lors d'exécution d'action orientée vers un but ou habituelle n'est pas connue. Pour enregistrer cette activité cérébrale, nous utiliserons une technique d'imagerie innovante qui permet d'observer un large groupe de neurones pendant qu'une souris effectue un comportement. L'intérêt de notre approche est de pouvoir suivre sur le même animal, la formation et le choix des actions en même temps que l'activité des neurones. Pour cela, nous utiliserons un vecteur viral qui permet d'exprimer une protéine fluorescente (les vecteurs utilisés ne sont ni dangereux ni contagieux). Puis un système d'imagerie sera mis en place afin de

pouvoir observer ces neurones fluorescents. Ces deux étapes seront couplés lors d'une chirurgie sous anesthésie générale prenant toutes les précautions pour éviter la souffrance des animaux. Dans cette étude, nous aurons besoin de souris contrôles et des souris transgéniques qui permettent d'identifier des sous-populations neuronales précises. Les modifications génétiques dans les lignées transgéniques utilisées ne perturbent en rien la vie et la santé des animaux.

Notre étude suivra sur plusieurs jours l'animal et apportera de nombreuses informations sur le passage d'une stratégie à l'autre. Enregistrer l'activité des neurones pendant cette transition, nous permettra de construire un modèle dynamique reliant les différentes parties du cerveau au comportement de l'animal. Notre projet en posant les bases du fonctionnement du cerveau en situation normale, nous permettra dans un deuxième temps de décrire des mécanismes défailants associés à des pathologies comme la maladie de Parkinson ou les troubles obsessionnels compulsifs et des proposer des pistes thérapeutiques.

Remplacement: Il n'existe pas de modèle mathématique ou in vitro décrivant les dynamiques des réseaux de neurones lors de la prise de décision. Le travail sur l'animal éveillé est donc indispensable pour comprendre comment le cerveau décide de la stratégie motrice à utiliser. Pour cela, il est nécessaire d'utiliser un modèle animal mammifère afin obtenir des résultats transposables à l'Homme. La souris représente un modèle de choix car le fonctionnement du cerveau et les tests comportementaux utilisés sont similaires à ceux retrouvés chez l'Homme. De plus, de nombreuses lignées transgéniques permettent d'identifier les sous populations de neurones. Enfin, Les structures étudiées ne sont pas présentes chez les invertébrés.

Réduction: la technique d'imagerie utilisée permet d'observer de nombreux neurones simultanément. Le suivi d'un même animal sur plusieurs sessions comportementales permet de diminuer le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir des résultats fiables et diminue la variabilité inter-individuelle. En couplant, notre système d'imagerie avec l'utilisation du virus, nous réduisons fortement le nombre d'échecs lors de la chirurgie. Afin de déterminer le nombre minimal d'animaux pour obtenir des résultats conclusifs, une analyse statistique utilisant des tests de puissance a été effectuée. D'après les données de la littérature et ces analyses, nous estimons utiliser au maximum 140 animaux sur 5 ans.

Raffinement: La douleur sera minimisée lors de la chirurgie par l'utilisation d'anesthésiques et d'analgésiques appropriées. Les implants de contention utilisée pour maintenir l'animal sous le microscope ont été développés afin de réduire leur poids au minimum et sont très bien supportés. Les tests comportementaux n'impliquent pas de stimuli douloureux. Un raffinement est apporté au protocole habituel par l'utilisation d'un système d'imagerie couplé avec l'utilisation du virus. Cette technique permet de réduire le nombre de chirurgies que subira l'animal. En règle général pour motiver les animaux à faire la tâche comportementale, on restreint leur accès à l'eau de boisson. Pour éviter cette étape qui peut générer du stress pour l'animal, nous utiliserons de l'eau légèrement acidifiée. Cela nous permettra de garder l'animal motivé à travailler pour obtenir des récompenses liquides (eau+sucre) sans faire de restriction hydrique. Le bien-être des animaux sera surveillé régulièrement et des critères d'arrêt sont définis si une souffrance ne peut pas être soulagée.

17733 L'effet positif, sur la santé animale (souris) et humaine, de divers probiotiques a été démontré à plusieurs reprises, au niveau de l'amélioration du profil métabolique, mais également au niveau de la réduction de la prise alimentaire et ainsi dans l'aide à la perte de poids.

Les études réalisées chez le chat sont, elles, peu nombreuses. Il a, cependant, été montré que les chats obèses possèdent un microbiote différent de celui des animaux en condition corporelle optimale. Pouvoir modifier le microbiote d'un animal obèse et tenter de rétablir le microbiote d'un animal sain par l'utilisation de probiotiques ajoutés à la ration alimentaire constituerait un outil facilement utilisable dans cette espèce.

Actuellement, au sein de l'Union Européenne, seul un probiotique, *E. faecium* SF68, peut être utilisé chez le chat. D'autres études utilisant des bactéries lactiques ont montré leur intérêt en tant que modulateur de l'immunité et stimulant du transit intestinal chez les chats présentant une constipation chronique.

Cette étude vise à évaluer la tolérance d'un mélange de microorganismes (formule confidentielle), l'absence de toxicité à court terme et l'absence de danger d'un surdosage par rapport à la dose conseillée. Ce genre d'étude est réglementaire avant toute commercialisation (EFSA Journal 2017; 15(10):5021 - p 7).

L'objectif est de montrer la présence, dans les selles, des microorganismes utilisés et s'assurer de la bonne santé des animaux. Une étude ultérieure pourrait réunir des preuves de l'effet thérapeutique du mélange de probiotiques envisagé sur le syndrome métabolique et les problèmes de constipation chez le chat.

Ce projet s'inscrit dans le cadre de la thématique de notre unité de recherche dont un des objectifs est d'identifier des thérapeutiques innovantes afin de lutter contre le syndrome métabolique.

Les chats seront séparés en trois groupes de 4 animaux, et recevront individuellement, chaque matin, durant 28 jours, leur ration quotidienne à laquelle sera ajoutée soit une dose de microorganismes (probiotiques présumés, groupe 1) à la dose efficace soit 10 fois cette dose (groupe 2), soit uniquement leur alimentation (groupe 3).

Pour s'assurer de l'absence de toxicité du mélange, des analyses sanguines (au début et après 28 jours) seront réalisées (biochimie et numération formule) ainsi qu'une analyse de selles.

Ce projet sera réalisé dans le respect de la règle des 3R.

Remplacer : Le chat est l'espèce cible et il n'existe pas de modèle ou moyen alternatif qui ne soit pas in vivo.

Réduire : Le nombre d'animaux est réduit au minimum afin de pouvoir effectuer une analyse statistique descriptive.

Raffiner : Le bien-être des animaux sera surveillé tout au long du protocole par leur observation quotidienne. Les conditions d'hébergement et les méthodes expérimentales utilisées seront les plus adaptées pour réduire toute souffrance et tout dommage que pourraient ressentir les animaux. Les chats seront anesthésiés lors des prises de sang de façon à limiter le stress chez les animaux très craintifs.

17734 L'infection par le cytomégalovirus au cours de la grossesse (CMV) est la principale cause infectieuse de malformations et la deuxième cause de surdité congénitale. Le mécanisme aboutissant à l'apparition d'une surdité chez ces enfants n'est pas encore complètement compris. Le traitement actuel permettant de ralentir la survenue d'une baisse auditive a plusieurs effets secondaires importants qui limitent son utilisation. Une nouvelle molécule semble avoir une efficacité antivirale sans toxicité.

Le but de cette étude est de comparer l'efficacité de cette molécule par rapport au traitement de référence sur un modèle murin dans le contexte d'une infection à CMV.

Chez une femelle gestante sous anesthésie et analgésie (pour limiter la douleur de la femelle gestante), les embryons de souris seront infectés avec le virus murin du CMV (MCMV). A la naissance, les souriceaux seront répartis en 5 groupes en fonction du traitement qu'ils recevront par une injection intra-péritonéale toutes les 12h dès la naissance, pendant 3 semaines (animaux vigiles) : souris témoins non infectées, souris non traitées infectées par le MCMV, souris infectées par le MCMV traitées par le traitement de référence, souris infectées avec le MCMV traitées par la nouvelle molécule, souris infectées recevant diluant seul.

Afin de surveiller la disparition du virus circulant, des échantillons salivaires seront prélevés à la naissance et à 3, 6 et 9 semaines.

L'effet clinique des traitements sera évalué sur la balance bénéfices/effets secondaires et la réalisation de tests auditifs permettant de déterminer les seuils auditifs à 3, 6 et 9 semaines. Les souris des 5 groupes seront euthanasiées à 9 semaines: un examen de l'oreille interne des souris à la recherche de la présence du virus et de ses conséquences sera réalisé.

Dans une étude parallèle, nous explorerons le profil d'élimination de cette molécule dans le sang chez la souris et sa toxicité potentielle: les souriceaux nouveau-nés recevront une injection intra-péritonéale toutes les 12h pendant 2 jours 1/2, puis seront euthanasiés par 2 pour 1 prélèvement

toutes les heures (2 prélèvements/heure, soit 4 animaux/heure) pour évaluer la concentration de la molécule dans le sang à différents moments. Cela nous permettra d'évaluer le rapport efficacité / toxicité des différentes molécules. Cette étude est la première à évaluer la pertinence de ces nouvelles molécules antivirales dans la prévention de la surdité dans l'infection congénitale à MCMV.

Le nombre de souris nécessaires est de 28 femelles gestantes et 116 souriceaux (144 animaux) sur 2 années. Les femelles seront euthanasiées une fois le sevrage obtenu.

Règle des 3 R :

- Remplacer : compte-tenu de la spécificité d'espèce du virus et de la complexité de structure de l'oreille interne, et en particulier du vestibule, le recours à l'animal est nécessaire ; il n'est pas possible de remplacer ce modèle animal par d'autres modèles ni par des méthodes alternatives ni substitutives. Les souris utilisées ne sont pas génétiquement modifiées, sans phénotypes dommageables.

- Réduction : L'infection des embryons entraîne une résorption des souriceaux in utero. Nous avons défini qu'il fallait un minimum de 12 souriceaux par sous-groupe, soit au total 60 souris nées infectées pour l'étude thérapeutique. Les autres animaux (8 femelles et 56 souriceaux) seront destinés à l'étude pharmacologique de la molécule.

- Raffiner : Le suivi clinique quotidien permettra d'évaluer la douleur à l'aide d'une grille de scoring prenant en compte l'apparence, l'abreuvement et l'alimentation, l'examen clinique, le comportement naturel, le comportement provoqué chez la souris gestante injectée et des souriceaux. Cette grille de score basée sur des points limites suffisamment précoces et prédictifs permettra de proposer une action pour réduire la douleur ou qui aboutira à l'euthanasie de l'animal. Les souris seront hébergées dans une animalerie calme, bénéficieront d'enrichissement dans leur cage et seront surveillées quotidiennement. Lors des procédures douloureuses ou tests auditifs, ils seront anesthésiés. Un traitement analgésique sera administré avant les gestes invasifs si nécessaire. Ils seront réchauffés à la suite des procédures d'injection.

17735 1- Intitulé du projet : Système sérotoninergique et symptômes non moteurs de la maladie de Parkinson : Poursuite de l'Etude sur le modèle primate non humain exposé à la MDMA

2- Durée du projet (en mois) : 60

3- Mots-clés (maximum 5) : Maladie de Parkinson, Modèles animaux, symptômes non-moteurs.

4- Finalité du projet : Recherche fondamentale

5- Objectifs et bénéfices escomptés du projet :

La maladie de Parkinson est caractérisée par la perte de neurones dopaminergiques entraînant l'expression de symptômes moteurs dont la triade est bien connue : akinésie, rigidité et tremblement. D'autres systèmes de neurotransmission dégénèrent, tel que le système sérotoninergique et l'atteinte de ce système pourrait être impliquée dans le développement de symptômes non-moteurs comme les troubles psychocomportementaux. Les objectifs principaux de ce projet, développé sur un modèle animal de la maladie de Parkinson, sont donc de déterminer l'influence d'une lésion sérotoninergique par rapport à une lésion dopaminergique sur l'expression des symptômes non-moteurs, avec ou sans traitement dopaminergique antiparkinsonien. Notre hypothèse est que l'état d'intégrité du système sérotoninergique a un impact sur les symptômes de nature psychiatrique, tels que les troubles du contrôle des impulsions. L'étude des bases physiopathologiques de ces troubles chez l'animal devrait révéler de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles pour les contrecarrer.

6- Nuisances prévues :

Les animaux utilisés (n= 10) seront des singes macaques fascicularis mâles. Ils seront soumis à une seule procédure avec deux lots d'animaux, un lot avec lésion dopaminergique incluant 5 animaux et un lot avec lésion sérotoninergique incluant 5 animaux également. La procédure appelée « Modèle animal de troubles de nature psychiatrique dans la maladie de Parkinson » durera entre 8 et 12 mois selon le lot concerné et comprendra plusieurs phases (comportement, imagerie

par tomographie à émission de positons, lésion, traitement pharmacologique). Deux agents neurotoxiques sont utilisés pour modéliser la dégénérescence des systèmes dopaminergique ou sérotoninergique de la maladie de Parkinson. L'un d'eux peut entraîner une perte de poids et une mobilité réduite, mais ces effets ne devraient pas durer plus d'un mois. En fin de procédure, les animaux seront mis à mort car leurs cerveaux seront prélevés pour pouvoir vérifier l'étendue des lésions et corrélérer la sévérité de ces lésions aux résultats obtenus en imagerie et en comportement. La procédure est donc de classe sans réveil.

7- Application de la règle des «trois R»

1. Remplacement

Il n'y a pas d'alternatives non animales disponibles dans ce domaine qui touche une pathologie neurologique.

2. Réduction

Le nombre minimal d'animaux prévu pour ce projet a été déterminé grâce à nos études précédentes qui ont montré que des comparaisons de données d'imagerie ou comportementale entre deux états (avant et après une lésion ou un traitement pharmacologique) au sein d'un même groupe (où chaque animal est son propre contrôle) sont fiables et peuvent être effectuées avec 4 à 5 singes par groupe. Par sécurité, un ensemble de 10 animaux est prévu (5 par groupe).

3. Raffinement

Des mesures de raffinement seront prises en compte sur toute la durée de ce projet pour réduire au minimum les effets sur le bien-être des animaux. Ces mesures sont par exemple d'entraîner les animaux par renforcement positif le plus souvent possible, de surveiller de façon accrue et de sécuriser les animaux lors des anesthésies et des réveils, de prévenir ou veiller à l'apparition de toute douleur, angoisse ou symptôme particulier, d'augmenter l'enrichissement dans les cages, de favoriser les contacts sociaux.

17736 L'objectif de ce projet est d'évaluer une nouvelle stratégie thérapeutique pour réduire les dommages du foie que l'on observe dans deux situations cliniques importantes et pour lesquelles aucun traitement spécifique n'existe à ce jour, qui sont l'ischémie-reperfusion hépatique (IRH) et l'intoxication au paracétamol (acétaminophène ou APAP).

L'IRH est un phénomène inévitable de la chirurgie hépatique (transplantation, ablation d'une partie du foie contenant une tumeur, . . .) dans lequel les dommages sont initiés au cours de l'hypoxie (arrêt de la circulation sanguine), cependant ceux-ci sont paradoxalement exacerbés après le rétablissement de l'apport sanguin (reperfusion). Ces lésions constituent une cause fréquente de rejet de greffe et de mauvaise fonction du foie qui affectent la mortalité.

Le paracétamol (acétaminophène) est l'une des principales causes d'intoxication médicamenteuse et de décès liés à des intoxications. L'intoxication au paracétamol représente la première cause d'insuffisance hépatique aiguë. En vente libre, ce médicament se distingue par la rareté de ses effets indésirables aux doses thérapeutiques. Néanmoins, il existe un risque sérieux et souvent sous-estimé de toxicité du foie en cas d'ingestion massive unique ou répétée.

Les lésions d'IRH et d'intoxication au paracétamol entraînent une dysfonction de la mitochondrie qui peut provoquer la mort cellulaire. Ce processus est régulé par une protéine spécifique : la cyclophiline D. L'objectif de ce projet vise à déterminer si une nouvelle famille d'inhibiteur de cyclophilines, les SMCypl, peuvent représenter une stratégie thérapeutique dans le contexte de l'IRH et de l'intoxication au paracétamol.

Dans ce projet, nous proposons d'utiliser deux modèles animaux :

- un modèle d'IRH chez la souris induit en arrêtant la circulation sanguine arrivant au foie à l'aide d'une pince (ischémie du foie) puis la reperfusion du foie sera initiée par retrait de la pince. Le foie et le sang seront prélevés à différents temps (6, 24, 48 et 72 heures) après la reperfusion du foie pour étudier différents paramètres : la mort cellulaire et l'inflammation. Certains animaux subiront une laparotomie (ouverture de l'abdomen sans clampage, groupe contrôle), certains animaux

recevront un inhibiteur de cyclophilines afin d'évaluer sa capacité à protéger des lésions d'IRH (groupe traité).

- un modèle d'intoxication au paracétamol induite par une injection unique d'acétaminophène (APAP). Le foie et le sang seront prélevés à différents temps (6, 24, 48 et 72 heures) après le traitement APAP pour étudier différents paramètres : la mort cellulaire et l'inflammation. Certains animaux recevront le diluant de l'APAP (groupe contrôle), certains animaux recevront un inhibiteur de cyclophilines afin d'évaluer sa capacité à protéger des lésions d'intoxication à l'APAP (groupe traité).

Le nombre de souris engagées dans ces expériences est évalué à 2280 sur 5 ans dans l'hypothèse où toutes les expériences sont réalisées.

Ce protocole a été pensé en suivant la règle des 3 R « Remplacer, Réduire, Raffiner » :

- Le nombre de souris a été réduit à celui requis pour obtenir une validation statistique des résultats. De plus, afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, les molécules seront screenées in vitro et seules celles qui se seront révélées efficaces in vitro seront testées chez l'animal.

- Les douleurs liées à la chirurgie dans le modèle IRH sont réduites par une administration sous-cutanée d'un puissant antalgique, le Temgésic (Buprénorphine 50 µg/kg). Nous n'attendons pas de souffrance particulière chez les souris soumises au protocole d'administration de l'APAP. En effet, l'hépatite est souvent asymptomatique chez le patient. Dans les deux modèles, nous effectuerons un suivi quotidien des souris tout au long du protocole en observant leur comportement et les indices pouvant suggérer une douleur. Si nous observons une douleur chez un animal, cela entraînerait son euthanasie anticipée. Par ailleurs, les animaux sont hébergés en présence de papier kraft et de carrées de coton pour faire le nid, ainsi que des maisonnettes et des dômes en cellulose.

- Nous avons recours à des animaux quand il n'y a pas de méthodes alternatives. En effet, dans un premier temps, les molécules seront screenées in vitro pour préselectionner les molécules efficaces. Dans un second temps, nous avons recours à des animaux car il n'existe aucun moyen de remplacer une telle étude dans laquelle la réponse physiopathologique étudiée met en jeu plusieurs types cellulaires (hépatocytes et cellules immunitaires).

17737 La polykystose rénale autosomique dominante (PKRAD) est une maladie génétique affectant une personne sur 1000. Elle est responsable de 10% des cas d'insuffisance rénale chronique terminale, nécessitant le recours à la dialyse ou à la transplantation rénale, deux procédures lourdes et coûteuses. La PKRAD est caractérisée par le développement progressif de multiples kystes dans les tubules rénaux, entraînant la destruction progressive du tissu rénal. Actuellement, aucun traitement ne permet de bloquer efficacement la formation des kystes et de ralentir la progression de la maladie.

Les mécanismes responsables de la formation de ces kystes dans les reins sont encore mal compris. La membrane basale tubulaire (MBT) est une membrane fibreuse qui enveloppe les tubules rénaux, dont elle détermine la rigidité et ainsi la capacité des tubules à se déformer en réponse à un étirement.

Les souris porteuses de la même mutation génétique que les patients atteints de polykystose rénale développent des kystes rénaux de manière progressive. Néanmoins, des données récentes montrent que les tubules subissent une dilatation majeure et rapide après une obstruction des voies urinaires chez la souris porteuse de cette mutation, suivie d'un développement explosif des kystes rénaux. Ces données suggèrent donc qu'une diminution de la rigidité de la MBT pourrait être à l'origine de la dilatation des tubules, et in fine, de la formation des kystes rénaux.

D'autre part, l'inactivation spécifique d'une enzyme entraîne une diminution de la rigidité de la MBT chez la souris.

L'objectif de cette étude est de déterminer si la diminution de la rigidité de la MBT est responsable de la formation des kystes rénaux. Pour cela, des souris génétiquement modifiées n'exprimant plus le gène responsable de la polykystose rénale ainsi que cette enzyme spécifique seront utilisées.

Elles seront également soumises à une obstruction des voies urinaires. Le nombre maximum d'animaux utilisés pour cette recherche est de 680 souris sur 5 ans.

Divers examens d'immunomarquages, de microscopie électronique et analyse de la rigidité de la MBT seront réalisés sur les reins après leur prélèvement à différents temps.

La formation des kystes est issue de mécanismes complexes faisant intervenir différentes cellules ainsi que des modifications de l'architecture rénale qui ne peut être reproduit in vitro. Il est donc nécessaire d'avoir recours à des modèles animaux principalement murins, car la souris est le seul animal pour lequel nous disposons actuellement d'un modèle de PKRAD impliquant les mêmes gènes qu'en pathologie humaine.

La règle des « 3R » sera appliquée au cours de cette étude.

Pour réduire le nombre d'animaux, nous avons estimé la taille des échantillons permettant une analyse statistique efficace.

Afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux souris, les conditions d'élevage et d'expérimentation ont été raffinées :

- La chirurgie sera réalisée sous anesthésie générale profonde, surveillée régulièrement afin de garantir une sédation optimale, et analgésie préalable ; des antalgiques en période pré et post-opératoire
- Les procédures seront raffinées par l'emploi de points limites précoces spécifiques, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire
- Les souris seront hébergées en cage ventilée à 5 souris par cage et leur environnement sera enrichi par du coton, maisonnettes et tunnels ainsi que des bâtonnets de bois à ronger.

Enfin, l'analyse des mécanismes à l'origine des modifications de la MBT se fera en première intention à l'aide de modèles in vitro remplaçant le recours à l'expérimentation animale.

En établissant le lien existant entre remaniement de la MBT et formation des kystes, ce projet devrait déboucher, à terme, sur de nouvelles approches thérapeutiques dédiées aux patients atteints de polykystose rénale.

17738 Les écosystèmes d'eau douces sont soumis à de nombreuses contraintes environnementales, d'origine naturelle ou anthropique, de nature très diverse (changement de température, modifications hydrodynamiques, composition physico-chimique...). Ces différentes contraintes vont particulièrement impacter les organismes vivant dans cet écosystème. Les poissons d'eau douce sont directement affectés par ces modifications environnementales, en terme de populations, de nombre d'espèce, mais également au niveau individuel. En effet, de nombreuses études cherchent à évaluer les conséquences de la pression environnementale au niveau populationnel (suivis de population, estimation de la biomasse...) mais au final, relativement peu de recherches sont menées sur les conséquences directes au niveau individuel, et la plupart sont réalisées sur les salmonidés (truite et saumon). Le projet qui suit, s'intéresse de fait, à pallier ce manque d'informations en étudiant différents modèles de poissons d'eau douce. Afin de ne pas impacter la faune sauvage, les espèces modèles que sont le poisson-zèbre (*Danio rerio*) et le poisson rouge (*Carassius auratus*) seront utilisées dans un premier temps, pour profiter de l'énorme somme de connaissances déjà acquise sur ces organismes. Le but de ce projet est donc de caractériser les conséquences de différentes contraintes environnementales sur les paramètres physiologiques des poissons d'eau douce et plus particulièrement étudier les relations entre performances musculaires in vivo (nage, métabolisme) et les capacités bioénergétiques cellulaires (respiration et efficacité mitochondriale) de chaque espèce. Au niveau expérimental, l'étude va porter sur des contraintes abiotiques naturellement rencontrées telles que 1) les variations de concentration en oxygène (hypoxie chronique et aigue) ou 2) en ions (régulation osmotique), {Modification du 20/01/2021 ou de température (vague de chaleur)} ou liées plus directement à l'anthropisation, telles que 3) les variations d'intensité lumineuse (1 lux, 20 lux ou 500 lux). Un effectif total de {Modification du 20/01/2021, 480} poissons (220 poissons rouges et {Modification du 20/01/2021, 260} poissons zèbres) est nécessaire et suffisant pour permettre d'obtenir des résultats scientifiquement robustes.

Le nombre de poissons de chaque espèce varie car les 2 espèces ne seront pas soumises à chaque condition. Chaque groupe expérimental sera cependant composé de 20 poissons, nombre d'individus minimum pour s'affranchir de la variabilité interindividuelle, relativement importante notamment au niveau des performances de nage. Que ce soit la partie in vivo, via l'utilisation de tunnels de nage homologués, ou les mesures in vitro, l'ensemble des procédures seront réalisées grâce à du matériel de pointe récemment acquis par le laboratoire. Les protocoles suivent la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner) : - Remplacer : Ces études, qui visent à relier métabolisme énergétique in-vivo et in-vitro, doivent être réalisés sur des animaux. - Réduire : le nombre d'individus utilisé a été réduit au minimum afin de permettre d'obtenir des résultats statistiquement appropriés aux objectifs. - Raffiner : Les différents protocoles (métabolisme in-vivo, performances de nage et bioénergétique cellulaire) sont bien établis chez les poissons et maîtrisés au laboratoire. L'objectif des protocoles est de limiter au minimum la souffrance et le stress des animaux. Chaque geste contraignant (mesure et placement des poissons dans les tunnels de nage) sera réalisé sous anesthésie légère, suivi par un temps d'acclimatation de 12h. Les poissons seront à l'abri de toute nuisance visuelle et sonore pendant la récupération et les expériences. Cela permet d'obtenir des mesures physiologiques valides et fiables, qui ne sont pas influencées par un état de souffrance, stress ou agitation de l'animal. Au niveau des expériences de bioénergétique, les individus seront euthanasiés selon la méthode préconisée par le CNRS. Une attention particulière sera portée sur les poissons non euthanasiés qui seront replacés après validation par les services vétérinaires.

17739 Ce projet de type répétitif concerne l'évaluation de la sécurité des produits pharmaceutiques, produits d'hygiène ou compléments alimentaires vétérinaires destinés à être administrés aux animaux.

Suivant la directive 2001/82/EC et amendements, ainsi que la ligne directrice VICH GL43, la sécurité des produits pharmaceutiques vétérinaires doit être testée entre autres critères afin d'évaluer leur toxicité potentielle sur les espèces de destination, ou sur les modèles permettant d'obtenir des résultats préliminaires concernant le produit étudié. Ces études prévoient l'évaluation de la tolérance systémique et/ou locale, en général suivant la voie d'administration et à la posologie préconisée, mais aussi en surdosage et/ou durant une période de traitement allongée de manière à évaluer la marge de sécurité du produit et les effets indésirables d'un surdosage.

De plus, des essais préliminaires de sélections de formulations ou de dosage pour des produits en développement ou des études sur des produits commercialisés peuvent être justifiés.

Lors de ces études, les animaux sont suivis de manière régulière sur le plan général et des examens ou analyses complémentaires peuvent être réalisés. L'espèce, le nombre d'animaux, la voie d'administration et la dose seront justifiées pour chaque étude. En l'absence de données sur le produit dans l'espèce de destination, un seul animal est testé dans un premier temps. En l'absence d'effets indésirables, les autres animaux sont testés.

Des points limites sont mis en place précocement et spécifiquement pour chaque étude. Les animaux auront accès à des enrichissements du milieu spécifiques à l'espèce.

Le nombre d'animaux estimé pour la période de 5 ans est de 800. Les espèces pouvant être sélectionnées pour ces études sont les carnivores domestiques et les rongeurs. Toutes les mesures sont prises pour respecter la règle des 3R : remplacement (recherche de méthodes alternatives), réduction (justification du nombre d'animaux, utilisation du test statistique le plus approprié, réutilisation des animaux), et raffinement (acclimatation des animaux, présence d'enrichissements et de périodes de jeux, mise en place de méthodes pour éviter ou atténuer la souffrance, l'inconfort et l'angoisse, détermination de points limites en fonction des études, méthodes d'euthanasies adaptées).

17740 Les maladies rénales chroniques affectent environ 5% de la population. Ces affections sont caractérisées par des lésions persistantes des reins qui tendent à s'aggraver au cours du temps, nécessitant, lorsque la fonction rénale est trop altérée, le recours à la dialyse ou à la transplantation rénale. La polykystose rénale est une maladie génétique responsable à elle seule de 10% des cas d'insuffisance rénale terminale alors que les pathologies entraînant une obstruction des voies

urinaires représentent une cause fréquente de maladie rénale chronique chez l'enfant. Les mécanismes responsables de la détérioration du rein dans ces deux affections sont encore mal compris notamment en raison de l'implication de différents types cellulaires et d'altérations structurales qui ne sont pas modélisables in vitro. Il est par contre établi que l'inflammation joue un rôle important dans ces deux affections. Un facteur sécrété favorisant l'inflammation est induit précocement dans les cellules rénales, que ce soit au cours de la polykystose rénale qu'en réponse à l'obstruction de l'arbre urinaire, mais son rôle est inconnu.

Compte tenu de l'existence de traitement susceptible d'inhiber ce facteur sécrété chez l'homme, il apparaît important de déterminer si cette molécule joue un rôle significatif au cours des maladies rénales chroniques.

A l'heure actuelle, seul le recours à des modèles animaux est à même de répondre à cette question de façon fiable et aucun modèle de substitution fiable permettant d'étudier la formation des kystes ou la détérioration du parenchyme rénal n'a été établi.

L'objectif de cette étude qui utilisera un nombre maximum de 560 souris sur 5 ans est de répondre à cette question en utilisant des souris génétiquement modifiées n'exprimant plus ce facteur sécrété afin d'analyser le rôle de cette molécule à la fois dans un modèle d'obstruction de l'arbre urinaire et dans un modèle de polykystose rénale.

La règle des « 3R » sera appliquée au cours de cette étude.

Pour réduire le nombre d'animaux, nous avons estimé la taille des échantillons permettant une analyse statistique efficace. Afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux souris, les conditions d'élevage et d'expérimentation ont été raffinées :

- la chirurgie sera réalisée sous anesthésie générale profonde et analgésie préalable ; des antalgiques sont prévus en post-opératoire
- des points-limites ont par ailleurs été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.
- les souris seront hébergées en cage ventilée à 5 souris par cage et leur environnement sera enrichi par du coton, maisonnettes et tunnels ainsi que des bâtonnets de bois à ronger.

Enfin l'analyse des mécanismes de régulation du facteur sécrété se fera à l'aide de modèles in vitro remplaçant le recours à l'expérimentation animale.

En permettant de mieux comprendre le rôle de ce facteur sécrété dans les maladies rénales chroniques, ce projet est susceptible de déboucher sur de nouvelles approches thérapeutiques dédiées aux patients atteints de ces affections.

17741 De nombreux candidats médicaments développés sont des anticorps monoclonaux présentant une réactivité limitée à l'espèce humaine. Dans ce cas, leur évaluation pré-clinique doit se faire in vitro et in vivo dans des modèles de souris dites "humanisées". L'objectif de ce projet est de proposer l'utilisation d'un nouveau modèle de rongeurs "humanisés": le rat. Ce qui permettra d'effectuer des prélèvements et d'avoir des modèles d'études de la réponse immunitaire humaine qui n'était pas possible à l'heure actuelle. Il s'agit de rats reconstitués avec des cellules hématopoïétiques humaines (originaires de la moëlle ou de sang). In vivo, la réponse des cellules immunitaires humaines peut alors être étudiée en absence ou en présence d'une stimulation antigénique ou d'une greffe de tissu humain. Ce modèle pourra représenter une alternative solide à l'utilisation de primates en recherche pré-clinique.

Nous souhaitons donc mettre en place et par la suite effectuer l'étude de différents anticorps dans ces modèles de rats reconstitués par des cellules hématopoïétiques humaines ce qui nous permettra d'étudier les mécanismes impliqués dans la réponse immune à la transplantation. Ce modèle permettra l'étude de nouvelles molécules immunomodulatrices, ayant comme finalité la découverte de nouvelles thérapies actives sur le système immunitaire humain.

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

- Remplacer: Des études fonctionnelles in vitro ont été réalisées au préalable sur les différents anticorps ou molécules immunomodulatrices pouvant être utilisées. Mais du fait de l'absence du

contexte physiologique et de la complexité du système immunitaire, ces études ne peuvent remplacer les études in vivo.

Il est donc nécessaire de tester l'efficacité immunorégulatrice de ces molécules dans des modèles in vivo proche de l'homme. Une alternative solide à l'utilisation de primates en recherche préclinique pourra être le modèle de rats dits "humanisés".

-Réduire: le nombre d'animaux a été réduit à 189 rats femelles et mâles, nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Le nombre de groupe a été réfléchi de sorte à avoir les contrôles suffisants pour pouvoir conclure quant aux résultats obtenus.

- Raffiner: Un suivi clinique et comportemental des animaux (poils hérissés, dos voûté, agressivité. . .) sera réalisé. De plus, les animaux atteignant une perte de poids de 20% par rapport à leur poids le plus élevé, ceux-ci seront euthanasiés ainsi que les animaux montrant des signes caractéristiques d'un mal être tel qu'un changement de comportement. De plus, afin de réduire l'anxiété, un produit d'enrichissement (igloo en PVC) sera utilisée et placée dans des cages en portoirs ventilées. Durant le protocole, une surveillance quotidienne des animaux sera effectuée pour leur poids, leur comportement et des prélèvements sanguins seront effectués toute les semaines à compter de la semaine 8 suivant l'injection des cellules hématopoïétiques afin de valider la persistance des cellules humaines chez les rats "humanisés". Les animaux contrôles et injectés avec des anticorps seront analysés afin d'obtenir un maximum d'information post-mortem: par immunohistologie pour étudier la migration des cellules injectées et leurs mécanismes d'action.

La validation de molécules dans ce modèle préclinique de rats humanisés pourra être une étape essentielle avant les tests cliniques.

17742 Le développement récent des thérapies ciblées et de l'immunothérapie a permis d'améliorer considérablement la prise en charge des patients atteints de mélanome avancé. Pour autant, certains patients ne répondent pas à ces traitements et rechutent en raison de la plasticité des cellules tumorales et de l'apparition de mécanismes de résistance. L'un des enjeux majeurs de la cancérologie cutanée pour les années à venir est donc d'identifier de nouvelles cibles/stratégies thérapeutiques permettant d'optimiser ces traitements et d'éviter les récives. Plusieurs études récentes suggèrent que des médicaments, initialement prévus pour lutter contre l'hypertension artérielle, pourrait également agir contre les cellules tumorales de mélanome en interférant avec leur potentiel métastatique et leur capacité à échapper à la surveillance immunitaire. Notre projet a pour ambition d'explorer cette piste de recherche originale et d'établir les preuves de concept précliniques de l'intérêt thérapeutique d'un repositionnement de ces médicaments pour augmenter l'efficacité des traitements actuels du mélanome métastatique cutané.

Pour mener à bien cette étude, nous réaliserons une seule procédure expérimentale pour un total de 280 souris. La stratégie a déjà été validée in vitro. Afin de connaître le potentiel de cette stratégie, il est à présent obligatoire de transposer ce concept sur des modèles animaux. Afin de pouvoir étudier notre stratégie thérapeutique chez des animaux, nous ne sommes pas capables de remplacer l'expérimentation animale sur souris par d'autres alternatives in vitro (remplacer). Les molécules que nous étudierons dans cette expérience sont toutes utilisées cliniquement et ont, par conséquent, toutes déjà été évaluées chez l'animal. Les données recueillies lors de ces précédentes expériences ont été utilisées pour affiner au mieux les procédures expérimentales. La « Règle des 3R » établie par Russel et Burch, a été prise en compte afin de réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaires à l'expérimentation tout en assurant un nombre suffisant permettant une étude convaincante qui ne nécessitera pas de reproduire ces expériences (réduire). Les conditions d'expérimentation et d'élevage sont optimisées (groupe de 5 souris, nid, etc) afin de s'assurer du bien-être des animaux tout au long des procédures expérimentales (raffiner). Au niveau expérimental, afin de réduire le stress des animaux généré par les expérimentations, nous utiliserons des anesthésiques afin d'endormir les animaux. Ceux ci seront également disposés sur tapis chauffant pendant l'expérimentation afin d'éviter toute variation de température corporelle. Nous serons également vigilant à ce que les piqûres ne se fassent pas toujours au même endroit mais à des sites distincts et distants.

Tout au long de la procédure, les animaux seront observés. Une grille d'évaluation des signes cliniques sera réalisée pour chaque individu de l'étude afin de suivre le plus précisément possible l'évolution de l'état de santé de chaque animal individuellement. Dans l'hypothèse d'apparitions de signes de douleurs, un traitement à base d'antalgique sera mis en place jusqu'à disparition de ceux-ci.

17743 Le tissu adipeux est un régulateur majeur de la balance énergétique en contribuant au stockage des graisses et à la production de chaleur. Le tissu adipeux blanc, situé dans les régions sous-cutanées et au niveau viscéral, est essentiellement composé d'adipocytes blancs. Il permet d'accumuler l'excès d'énergie sous forme d'acides gras. Le tissu adipeux brun se situe essentiellement dans la région dorsale chez les rongeurs et est composé d'adipocytes bruns qui dissipent l'énergie sous forme de chaleur. Récemment, des adipocytes bruns ont été découverts au sein du tissu adipeux blanc, principalement dans la région sous-cutanée. Ces adipocytes "beiges" partagent des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles avec les adipocytes bruns, comme la production de chaleur. Lors d'une exposition prolongée au froid, le nombre d'adipocytes beiges augmente, réduisant la masse de graisse. Au contraire, le vieillissement conduit à une perte des adipocytes beiges, contribuant à la prise de poids. Cependant, les mécanismes conduisant à la diminution des adipocytes beiges demeurent méconnus.

Les androgènes comme la testostérone sont des hormones impliquées dans le contrôle de la masse musculaire, le métabolisme et le développement des caractères sexuels. Leurs effets sont relayés par le récepteur des androgènes (AR) qui contrôle l'expression de gènes cibles. Des études ont montré que la testostérone diminue la masse adipeuse chez les sportifs en augmentant la thermogénèse. À l'inverse, les hommes âgés présentant un déficit en testostérone prennent du poids du fait de l'accumulation de graisse blanche. Dans des modèles cellulaires d'adipocytes, les androgènes empêchent l'accumulation des graisses. Ces observations montrent que les androgènes peuvent être liés à la thermogénèse et au maintien des adipocytes beiges avec l'âge.

Ce projet vise à connaître le rôle des androgènes via leur récepteur dans le développement et le maintien des adipocytes beiges. Pour ce faire, nous réaliserons des études histologiques sur le tissu adipeux de souris adultes, analyserons l'expression de gènes cibles de AR et déterminerons les conséquences métaboliques par des analyses non-invasives comme la mesure du poids, du glucose, ou de la température en présence ou absence d'androgènes et de leur récepteur. Ces études seront menées chez des souris nourries avec une alimentation classique pour déterminer les effets du vieillissement ou riche en graisses, 2 conditions qui vont diminuer le nombre d'adipocytes beiges, et chez des souris pour lesquelles le nombre d'adipocytes beiges sera stimulé par une exposition au froid ou par un composé pharmacologique.

Les résultats de cette étude pourront à terme de générer des composés pharmaceutiques pour traiter les patients atteints d'obésité.

REMPACEMENT: Du fait que les modèles cellulaires actuels ne peuvent pas récapituler la présence d'adipocytes beiges au sein du tissu adipeux blanc et que ce-dernier est régulé par divers facteurs comme le stress, l'état nutritionnel ou certaines hormones, notamment les androgènes, l'utilisation d'un modèle animal est nécessaire pour mimer le plus fidèlement possible l'organisme humain. C'est pourquoi nous avons choisi de travailler sur la souris, animal pour lequel l'histologie et la fonction du tissu adipeux sont semblables à l'homme, et pour lequel nous disposons des outils moléculaires nécessaires pour mener à bien cette étude.

REDUCTION: De nombreuses études menées au laboratoire sur le tissu adipeux de la souris ont apporté une bonne connaissance du modèle et de la méthodologie à utiliser, permettant ainsi la mise en place d'expérimentations de qualité et raffinées sur un nombre limité de cohortes, et la réduction du nombre d'animaux utilisés au strict minimum. Des souris ayant subi des expériences non invasives telles que la mesure des niveaux de glucose seront réutilisées pour d'autres tests comme la mesure du poids ou de la température. Ces mêmes animaux seront ensuite utilisés pour les études histologiques et moléculaires.

RAFFINEMENT: Le traitement aux androgènes pouvant avoir des conséquences sur le bien-être de l'animal, celui-ci sera effectué sous anesthésie et des mesures seront prises pour éviter la souffrance de l'animal (utilisation d'analgésique, complémentation de l'eau de boisson en sel, suivi du réveil après anesthésie...). Les souris seront placées sur un support chauffant afin d'éviter toute déperdition de chaleur causée par l'anesthésie et seront suivies dans les heures suivant leur réveil. Le risque d'infection sera pris en considération au niveau de la zone d'administration des composés. Le projet ciblant le tissu adipeux, la potentielle déperdition de poids sera suivie. Lors de l'exposition au froid (10 jours à 10°C), le poids et la température souris seront examinés régulièrement. Afin d'éviter de trop grandes variations dans les mécanismes d'adaptation au froid, les animaux seront placés dans des cages individuelles comprenant litière et nids. Les souris sont bien adaptées au froid, leur température corporelle pouvant descendre de 37°C à 34°C lors d'un test au froid. Néanmoins, tout animal dont la température corporelle chuterait en dessous des 34°C, montrant son incapacité à s'adapter au froid, sera sorti de l'étude et pourra être utilisé dans le cadre de l'étude sur le vieillissement.

Nous analyserons 2 lignées de souris, l'une ciblant l'ensemble des adipocytes et l'autre ciblant spécifiquement les adipocytes bruns et beiges, pour lesquelles 15 souris fondatrices seront nécessaires. Afin d'effectuer des analyses statistiques solides, chaque procédure expérimentale sera réalisée sur des groupes de 10 souris contrôles et 10 souris mutantes, à l'exception du régime riche en graisse pour lequel 15 animaux seront nécessaires du fait de l'importante variabilité.

L'étude du maintien des adipocytes beiges au cours du vieillissement nécessitera des analyses à 3 temps distincts: à l'âge 9 semaines auquel les adipocytes beiges sont abondants, à 15 semaines, âge auquel les adipocytes beiges sont convertis en adipocytes blancs, et à 30 semaines afin de déterminer les conséquences métaboliques. Nous aurons ainsi besoin de 60 souris, fois les trois temps d'analyse, soit 180 souris.

L'étude du maintien des adipocytes beiges sous alimentation riche en graisses nécessitera 90 souris, fois deux car les analyses seront faites à 2 et 5 semaines post-traitement, soit 180 souris. L'étude du développement des adipocytes beiges au froid nécessitera 60 souris, et celle sur la stimulation des adipocytes beiges par un composé pharmacologique 120 souris. L'ensemble de ces études requerra ainsi 555 animaux sur cinq ans.

17744 La myopathie centronucléaire est une maladie qui affecte les muscles. En général, les patients présentent une faiblesse, une diminution de la force, des difficultés à respirer et le début des symptômes peut survenir de la petite enfance à l'âge adulte. La diversité de la maladie peut être due à de nombreux facteurs, certains encore à l'étude, mais aussi au fait que de nombreuses mutations sont à l'origine de la myopathie centronucléaire. En ce sens, l'étude des modèles animaux porteurs de ces différentes mutations est un outil important pour mieux comprendre les mécanismes de la maladie. A ce jour, aucun traitement spécifique n'est disponible et cette étude pourrait déboucher sur de nouvelle thérapie ciblée.

Une étude préliminaire, réalisée sur des cellules, montre que cette méthode est efficace et ouvre de nouvelles perspectives possibles sur l'animal, bien que ses applications dans les organismes restent encore mal comprises. Le but de ce projet est de tester l'application de l'édition de gènes chez des souris qui ne sont pas porteuses de maladie et, après validation, de traiter éventuellement un modèle murin de myopathie centronucléaire. Ainsi, cette application de l'édition de gènes sur l'animal fait l'objet de cette étude et par conséquent impossible de le remplacer (REPLACEMENT).

Le nombre d'animaux sera réduit au maximum pour obtenir une puissance statistique suffisante pour évaluer l'efficacité de cette méthode et les muscles tibials antérieurs gauche et droit seront étudiés. Un maximum de 10 souris seront nécessaires pour conclure sur cette mise au point (REDUCTION).

Pour ce projet préliminaire, des injections de virus adéno-associé seront réalisés sur des animaux sains et non génétiquement modifiés afin de générer la mutation. Les animaux seront surveillés quotidiennement et tout signe de douleur sera pris en charge en prenant les mesures appropriées

en fonction du niveau de douleur observé (soit un analgésique sera administré, soit les animaux seront euthanasiés prématurément si nécessaire) (RAFFINEMENT).

17745 L'ostéosarcome est la première cause de tumeurs malignes primitives de l'os, chez les adolescents et jeunes adultes. Après les progrès majeurs apportés par la chimiothérapie dans les années 70-80, la survie depuis les années 90 n'a été que peu améliorée et reste autour de 60-70% à 5 ans. La présence de métastases et la mauvaise réponse aux traitements standards par chimiothérapie se sont révélées être les facteurs pronostiques majeurs de risque de récurrence. Dans l'ostéosarcome, les récurrences sont habituellement métastatiques et le plus souvent localisées au niveau pulmonaire. Le traitement actuel est une combinaison de chirurgie et de chimiothérapie, mais le pronostic reste médiocre en raison de la chimiorésistance et des métastases précoces. L'ensemble de ces données soulignent l'importance de comprendre les principes moléculaires permettant à ce type de tumeurs de contourner l'effet anti-tumoral des chimiothérapies et aboutir à ces récurrences métastatiques et à la résistance au traitement.

Nous avons identifié récemment dans notre laboratoire des marqueurs de mauvais pronostic pour l'ostéosarcome, et des voies régulées par celui-ci. Une activation de cette voie a été observée uniquement chez des patients aux mauvais pronostics (groupe associé à une survie diminuée, ou présentant plusieurs caractéristiques en faveur d'une agressivité tumorale). Notre objectif est d'explorer cette voie comme cible thérapeutique dans l'ostéosarcome.

Nous utiliserons les modèles bioluminescents implantés chez la souris, développés dans notre laboratoire, notamment un panel de lignées d'ostéosarcome résistantes à la chimiothérapie habituelle (méthotrexate et doxorubicine) développé *in vitro*, et leurs lignées parentales, modifiées génétiquement pour une répression ou une surexpression du gène identifié. Compte tenu de la disponibilité illimitée du matériel cellulaire et la possibilité de manipulation ce matériel cellulaire nous permet de proposer les modèles expérimentaux plus utiles. Plusieurs points seront évalués avec ce projet, notamment : 1. l'expression de la voie identifiée avec l'analyse bioinformatique, dans les cellules tumorales parentales et résistantes à la chimiothérapie, 2. l'effet de la surexpression ou répression du gène identifié 3. la sensibilité de ces modèles d'ostéosarcome à des molécules modulant cette voie soit par des antagonistes, soit par des agonistes *in vivo*. Enfin, nous étudierons les mécanismes d'action du gène identifié et de ces molécules, bien aussi leur intérêt thérapeutique sur des ostéosarcomes de mauvais pronostic, dès la prise en charge initiale.

Dans ce projet, nous envisageons d'implanter 28 lignées différentes qui regroupent l'ensemble des modifications liées à la voie de régulation étudiée. Ces lignées ont été rendues bioluminescentes ce qui permet d'optimiser le suivi de la croissance tumorale ainsi que l'apparition d'éventuelles métastases. Chaque modèle sera implanté chez la souris puis traité avec des molécules antagonistes et agonistes du gène d'intérêt pour étudier les facteurs modifiés par la modulation de cette voie chez les patients de mauvais pronostic. Nous souhaitons démontrer que le gène d'intérêt peut être utilisé à la fois comme marqueur de diagnostic et comme cible thérapeutique. Il est actuellement impossible de remplacer les modèles expérimentaux *in vivo* par des méthodes alternatives car elles ne traduisent pas fidèlement le développement de la maladie et particulièrement le micro-environnement complexe nécessaire à ce type de tumeur. D'autre part, la réponse au traitement implique souvent différents systèmes au sein de l'organisme qui ne peuvent pas être reproduits *in vitro* (dont le système immunitaire).

De façon à réduire le nombre d'animaux, une étude préliminaire *in vivo* sera réalisée pour choisir la concentration optimale de l'antagoniste sur les lignées non modifiées, pour ça, nous injecterons 5 souris par lignée et utiliserons 2 doses (préalablement définies *in vitro*), seront nécessaires 70 souris. Nos résultats *in vitro* nous permettront aussi de définir les modèles cellulaires et les groupes de traitement les plus pertinents. Compte-tenu du taux de prise estimé de chacun des modèles (50%), l'étude fonctionnelle/thérapeutique nécessitera de 1680 souris). La croissance tumorale et développement métastatique des modèles seront suivis par bioluminescence afin de raffiner le suivi expérimental (détection des tumeurs très précocement à de petites tailles) et de réduire le nombre d'animaux. Tous les moyens seront mis en œuvre pour améliorer le bien-être des animaux pendant l'étude. Toutes les injections seront réalisées après application d'un anesthésique local, les

chirurgies seront réalisées sous anesthésie générale et les animaux recevront un analgésique post-opératoire et tout au long du développement de la maladie si nécessaire. Les souris seront hébergées en groupe et l'environnement sera enrichi avec un enrichissement adapté. Ce projet utilisera un total maximal de 1750 animaux.

17746 Dans les processus inflammatoires de type « orage cytokinique », tels que ce qui est observé chez les patients COVID-19, peu ou pas de médicament efficace n'est aujourd'hui disponible.

Notre équipe a développé une molécule de synthèse, que nous appellerons Mx ; cette molécule réduit l'inflammation dans des modèles représentatifs de septicémies et de ces « orages cytokiniques » que l'on retrouve dans plusieurs pathologies. A des doses efficaces, cette nouvelle classe de molécules n'induit aucune toxicité dans des cellules humaines en culture. Par ailleurs, dans une expérience préliminaire sur un modèle de choc septique déclenché à la suite d'une infection bactérienne chez la souris, notre molécule Mx s'est montrée très efficace et avec des symptômes modérés par rapport à la molécule de référence.

Ainsi, nous souhaitons valider l'activité biologique de notre molécule la plus puissante dans un modèle murin d'inflammation induite par le LPS, une molécule connue pour induire l'inflammation et stimuler l'activation des cellules immunitaires.

Nous allons dans un premier temps définir la dose efficace de LPS afin d'induire ce choc, établir les doses efficaces de la molécule Mx et la comparer à une molécule anti-inflammatoire de référence, la metformine.

Ensuite nous allons étudier l'efficacité de la molécule Mx sur la survie des souris et comparer les résultats à la molécule de référence. Nous analyserons également le profil des protéines dit cytokines (jouant un rôle dans l'inflammation) sous LPS dans le plasma des souris traitées par la molécule Mx.

Tout au long des expériences nous allons éviter autant que possible la souffrance des animaux par une surveillance régulière et rapprochée ; les points limites sont définis de façon à éviter rapidement toute douleur ou stress aux animaux.

L'effet bénéfique escompté est une augmentation significative de la survie des souris permettant d'envisager une nouvelle approche thérapeutique dans les complications sévères des maladies telles que l'infection au coronavirus SARS-CoV-2.

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

Remplacement : nous avons dans un premier temps réalisé des expériences in vitro qui nous ont permis d'étudier le mécanisme d'action de la molécule ; mais seul un modèle vivant tel que la souris, récapitulant la complexité de vivant permettra de vérifier l'efficacité thérapeutique des molécules d'intérêt et leur effet sur l'inflammation et sa régulation.

Réduction : Pour ces expériences nous avons besoin de 119 souris sur 2 ans. Ce nombre est le minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement significatifs.

Raffinement : les animaux sont observés dès leur entrée dans l'étude. Les points limites sont établis dans le respect du bien-être des animaux et afin d'éviter au maximum la douleur et leur stress.

17747 Avec un nombre croissant de patients diagnostiqués, les maladies inflammatoires de l'intestin (MICI) constituent un défi sanitaire majeur. Bien que la cause précise des MICI reste inconnue, le rôle d'une réponse immunitaire aberrante contre les bactéries intestinales est soupçonné. Cette réponse pourrait être déclenchée par des substances chimiques présentes dans l'environnement. Parmi ces substances, les désinfectants tels que les ammoniums quaternaires couramment utilisés sous forme de mélanges dans les secteurs de l'alimentation et de la santé, sont mis en cause. Ainsi, ce projet vise à déterminer si l'exposition répétée aux mélanges des résidus de ces désinfectants, contribuerait à la perturbation des bactéries intestinales ou à une augmentation de la perméabilité intestinale accompagnés d'une inflammation, qui sont des mécanismes impliqués dans la survenue des MICI.

Nous proposons d'étudier la relation entre désinfectant à base d'ammoniums quaternaires et MICI grâce à deux procédures expérimentales. Une première procédure, réalisée chez des rats conventionnels permettra d'établir le lien entre la dose reçue et l'évolution des indicateurs mesurés. Cette procédure comportera 4 groupes de 6 rats, chaque groupe recevant une administration journalière par voie orale de différentes doses de désinfectants pendant une semaine (dont un groupe contrôle recevant la solution aqueuse sans désinfectants).

Dans la deuxième procédure, l'impact sur les MICI sera étudié à l'aide de trois groupes de 7 rats qui à l'origine sont exempts de tout micro-organismes (rats axéniques) et hébergés dans des isolateurs stériles. Ces rats recevront des bactéries fécales humaines afin d'obtenir un modèle mimant ce qui se déroule chez l'Homme. Après 3 semaines d'implantation et de stabilisation des bactéries, ces rats dits à flore humanisée, recevront les désinfectants quotidiennement par voie orale, pendant un mois de traitement afin de mimer une exposition chronique. Chaque groupe recevra une dose de désinfectants différentes et le choix des doses sera affiné grâce aux résultats de la première procédure. Un échantillonnage bi-hebdomadaire régulier des fèces de chaque rat durant le traitement permettra d'analyser les populations bactériennes ainsi que les concentrations en désinfectants. Un échantillonnage de sang hebdomadaire permettra de quantifier les concentrations plasmatiques de désinfectants. Le dernier jour de traitement une administration orale de marqueurs de la perméabilité intestinale suivi d'une série de prélèvements sanguins consécutifs permettront d'évaluer ce critère. Un prélèvement de tissu intestinal sera effectué à la fin de l'expérimentation, après mise à mort des rats, afin de déterminer les caractéristiques inflammatoires de la muqueuse.

Ces études permettront d'évaluer les effets des désinfectants en comparant les observations faites chez le lot contrôle et celles faites chez les lots recevant les différentes doses de désinfectants. Une comparaison sera également faite entre les lots recevant les désinfectants pour voir s'il existe une influence de la dose. L'ensemble de ces données est également nécessaire pour tenter de développer un modèle mathématique permettant de décrire le lien entre l'évolution temporelle des concentrations en désinfectant dans l'intestin et les effets sur l'évolution des bactéries et de la barrière intestinales. Au total 45 animaux seront utilisés.

Concernant le respect des principes des 3R dans ce projet :

1-Remplacement : à l'heure actuelle, il n'existe pas de modèle cellulaire suffisamment performant permettant de reproduire l'environnement complexe du tube digestif humain in vitro. Le modèle rat à flore humanisé est un modèle pertinent pour étudier l'influence de substances sur les processus associés aux bactéries et MICI. La première procédure sur rats conventionnels est nécessaire à l'élaboration de la seconde procédure sur ces rats à flore humanisée. Le modèle mathématique devrait permettre par la suite de simuler d'autres scénarios d'exposition à ces désinfectants sans recours supplémentaire à l'expérimentation animale.

2-Réduction : les effectifs de rats ont été calculés de manière à avoir une garantie statistique suffisante tout en réduisant au mieux le nombre d'animaux en fonction des variables étudiées.

3-Raffinement : Les administrations par voie orale seront effectuées par du personnel expérimenté et habitué à manipuler en isolateurs stériles. Les animaux seront hébergés sur litières dans des boîtes en polypropylène, en respectant les normes du bien-être animal. Ils auront accès à la nourriture et à l'eau à volonté. Un enrichissement de l'environnement est prévu avec des jouets (balles, hamac).

17748 Les cellules cancéreuses ont la particularité de recruter les vaisseaux sanguins afin de promouvoir et soutenir le développement tumoral et sa progression grâce à l'apport d'oxygène et de nutriments. Des traitements, dits anti-angiogéniques, inhibent le réseau vasculaire tumoral et ralentissent la progression de certains cancers. Néanmoins, ils induisent des résistances qui entraînent fréquemment des récives métastatiques. Il a récemment été montré grâce à des modèles cancéreux chez la souris que le système nerveux est également sollicité dans le contrôle du développement des tumeurs primaires et des métastases. L'innervation intra-tumorale provient en partie d'un processus de neurogénèse par lequel des progéniteurs neuronaux, qui proviennent

d'une zone neurogénique du cerveau où ils s'y différencient pour former des neurones, migrent au travers de la barrière hémato-encéphalique (BHE) perméabilisée vers la circulation pour atteindre la tumeur dans laquelle ils se différencient en neurones. Chez l'Homme, l'agressivité des tumeurs prostatiques et leur évolution clinique sont significativement associées au degré d'innervation du cancer.

Ce projet a pour but d'étudier le dialogue entre le système nerveux central (SNC) et une tumeur périphérique, ce qui n'a jamais été étudié jusqu'à présent par les communautés scientifiques du cancer et de neuroscience, apportant une vision différente du développement du cancer.

Nous proposons d'étudier le développement conjoint des nerfs et des vaisseaux intra-tumoraux et leurs rôles dans la formation de tumeurs. Les mécanismes de la neurogénèse tumorale seront étudiés par l'étude de la migration de progéniteurs neuronaux du (SNC) vers la tumeur, selon les étapes décrites ci-dessous :

1/ Les progéniteurs neuronaux centraux seront visualisés lors de leur migration grâce à une protéine fluorescente exprimée de façon endogène par manipulation génétique de leur génome.

2/ Nous étudierons la migration des progéniteurs neuronaux à travers la BHE par imagerie par résonance magnétique (IRM), tomographie par émission de positons (TEP) ou par l'injection intra-veineuse de protéines fluorescentes.

3/ Le rôle des nerfs dans la formation des vaisseaux sanguins intra-tumoraux à différents stades du développement de la tumeur sera défini et le rôle des voies de signalisation nerveuses sur le développement de la tumeur et sa résistance aux thérapies anti-angiogéniques sera étudié.

Aucune modélisation in vitro ne permet d'appréhender le développement concomitant des nerfs et des vaisseaux en 3D au sein d'une tumeur. La modélisation du processus cancéreux chez la souris permet de révéler des mécanismes cérébraux qui contrôlent le développement des tumeurs périphériques et apporte des données sur le dialogue entre le cerveau et la tumeur, à ce jour inaccessibles in vitro. L'utilisation de modèles animaux est donc nécessaire pour tester et valider nos hypothèses de travail avant la réalisation d'essais cliniques chez l'Homme. Comme dans nos études déjà publiées, nous utiliserons des modèles murins du cancer de la prostate et du sein afin de valider nos hypothèses de travail dans une diversité de modèles qui miment le développement tumoral humain.

Nous utiliserons au maximum 5360 rongeurs sur 5 ans, nés et élevés dans un établissement agréé. Ce nombre correspond au minimum nécessaire, dans chacun des groupes expérimentaux, pour vérifier les hypothèses scientifiques posées et valider les résultats d'un point de vue statistique. L'ensemble des protocoles expérimentaux a été conçu pour minimiser les effets indésirables et la détresse des animaux :

- Les animaux seront hébergés dans une zone protégée et silencieuse dédiée à ce projet, en groupe de 5 individus par cage. Leur environnement est enrichi afin de maintenir leur bien-être tout au long de l'expérimentation.

- Les prélèvements de sang, les actes chirurgicaux et les tatouages seront effectués sous anesthésie.

- Le développement tumoral et sa progression seront suivis sous anesthésie générale par imagerie bioluminescente, IRM et TEP. Ces systèmes d'imagerie non invasifs permettent d'accéder à des données en temps réel et de diminuer le nombre d'animaux grâce à un suivi longitudinal.

- Des critères d'arrêt sont également prévus sous le contrôle du vétérinaire de l'établissement, afin d'éviter toute souffrance des animaux et déviance des protocoles.

17749 Les déficits immunitaires combinés sévères aussi appelé DICS sont des maladies qui relèvent des priorités en matière de santé publique. En effet, l'incidence annuelle globale de ces maladies (nombre de malades) est aujourd'hui d'1/50 000 naissances. Les DICS, sont des maladies du système immunitaire qui se manifeste dès le plus jeune âge avec des symptômes tel qu'un retard de croissance (poids et taille) ou des infections graves à répétitions. En effet, les personnes touchées sont soit démunies de système immunitaire, soit possèdent un système immunitaire altéré

et ne sont donc pas capables de se défendre efficacement contre les infections. Le traitement principal de ces maladies est la reconstitution d'un nouveau système immunitaire via la transplantation de cellules progénitrices hématopoïétiques (anciennement appelé greffe de moelle osseuse). Bien qu'efficace, ces traitements sont cependant limités notamment par la disponibilité en donneur compatible (nécessaires pour limiter les risques de rejet de la greffe), mais également par le temps nécessaire à la reconstitution du système de défense. En particulier la génération d'un nombre suffisant de cellules T, cellules au centre de nos défenses contre les infections, restent trop long. Durant cette période, les patients restent susceptibles au développement d'infections opportunistes et donc au risque de mourir.

Notre équipe s'intéresse au développement de nouvelles approches thérapeutiques pour ces maladies et a émis l'hypothèse qu'un ciblage direct du thymus, l'organe permettant la génération des cellules T, permettrait de contourner certaines de ces limites. Des études précédentes de notre laboratoire ont montré le potentiel de cette approche dans un modèle spécifiques de souris immunodéficientes (lié à un déficit en protéine tyrosine kinase ZAP-70). Afin de progresser vers la translation de ces résultats vers la clinique il est maintenant important de comprendre les mécanismes supportant cette efficacité et de les évaluer dans d'autres modèles d'immunodéficiences. Ce projet suit la règle des 3R et nécessitera au total l'utilisation de 5879 souris.

Remplacer : le projet proposé ici s'intéresse à l'optimisation des traitements d'immunodéficiences par des approches de thérapie cellulaire. Ces questions requièrent l'analyse au cours du temps du développement et de la différenciation de différentes cellules sanguines et ne peuvent donc à ce jour être abordées que dans des modèles in vivo.

Réduire : Le nombre d'animaux nécessaire à notre projet est calculé au plus juste sur la base de nos résultats précédents. Ainsi, pour chaque procédure, nous avons estimé le nombre d'animaux requis, en fonction du degré de variabilité expérimentale de nos procédures et du résultat attendu. Cette estimation a également été effectuée en fonction des tests statistiques utilisés et après vérification de la puissance statistique (logiciel G*power, puissance >80% et $p < 0,05\%$).

Raffiner : La taille des groupes sera optimisée comme précédemment décrit et les groupes contrôles seront partagés dès que possible. Les procédures expérimentales seront effectuées dans le respect du bien-être animal avec anesthésie préalable et traitement de la douleur dès apparition des premiers signes. Un enrichissement (cabane, coton, etc) est également ajouté dans les cages.

17750 La phéromone apaisante de lapin (RAP = Rabbit Appeasing Pheromone) appartient à la famille de phéromones apaisantes d'origine maternelle, les apaisines. Elle a des effets sur le comportement (lapins moins stressés, plus calmes) et la production (la fertilité et le taux de survie des jeunes sont améliorés). Le bien-être des lapins de compagnie est un domaine d'intérêt croissant en Europe. Les facteurs de stress potentiels comprennent la manipulation et les stimuli courants qui provoquent la peur : une nouvelle cage, un nouvel emplacement, un nouveau lapin, voyager en voiture, visiter le vétérinaire, etc. peuvent potentiellement provoquer des sentiments de stress. Le but du projet est d'étudier les bienfaits de l'analogue synthétique de la Rabbit Appeasing Pheromone (RAP) dans des conditions de laboratoire contrôlées sur un groupe de lapin de race New Zealand White (NZW) représentant un modèle du lapin de compagnie. Le projet vise à inclure différentes situations connues pour être source de stress pour le lapin, par exemple : l'arrivée dans un nouvel environnement auquel s'adapter ; les manipulations, l'anesthésie, hospitalisation et récupération d'une chirurgie chez le vétérinaire. Les premières expériences prévues dans le projet sont (en ordre chronologique) l'étude des effets de la RAP sur le stress provoqué par : 1) un nouvel environnement ; 2) les manipulations du vétérinaire lors d'un examen, anesthésie, récupération d'une chirurgie mineure. Ces premières études sont prévues sur un groupe de lapin NZW dont la rentrée dans l'animalerie se fait pour d'autres finalités scientifiques (déjà autorisées). La rentrée d'un nouveau lot d'animaux permet en fait d'étudier les premiers jours d'adaptation à un environnement inconnu (nouvel endroit, nouvelles cages, nouvelles habitudes, nouveau personnel) ; ensuite, les procédures impliquant des anesthésies et des biopsies (appartenant à un autre projet et déjà autorisées) fournissent des situations idéales pour étudier les effets de la RAP dans ces situations. La forme

galénique de l'analogue synthétique de la phéromone apaisante de lapin (RAP) est un liquide de 1 ml appliqué sur la peau des animaux, entre les omoplates (application « pour-on ») ; le produit étant volatil, le lapin devient son propre diffuseur et il peut ainsi capter la phéromone à travers l'organe voméronasal. Le produit est diffusé par l'animal pendant 48h donc une application tous les deux jours est préconisée. Lors de ces études, la formulation de la phéromone « pour-on » qui est ici utilisée pour la première fois, est également analysée. Cette formulation « pour-on » permet à l'animal de faire face à une situation de stress ponctuelle (comme la consultation vétérinaire) ou chronique, en renouvelant le produit régulièrement. Pour la première étude (effets de la RAP sur l'adaptation à un environnement inconnu) les lapins, dès leur arrivée à l'animalerie, sont répartis en deux salles identiques. Un groupe de lapin reçoit la phéromone et l'autre le placebo. Les lapins sont logés individuellement pour que la prise alimentaire (l'un des paramètres inclus dans le test) de chaque sujet soit analysée ; les cages sont proches et grillagées donc les animaux peuvent se voir, s'entendre et se sentir. Les cages contiennent une litière absorbante, une plateforme pour s'abriter ou s'allonger dessus, un bâtonnet en bois à ronger ; l'aliment et l'eau sont fournis ad libitum. Les paramètres analysés sont plusieurs et visant à détecter un stress de nature chronique et/ou un état d'anxiété : les paramètres physiologiques sont obtenus grâce à des prises de sang permettant d'étudier les différentes populations cellulaires (ratio neutrophiles sur lymphocytes) et les taux de glucose et protéines totales ; les paramètres comportementaux sont relevés à travers l'observation du lapin placé pendant 10' minutes dans une zone neutre (aréna) où le lapin est seul, en présence d'un objet inconnu, en présence d'une personne. Les paramètres zootechniques comprennent la santé, morbidité, mortalité, prise alimentaire et la croissance. Les paramètres sont des mesures répétées pour évaluer les effets de la phéromone, et donc la performance de chaque lapin, au cours du temps (23 jours). Pour la deuxième étude (effets de la RAP sur les manipulations du vétérinaire lors d'un examen, anesthésie, récupération d'une chirurgie) 8 lapins reçoivent la phéromone et 8 lapins le placebo avant d'être manipulés par le vétérinaire en prévision d'une anesthésie suivie par une biopsie nasale ; cette chirurgie mineure est un bon modèle car représente un acte courant chez le lapin de compagnie en médecine vétérinaire. Les lapins sont observés pendant 10 jours après la chirurgie, donc le traitement est renouvelé. Les paramètres comportementaux de cette étude visent à évaluer le niveau de stress et de peur ou, au contraire, le calme et la facilité de manipulation de l'animal lors de la visite et de l'injection des produits anesthésiant ; la qualité de l'anesthésie est évaluée à travers l'évaluation de la qualité du sommeil, les valeurs de fréquence cardiaque et la qualité/rapidité du réveil ; la qualité de la récupération post chirurgie est évaluée en analysant la prise alimentaire, fonctionnalité digestive et les paramètres comportementaux. Une prise de sang est effectuée sur lapin avant d'être manipulé (baseline), après 2 jours et après 10 jours pour analyser les populations cellulaires sanguines (ratio neutrophiles sur lymphocytes).

17751 Le bar est un poisson dont le sexe est déterminé par une combinaison d'effets génétiques et environnementaux, au premier rang desquels la température. Il est classiquement admis qu'un élevage à moins de 17°C pendant les 60 premiers jours de vie favorise le sexe femelle. Cependant, nous avons montré récemment qu'une température de 16°C à des phases plus tardives (90-244 jours) induisait au contraire une masculinisation des animaux. Il est important de mieux comprendre ce phénomène, d'une part pour mieux anticiper les réponses des populations de bar au changement climatique, et d'autre part pour mieux contrôler la proportion des deux sexes en aquaculture, où l'on se retrouve parfois devant le cas problématique de ne pas avoir de mâles ou de femelles dans un lot de poisson, et donc de ne pouvoir produire la génération suivante.

L'objectif de cette expérimentation est d'évaluer les effets sur le sex-ratio de l'exposition à une gamme de températures chaudes (19, 21, 23 et 25°C) à la suite d'un élevage à 16°C de 0 à 70 jours, à deux photopériodes correspondant aux mois de janvier et mars, dont une étude préliminaire suggère qu'elles peuvent avoir également un impact sur le sex-ratio du bar. Notre objectif est de pouvoir faire des recommandations aux éleveurs de bar pour améliorer le contrôle des sex-ratios, et également de mieux anticiper les effets du changement climatique.

Le projet utilisera deux répétitions de 160 poissons pour chaque combinaison photopériode/profil thermique. Le nombre total de poissons mesurés et prélevés sera de 2580. Les 160 poissons par

réplicat tiennent compte du nombre minimal (150) pour obtenir une estimation fiable du sex-ratio dans chaque réplicat (Réduction) et des prélèvements (10) qui seront effectués pour analyses physiologiques. Raffinement: les changements de température seront progressifs (1°C/jour) et toutes les manipulations (mesure, marquage) faites sur les poissons le seront sous anesthésie. Remplacement: Il n'y a pas à ce jour de méthode alternative pour évaluer l'effet de facteurs externes (température, photopériode) sur un phénomène aussi complexe que le déterminisme du sexe chez cette espèce.

17752 L'objectif du projet est d'essayer de mettre en place une méthode fiable et précise permettant de différencier les stades de développement des œufs de bars européens sans avoir à manipuler les poissons.

En aquaculture, les reproductions de poissons se font essentiellement de façon artificielle, avec une récupération des ovocytes femelles puis une reproduction artificielle avec des spermatozoïdes des mâles. Afin que cette reproduction se passe le mieux possible et que les œufs produits soient de bonne qualité, il est nécessaire d'avoir des ovocytes au bon stade de développement. A l'heure actuelle, la seule méthode permettant d'évaluer le stade de développement des ovocytes est de réaliser régulièrement un prélèvement interne par voie naturelle : un prélèvement et une observation minutieuse de quelques ovocytes sur chaque femelle permet d'évaluer le stade de développement des ovocytes. Cela implique l'anesthésie, la manutention et le prélèvement des poissons régulièrement (plusieurs fois par an lors de la période de ponte), les stades de développement des ovocytes évoluant assez rapidement mais étant variable d'une femelle à l'autre. L'objectif est donc de développer cette nouvelle méthode de bio-impédance, permettant de suivre les stades de développement des ovocytes sans avoir besoin de manipuler, anesthésier et prélever les poissons. En effet, une fois le système validé et mis en place (ne nécessitant qu'une seule anesthésie), il ne serait alors plus nécessaire de réaliser des manipulations sur les poissons pour suivre le développement ovocytaire et cela sur plusieurs années.

L'objectif de cette étude est d'évaluer les liens entre les stades de développement des ovocytes et leurs réponses suite à un stimuli électrique (ce qu'on appelle la bio-impédance, qui mesure les propriétés électriques de tissus biologiques). Pour ce faire, les femelles seront prélevées pour quelques ovocytes (comme dans les procédures classiques d'évaluation des stades de développement des ovocytes) et des stimuli électriques seront réalisés sur ces ovocytes. Les mesures acquises par cette technique seront comparées avec les mesures de stades de développement classiques pour évaluer les relations entre ces caractères.

Le projet a été établi pour prendre en compte la règle des 3R.

Réduction : lors de ce travail, les ovocytes de 70 femelles seront prélevés et pour chaque prélèvement, plusieurs mesures et stimuli électriques seront réalisés, permettant de réduire le nombre de poissons prélevés. Les effectifs ont été calculés à partir des connaissances que nous avons acquises par la bibliographie.

Ce protocole ne comporte pas de Remplacement, l'utilisation d'animaux est nécessaire, l'objectif étant de permettre le développement d'une méthode non invasive de mesure de développement des ovocytes.

Pour réduire la souffrance et l'angoisse, les animaux sont manipulés uniquement sous anesthésie pour toutes les mesures individuelles et sont disposés dans des aquariums leur permettant de nager librement (Raffinement).

17753 Le glioblastome est une tumeur cérébrale actuellement incurable malgré un traitement combinant chirurgie, chimiothérapie et radiothérapie, ce qui nécessite de trouver urgemment de nouvelles solutions thérapeutiques. Un facteur limitant l'efficacité des traitements existants pour le glioblastome est la présence de cellules tumorales qui ne répondent pas aux agents chimiothérapeutiques (cellules chimiorésistantes). Nous avons démontré au laboratoire l'innocuité et l'internalisation des nanoparticules métalliques (NP), sur plusieurs lignées cellulaires cancéreuses in vitro ainsi que chez la souris. Il a par ailleurs été démontré qu'une stimulation

lumineuse (par laser) de ces nanoparticules provoque localement au niveau de la tumeur une élévation de la température induisant un effet antitumoral (thérapie par photothermie). Cette hyperthermie locale peut être monitorée de manière non invasive de façon à induire un traitement antitumoral sans douleur ou effet secondaire chez l'animal.

Dans ce projet, nous souhaiterions évaluer l'efficacité des NP de titane chez l'animal (souris nude) porteur d'une tumeur de glioblastome sous-cutanées et orthotopique (donc avec tumeur cérébrale). Les NP seront directement administrées dans la tumeur et activées par stimulation photothermique afin de réduire la croissance des tumeurs.

Le projet sera divisé en deux étapes. La première étape sera un étude pilote sur deux modèles différents (1. 1 modèle sous-cutané; 1. 2 modèle orthotopique) sur 2 conditions de traitement (12 souris x 2: 24 souris au total). Le but de cette phase sera de collecter des informations sur l'augmentation de température au niveau tumoral et sur l'efficacité de la photothermie par rapport aux souris non traitées. Si la photothermie n'a aucun effet, le projet prendra fin. En cas contraire, on procèdera à la deuxième étape du projet (modèle sous-cutané). Dans cette deuxième étape on aura 4 conditions de traitement (10 souris par groupe): 1) non traités, 2) NP, 3) laser, 4) NP + laser. Le but de cette étape sera l'évaluation de l'effet antitumoral par photothermie par rapport aux trois groupes contrôles. Si cette deuxième étape donne des réponses favorables, on procédera à l'évaluation de l'effet antitumoral sur modèle orthotopique (procédures prévues dans le cadre d'une autre demande d'autorisation, déjà approuvé).

Au total, un maximum de 64 souris est prévu pour la globalité de l'étude. Dans le respect de la règle des 3R (réduction, raffinement et remplacement), le nombre d'animaux prévu est minimum et suffisant dans chaque groupe. Il est basé sur un calcul d'effectif permettant de prédire que nous avons 80% de chance d'arriver à un résultat statistiquement significatif. Pour le bien-être de l'animal, les souris seront hébergées selon les normes requises avec un enrichissement (copeaux de bois, dômes) et en groupes de 4 ou 5 individus par cage (cages de 365x205x140 cm, 530 cm²) afin d'éviter le stress de l'isolement. Outre l'anesthésie générale durant toutes les procédures expérimentales (injection des cellules tumorales, administration des traitements et irradiation laser), nous prévoyons d'administrer de l'analgésie en pré- et post-opératoire si nécessaire. Après la greffe nous suivrons la progression de la pathologie en mesurant leur poids et la taille de la tumeur minimum 3 fois par semaine depuis son apparition (pour les tumeurs sous-cutanées). Les souris seront observées quotidiennement, en observant tout changement dans leur comportement ou l'apparition de signes cliniques de mal-être (posture, prostration, difficultés à se déplacer et à s'alimenter, déshydratation, ataxie) en nous appuyant sur une grille d'évaluation de la douleur. Lorsque les souris présenteront un volume tumoral ≥ 800 mm³, une perte de poids supérieure ou égale à 20% du poids maximum de l'animal (masse tumorale déduite) ou si des signes cliniques apparaissent, les animaux seront mis à mort sans délai.

En conclusion, l'objectif de ce projet est, après validation in vitro, de vérifier que les Ti-NP induisent une augmentation de la température après irradiation par laser chez la souris. En plus, on veut évaluer l'efficacité anti-cancéreuse de cette photothermie. Cette étape de validation in vivo est indispensable avant toute évaluation clinique chez le patient. Il n'existe à l'heure actuelle, aucune autre méthode qui pourrait se substituer à l'expérimentation animale dans ce domaine.

17754 La recherche médicale en endocrinologie, en cardiologie, en oncologie et dans bien d'autres domaines fait appel à des modèles animaux qui prévoient des interventions chirurgicales. La chirurgie est un domaine d'expertise qui fait appel à la dextérité du chirurgien et à une bonne planification des gestes, ainsi qu'à une bonne organisation de l'équipe qui aide le chirurgien. D'autre part, pour obtenir des résultats expérimentaux comparables, les chirurgies des animaux doivent être effectuées de façon identique, en réalisant les mêmes gestes, afin de pouvoir comparer les animaux les uns avec les autres. La qualité de la chirurgie, sa préparation et sa répétabilité peuvent nécessiter le recours à des animaux vivants sous anesthésie générale pour que le chirurgien s'entraîne et peaufine tous les détails de ses procédures. Evidemment, ce travail sur animaux vivants fait suite à des entraînements sur du matériel inerte, des pièces anatomiques, voire des corps d'animaux morts, issus d'autres projets expérimentaux.

Dans le cadre de ces mises au point et entraînements, nous pensons recourir à l'animal aussi rarement que possible. Cependant, en fonction de notre activité et des demandes qui nous seront faites par les équipes de recherche, nous pensons utiliser sur les 5 ans qui viennent 800 rongeurs, 100 lagomorphes, 20 chiens, 20 furets, 100 porcs/miniporcs et 40 ruminants. Si notre activité est inférieure, nous n'utiliserons pas la totalité des animaux prévus. Toutes les phases de mise au point et entraînement seront effectuées avec des animaux anesthésiés, avec une couverture analgésique importante. Les chirurgies seront réalisées par des vétérinaires spécialistes de ce domaine et dans un environnement très bien équipé pour le soin et l'anesthésie des animaux. Dans la plus grande majorité des cas, les animaux ne seront pas réveillés. Il s'agira, autant que possible d'animaux déjà utilisés à des fins scientifiques dans d'autres projets, et pour lesquels il est nécessaire de procéder à une euthanasie. Dans ce cas, à l'occasion de cette fin d'étude, les animaux seraient utilisés pour le projet de cette demande, afin de réduire le nombre d'animaux utilisés. Si les animaux sont acquis spécifiquement pour notre projet, ils seront tout d'abord acclimatés, hébergés en groupes sociaux avec un hébergement adapté à leurs besoins physiologiques et manipulés par du personnels formés.

17755 Dans le cadre de la recherche et développement de médicaments vétérinaires, l'innocuité et la tolérance des candidats médicaments doivent être évaluées pour déterminer la sécurité d'utilisation du produit chez l'espèce cible.

L'objectif du projet est de réaliser des études de tolérance chez l'animal de rente, dans le respect du bien-être animal et de la règle des 3Rs, pour pouvoir établir le profil de tolérance du produit en développement. Plusieurs études de tolérance pourront être requises pour établir le profil tolérance d'un produit et définir une dose, selon l'état d'avancement du développement du produit.

L'espèce cible du présent projet est l'animal de rente (bovin, porc, ovin, caprin), jeune ou adulte. Le projet inclura plusieurs études de tolérance, en administration unique ou répétée. Le nombre d'animaux inclus dans chaque étude sera déterminé selon la nature du produit testé, le stade d'avancement du développement du produit et la finalité de l'étude (exemples : étude pilote, réglementaire), le nombre de voie d'administration à tester, et dans le respect des textes réglementaires correspondants en vigueur. Le nombre total d'animaux sur la durée de vie du projet n'excèdera pas 800 animaux pour chacune des espèces cibles (bovin, porc, ovin, caprin).

Le projet est conçu pour être répété en totalité ou partiellement. Il vise à caractériser la tolérance de nouveaux produits chez l'animal de rente, sans compromettre l'atteinte de l'objectif et dans le respect du bien-être animal et des principes de remplacement, de réduction et de raffinement, et d'indicateurs précoces, dans une expérimentation animale, de toute souffrance ; ces derniers sont définis selon une grille d'évaluation élaborée (et régulièrement revue) conjointement par la structure chargée du bien-être animal, le comité d'éthique et les expérimentateurs.

- les études réglementaires sont réalisées séquentiellement afin d'obtenir toutes les informations scientifiques nécessaires tout en minimisant le nombre d'animaux utilisés et en préservant leur bien-être,

- tous les traitements, prélèvements et euthanasies seront réalisés conformément aux procédures en vigueur au sein de l'EU,

- depuis leur inclusion et jusqu'au dernier jour de l'étude, les animaux seront suivis quotidiennement et si requis, les animaux seront soignés et sortis de l'étude ou euthanasiés pour leur éviter toute souffrance ; les conditions d'hébergement permettent aux animaux de répondre à leurs besoins physiologiques,

- les points limites sont tout changement du comportement ou de l'aspect de l'animal, dont perte d'appétit, perte de poids, altération de la respiration, excrétion anormale, dans les jours suivant le(s) traitement(s) ; toute observation laissant présager un début de mal-être, est immédiatement signalée au vétérinaire qui viendra ausculter l'animal et prendra les décisions adéquates pour protéger l'animal.

Ce projet couvre également

- le recueil de tissus ou de matrices dans le but de préparer des matrices biologiques témoins requises pour les activités de bioanalyse
- l'acquisition et le maintien des compétences techniques par le personnel assurant l'application des procédures expérimentales aux animaux, le développement de techniques et/ou méthodes, et/ou la génération de données historiques

17756 Ce projet se résume à l'administration de produits pharmaceutiques ou chimiques par différentes routes d'administration à des rats, souris, cobayes, hamsters et lapins afin de permettre de décrire le comportement et le devenir du produit dans un organisme vivant. Classiquement, il s'agit de modéliser son absorption, sa distribution dans l'organisme, son métabolisme (c'est à dire comment l'organisme procède à sa transformation) et enfin son élimination. Les études conduites dans le cadre de ce projet font partie des dossiers présentés aux autorités.

L'évaluation pharmacocinétique, pharmacodynamique et de la biodistribution d'un ou de plusieurs composés administrés se fait généralement à une dose pharmacologique et avec l'ensemble des voies d'administration utilisées chez l'homme. Cependant, des doses toxicologiques peuvent être utilisées notamment suite à l'administration de produits chimiques. Des prélèvements sanguins, tissulaires, de feces, urinaires ou/et de fluides corporels seront réalisés à différent temps. Ces prélèvements biologiques sont analysés par différentes techniques afin de déterminer les niveaux du ou des composés administrés, de leurs métabolites et des marqueurs pharmacologiques au cours du temps, ou de l'expression génétique, pour définir l'exposition d'un organisme vivant au produit administré et à ces métabolites ainsi que leurs effets pharmacologiques et leur biodistribution.

L'évaluation pharmacocinétique et pharmacodynamique d'un composé ou de plusieurs composés administrés ne peut pas être réalisée qu'avec des études in vitro. Seule l'observation sur un organisme vivant dans son ensemble permet d'évaluer les différentes phases d'absorption, de métabolisme, de distribution et d'élimination du composé, de définir les relations et/ou interactions entre ces différentes phases et de pouvoir déterminer l'exposition du composé ou de plusieurs composés administrés dans l'organisme. Le nombre d'animaux sur 5 ans est estimé à 1200 rats, 690 souris, 90 lapins, 10 cobayes et 10 hamsters. Le nombre d'animaux utilisé dans le cadre de ce projet peut être estimé à un total de 2000 sur 5 ans. Ce nombre d'animaux dépend principalement du volume maximal de sang qui peut être prélevé par animal pendant une période donnée et par site de prélèvement.

Les espèces rat, cobaye, hamster, souris et lapin sont couramment utilisées pour ce type de procédure et sont acceptées par les autorités réglementaires. Le nombre d'animaux est optimisé en utilisant si possible un seul sexe, le minimum d'animaux pour obtenir des résultats statistiquement fiables et pour répondre aux objectifs du projet.

L'hébergement des animaux est réalisé en groupe par défaut, conformément à la Directive 2010/63/EU avec enrichissement. L'hébergement individuel avec enrichissement est uniquement réalisé pour permettre de faire les bilans d'élimination en collectant les urines et/ou féces ou pour certaines voies d'administration. Pour les lapins, l'hébergement individuel avec enrichissement sera réalisé en raison de l'incompatibilité sociale fréquente des lapins matures.

L'état de santé des animaux est contrôlé tous les jours et évalué par rapport à des points limites définis de façon à éviter un inconfort/souffrance prolongé. Certains prélèvements biologiques et/ou administrations (selon la voie) sont réalisés sous anesthésie pour éviter tout inconfort/souffrance. Si nécessaire, un vétérinaire peut intervenir, mais si la souffrance d'un animal est jugée trop importante et si aucun soin ne peut lui être apporté, il sera euthanasié selon une procédure éthiquement acceptée.

17757 La broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) est une maladie chronique inflammatoire qui touche le système respiratoire. La BPCO est composée d'au moins quatre phénomènes pathologiques, tels que l'emphysème pulmonaire, le remodelage des voies aériennes de petite taille, la bronchite chronique et l'hypertension artérielle pulmonaire. Le tabac est indiscutablement

le facteur principal et aggravant de la BPCO. Le modèle animal idéal devrait reproduire les divers phénomènes pathologiques énumérés ci-dessus dans un court laps de temps.

Les tests décrits dans ce projet ciblent l'inflammation du système respiratoire dans le cadre de développement préclinique de produits pharmaceutiques. Des agents réactifs tels que la bléomycine (antibiotique anti-cancéreux), le lipopolysaccharide (LPS), ... sont administrés par instillation intra-trachéale (aspiration oropharyngée), provoquant ainsi un endommagement de l'épithélium pulmonaire, suivi d'une réponse inflammatoire précoce et d'une réparation excessive des tissus qui conduit à une fibrose.

Ces modèles nécessitent l'utilisation de rongeurs et ne peuvent être efficacement remplacés par des méthodes alternatives car l'induction de l'atteinte pulmonaire s'accompagne de modifications physiopathologiques ne pouvant être reproduites *in vitro*. De plus, l'utilisation de rongeurs est justifiée par le fait que le développement des modèles décrits dans ce projet inclut l'évaluation des paramètres respiratoires, tests validés essentiellement chez les rongeurs. L'ensemble des procédures utilisées dans ce projet a été caractérisé dans la littérature scientifique.

A ce jour, la prise en charge de patients atteints de BPCO reste encore limitée et les conséquences ont un impact sociétal important (médical, psychologique, professionnel, social, familial). Dans ce contexte, il est important de développer de nouvelles molécules, plus efficaces que celles actuellement proposées mais aussi permettant de mieux cibler les traitements et de limiter les effets secondaires.

Les modèles proposés chez l'animal ont pour objectif de mimer la pathologie pulmonaire observée en clinique (modèle pathologique). Les substances pharmacologiques évaluées sont généralement codées et peu d'informations nous sont transmises. Néanmoins, il arrive que les récepteurs cibles ou la famille pharmacologique soient indiqués ce qui nous permet d'orienter vers le choix d'un modèle plus adapté, d'affiner la durée de traitement ou le pré-traitement par exemple.

L'objectif de ce projet est de mener des études pharmacologiques sur ces modèles avec des substances de référence connues ou en cours de développement et fournies par nos clients. Les paramètres respiratoires, les marqueurs d'inflammation et de fibrose, l'infiltration cellulaire ainsi que l'histopathologie des poumons sont évalués.

L'objectif de ce type d'étude étant de développer une inflammation, aucune médication (notamment anti-inflammatoire) ne pourra être utilisée, celle-ci risquant de compromettre les résultats de l'étude. Les mesures de raffinement qui s'intègrent dans la règle des 3Rs vont consister en un suivi de points limites (incluant une surveillance de l'aspect général, l'aspect du pelage, des yeux, la posture, les réactions de l'animal quand il est approché ou stimulé, la respiration, l'appétit, le poids, l'état d'hydratation, les tremblements ou convulsions), permettant d'euthanasier tout animal présentant des signes marqués de douleur, de souffrance ou d'angoisse. Le programme d'anesthésie et d'analgésie est défini par un vétérinaire, afin de réduire au maximum toute douleur ou sensation de souffrance. De la même manière, lorsque les protocoles l'exigent, les chirurgies sont raffinées au maximum, en mettant à disposition des animaux, de l'oxygène à concentration ajustable, des tapis chauffants et de soins post-opératoires complets. Nous sommes très vigilants aux différents commentaires du personnel au contact des animaux et nous ajustons spécifiquement nos procédures.

Le nombre d'animaux utilisé pour chaque test a été optimisé de façon à intégrer dans une même expérience la relation dose-effet, la comparaison par rapport à une substance de référence, et une puissance statistique suffisante pour interpréter les résultats de façon correcte, évitant ainsi une répétition du test. Quand la procédure et le traitement le permettent, nous réutilisons les animaux afin de réduire au maximum le volume d'animaux utilisés. Sur ces modèles induits, un effectif de 10 animaux par groupe pour chaque paramètre et chaque stade évalué semble un minimum (i. e. environ 50 animaux par stade). Afin de suivre le profil des cytokines au cours du temps, il peut être envisagé 6 temps de mesure.

Par ailleurs, nous estimons à une dizaine le nombre de molécules qui seront testées par an et par espèce, sur les 5 prochaines années (i. e. 3500 rats, 3500 souris). Afin de réduire le nombre

d'animaux inclus dans ces expériences, les animaux serviront à la fois pour les études de respiration réalisées sur animal éveillé, et pour les prélèvements.

17758 La microcorie congénitale (MCOR) est une maladie ophtalmologique héréditaire, de transmission autosomique dominante. Elle est caractérisée par une absence totale ou partielle du muscle dilatateur de l'iris, par l'observation de micro-pupilles qui ne réagissent pas aux variations de l'intensité lumineuse provoquant une cécité nocturne et une photophobie et par des malformations du segment antérieur de l'œil pouvant entraîner un glaucome juvénile. L'analyse génétique des patients a montré que tous les individus atteints par cette pathologie étaient porteurs d'une délétion à l'état hétérozygote. La délétion minimale commune à tous les patients a été recrée dans un modèle murin et a permis de mettre en évidence l'expression anormale d'un gène exprimé au cours du développement, de rôle inconnu. Cette même délétion a été maintenant recrée dans un modèle murin pour lequel le gène d'intérêt a été remplacé par un gène codant pour une protéine fluorescente permettant de suivre l'expression de ce gène au cours du développement embryonnaire, et de démontrer son expression au niveau de l'iris en formation chez les souris MCOR par visualisation directe sous microscope, son implication (ou sa non implication) dans la létalité embryonnaire à 9.5 jours des souris homozygotes MCOR mais aussi de comprendre, quel est le type cellulaire précis, qui par perte d'expression entraîne l'hypertrophie parfois létale de l'estomac observée chez certaines souris homozygotes.

La Microcorie Congénitale est une pathologie oculaire pour laquelle il est difficile de récupérer du matériel biologique adapté chez l'humain et ainsi de réaliser une étude scientifique fondamentale à partir du tissu principalement concerné (iris). Les analyses *in vitro* réalisées sur plusieurs modèles cellulaires étant insuffisantes pour les études moléculaires et phénotypiques, le recours à l'animal est donc indispensable. Des modèles animaux adaptés permettront d'étudier le rôle des différents gènes candidats impliqués dans le développement oculaire.

Les animaux, indifféremment des deux sexes, seront gardés en élevage et génotypés afin de sélectionner ceux qui sont porteurs du gène rapporteur et de la délétion MCOR. Ils seront sacrifiés à différents stades afin de suivre le patron d'expression du gène candidat au cours du développement et chez l'adulte.

Afin de respecter la règle des 3 R, et de réduire le nombre des animaux nécessaires, des analyses *in vitro* ont préalablement été réalisées sur plusieurs modèles cellulaires, le Remplacement des animaux par des cellules en culture a permis d'effectuer les premières analyses d'expression qui doivent être maintenant validées et ainsi de réduire le nombre des animaux. Le Raffinement se fait par une surveillance organisée permettant l'euthanasie très rapide des animaux en souffrance.

Le nombre d'animaux nécessaires à la création de ces lignées et à leur étude sur 5 ans, est évalué à 1260 au maximum: des tests statistiques sont effectués afin de déterminer le nombre d'animaux nécessaire et suffisant pour la significativité des résultats.

Afin de réduire au maximum le stress des animaux, un enrichissement des cages a été mis en place (maisons en carton, bâtonnets à ronger ou cotons d'enrichissement). Les animaux seront surveillés quotidiennement, des antalgiques seront administrés en cas de douleur et des points-limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

Les résultats de ce projet permettront de comprendre les mécanismes impliqués dans MCOR, dans le développement irien et la prédisposition au glaucome, maladie fréquemment associée et constituant la deuxième cause de cécité dans les pays industrialisés avec 10% d'individus touchés après l'âge de 70 ans.

17759 Le vieillissement normal du cerveau s'accompagne d'un déclin de la neurogénèse adulte, de la plasticité neuronale et des fonctions métaboliques et cognitives. Ces modifications commencent à se développer autour de 65 ans et l'une des régions cérébrales les plus affectées est l'hippocampe, ce qui conduit à des déficits d'apprentissage et à un déclin de la mémoire.

Avec l'accroissement de l'espérance de vie, le nombre de personnes touchées par une perte des fonctions mnésiques liée à l'âge est inexorablement appelé à augmenter dans les prochaines

décennies. Par conséquent, une meilleure compréhension de la façon dont notre cerveau vieillit et l'identification des mécanismes cellulaires permettant le maintien de nos fonctions mentales, pourraient conduire au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour prévenir le déclin et/ou restaurer la résilience de notre santé mentale durant le vieillissement.

De nouvelles données indiquent que la restriction calorique améliore la mémoire chez les souris âgées. Les effets bénéfiques de la restriction calorique pour prévenir le déclin de la mémoire lié à l'âge soulèvent une question cruciale : quels sont les mécanismes intracellulaires de rajeunissement dans les neurones hippocampiques ?

Des travaux récents montrent que l'autophagie (recyclage des composants cellulaires) dans les neurones hippocampiques favorise la formation de mémoire en modulant la plasticité des neurones, en conditions normales et au cours du vieillissement. L'autophagie est un processus cellulaire régulé par de nombreux facteurs. La modulation de certains d'entre eux pourrait jouer un rôle important dans l'homéostasie des fonctions métaboliques et cognitives. Ces régulateurs de l'autophagie pourraient, à long terme, devenir de nouvelles cibles thérapeutiques.

L'expérimentation *in vitro* nous a permis d'identifier et de caractériser des régulateurs de l'autophagie mais il est cependant nécessaire et indispensable d'étudier l'impact de leur modulation *in vivo*, sur les fonctions cognitives et métaboliques et d'observer l'invalidation de ces régulateurs dans son ensemble.

Nous utiliserons des souris de 3 mois pour vérifier notre hypothèse, le nombre de souris nécessaires sera de 1840 sur 5 ans.

Des souris transgéniques seront analysées. Les souris recevront un produit inhibiteur des gènes analysés injectés directement dans l'hippocampe des souris avant de les soumettre à différents tests comportementaux (sur la mémoire) ou bien à des mesures de métabolisme et de prise alimentaire (consommation oxygène, boisson, nourriture) en utilisant des cages métaboliques.

Pour respecter le principe des 3R (remplacement, raffinement, réduction), le nombre de souris utilisées sera réduit à son minimum : analyses de paramètre multiples pour chaque souris et utilisation de tests statistiques adaptés. La chirurgie (injection intra-hippocampique) aura lieu dans un cadre stéréotaxique sous anesthésie générale pour éviter toute douleur et des antalgiques sont prévus en pré et post-opératoire. Pour assurer le bien-être des souris, elles seront placées par groupe dans un milieu enrichi. Les souris seront sous surveillance journalière et des points limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

En résumé, ce projet pourrait permettre d'identifier et caractériser de nouveaux régulateurs de l'autophagie et conduire au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour restaurer/prévenir les effets délétères du vieillissement sur le cerveau.

17760 Ce projet se résume à l'administration de produits pharmaceutiques humains ou vétérinaires par différentes routes d'administrations à des chiens ou des mini-porcs afin de permettre de décrire le comportement et le devenir du produit dans un organisme vivant. Classiquement il s'agit de modéliser son absorption, sa distribution dans l'organisme, son métabolisme c'est à dire comment l'organisme procède à sa transformation et enfin à son élimination. Ce projet fait partie des dossiers présentés aux autorités.

L'évaluation pharmacocinétique et pharmacodynamique d'un ou de plusieurs composés administrés se fait généralement à des doses pharmacologiques et avec l'ensemble des voies administrations utilisées chez l'homme ou l'animal pour les produits vétérinaires. Cependant, les doses toxicologiques peuvent être utilisées pour déterminer l'exposition du produit suite à l'administration de doses toxicologiques. Des prélèvements sanguins, tissulaires, de feces, urinaires ou/et de fluides corporels seront réalisés à différents temps. Ces prélèvements biologiques sont analysés par différentes techniques afin de déterminer les niveaux du ou des composés administrés, de leurs métabolites et/ou des marqueurs pharmacologiques au cours du temps pour définir l'exposition d'un organisme vivant au produit administré et à ces métabolites ainsi que leurs effets pharmacologiques.

L'évaluation de l'absorption, de la distribution, du métabolisme et de l'élimination d'un produit dans un organisme vivant ne peut pas être réalisée in vitro. Seule l'observation sur un organisme vivant dans son ensemble permet d'évaluer les différentes phases d'absorption, de métabolisme, de distribution et d'élimination du composé, de définir les relations et/ou interactions entre ces différentes phases et de pouvoir déterminer l'exposition du composé ou de plusieurs composés administrés dans l'organisme. Le nombre d'animaux sur 5 ans est estimé à maximum 300 chiens et 50 mini-porcs, soit un total de 350 animaux maximum sur 5 ans. Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés, certains animaux peuvent être utilisés plusieurs fois pour tester différents produits à condition de respecter une période de repos et sous réserve de l'avis favorable du vétérinaire sanitaire.

Les espèces chiens et mini-porc sont couramment utilisées pour ce type de procédure et sont acceptés par les autorités réglementaires. Le chien et le mini-porc sont utilisés pour l'évaluation de produits pharmaceutiques humains et vétérinaires. Le nombre d'animaux est optimisé en utilisant si possible un seul sexe, le minimum d'animaux pour obtenir des résultats statistiquement fiables et pour répondre aux objectifs du projet.

Les chiens sont hébergés en groupe par défaut, conformément à la Directive 2010/63 avec enrichissement et sur litière. Les mini-porcs peuvent être hébergés individuellement avec enrichissement et sur litière en raison de l'incompatibilité sociale fréquente des porcs et mini-porcs matures. Les chiens peuvent être hébergés individuellement avec enrichissement uniquement pour permettre de faire les bilans d'élimination en collectant les urines et fèces ou pour certaines voies d'administration.

L'état de santé des animaux est contrôlé tous les jours et évalué par rapport à des points limites définis de façon à éviter un inconfort/souffrance prolongé. Certains prélèvements biologiques et voies d'administration sont réalisés sous anesthésie et/ou analgésie afin d'éviter tout inconfort et souffrance. Si nécessaire, un vétérinaire peut intervenir, mais si la souffrance d'un animal est jugée trop importante et si aucun soin ne peut lui être apporté, il sera euthanasié selon une procédure éthiquement acceptée.

17761 L'utilisation des acides aminés de synthèse (comme la méthionine) permet de réduire l'apport de protéines dans l'aliment des animaux, d'améliorer l'équilibre alimentaire et de diminuer les rejets d'azote dans l'environnement. Les recommandations nutritionnelles en acides aminés sont basées sur la croissance. Cette variable seule ne permet pas de prendre en compte la diversité des réponses de l'animal à un apport en acides aminés. Dans une étude précédente, nous avons montré par exemple qu'une carence modérée en méthionine n'affectant pas la croissance modifie à la fois la teneur en protéines et en lipides, et la composition en acides aminés dans certains tissus ou compartiments corporels. Par ailleurs, les acides aminés ne sont plus uniquement considérés comme des substrats directs de la protéosynthèse mais aussi comme des médiateurs de voies métaboliques, donneurs de groupements méthyle, précurseurs de divers métabolites ou composés d'importance biologique majeure... Ainsi, les acides aminés soufrés dont la méthionine jouent sur des fonctions très variées, incluant un rôle anti-oxydant via la synthèse de glutathion et de la taurine. La présente expérience propose d'approfondir les connaissances sur le rôle de la méthionine en examinant tout particulièrement l'utilisation digestive et métabolique des soufrés, en considérant 2 sources d'apport de méthionine.

Un total de 150 poulets sera élevé en groupe au sol pendant une semaine avec un aliment standard. Seulement 120 seront utilisés dans le projet : à J7, 10 poulets seront mis à mort en vue de prélèvements et 110 poulets de poids homogène seront répartis en cages individuelles en vue de collecte des fientes et mesures de digestibilité. Des prises de sang seront réalisées sur 110 poulets avant mise à mort.

Tout au long de l'expérimentation, l'application de la règle des 3R sera respectée:

Remplacer : Ce type d'étude nécessite l'utilisation d'animaux puisqu'à l'heure actuelle, aucun modèle in vitro ou in silico n'est capable de représenter la complexité des mécanismes physiologiques de digestion et de métabolisme.

Réduire : Le nombre d'animaux a été réduit à son minimum. Il est nécessaire et suffisant pour pouvoir tirer des conclusions significatives en tenant compte 1) de nos expériences précédentes et de la variabilité interindividuelle attendue en termes de poids et métabolisme protéique au moment de la procédure expérimentale, et 2) de la réalisation de prélèvements sur une cinétique (e. g. 9 points de cinétique avec 5 poulets par point pour modéliser l'enrichissement des tissus en soufre) avec 2 traitements nutritionnels.

Raffiner : Les poussins seront élevés au sol en groupe pendant 1 semaine à une densité inférieure au maximum autorisé. Un élevage par groupe d'au moins 4 poussins est nécessaire pour créer des interactions sociales entre les poussins.

La durée de la procédure expérimentale de mesure de la digestibilité et métabolisme en cage sera limitée à 3 semaines, temps nécessaire à l'atteinte du plateau d'enrichissement des tissus en soufre. Les cages individuelles sont grillagées permettant un contact visuel et olfactif avec les congénères, et le sol des cages est adapté au poids des animaux. Des enrichissements appropriés du milieu de vie seront mis en place : au sol, petits perchoirs, balles en plastique et litière copeaux ; en cage individuelle, objets suspendus. Les poulets seront visités au moins deux fois par jour. Dans le cas de manifestation de symptômes persistants tels que définis dans la procédure de gestion des points limites, les animaux seront sortis de l'expérimentation.

17762 Les neurones communiquent en sécrétant des messagers chimiques appelés neurotransmetteurs. Ces messagers sont stockés à l'intérieur de la cellule dans des vésicules spécialisées qui, en fusionnant avec la périphérie cellulaire, libèrent les neurotransmetteurs au bon moment et au bon endroit. Ce processus, appelé exocytose, est à la base de la neurotransmission (transmission d'un message entre 2 neurones).

Bien que de nombreuses données aient été générées quant aux protéines impliquées, le rôle des lipides au cours de la neurotransmission est très peu exploré.

Nos données récentes montrent que les lipides sont indispensables au bon fonctionnement de la neurotransmission. En particulier, nous avons montré que la production et la localisation spécifique de certains lipides (nommés acide phosphatidique et phosphatidylsérine) sont importantes. Aujourd'hui, nous disposons de deux lignées de souris génétiquement modifiées pour lesquelles ces aspects sont altérés, et nous voulons en étudier l'impact sur les comportements nociceptifs et douloureux, ainsi que sur l'initiation et/ou le développement de douleurs chroniques.

A terme, ces données permettront de mettre en évidence, pour la première fois, l'importance des lipides dans les circuits de transmission de la douleur et dans la physiopathologie des douleurs chroniques.

Le projet nécessitera 640 animaux et sera conduit en respectant la règle des 3R visant à réduire le nombre d'animaux ainsi qu'à optimiser les procédures. Les souris mâles et femelles seront étudiées en proportions équitables dans le cadre de ce projet.

Remplacer

Au vu de notre objectif d'étude, il nous est malheureusement impossible de remplacer notre modèle in vivo par un modèle in vitro ou in silico. En effet, la caractérisation de la douleur nécessite une observation comportementale, uniquement possible chez l'animal vivant et vigile.

Réduire

Les expériences seront réalisées avec la volonté de réduire autant que faire se peut le nombre d'animaux par condition expérimentale, mais toujours dans l'optique d'obtenir le maximum d'information scientifique par test. Ainsi, au regard des données de la littérature et de la variabilité phénotypique individuelle, les groupes expérimentaux seront constitués de 10 animaux. Toujours dans l'idée de diminuer au maximum le nombre d'animaux utilisés, chaque procédure regroupe un ensemble de tests comportementaux dont l'échainement est compatible avec le bien-être de l'animal, ce qui permet de réduire grandement l'effectif.

Raffiner

Un point limite est fixé pour chaque test nociceptif utilisé au-delà duquel la stimulation nociceptive est arrêtée en absence d'une réaction de l'animal. Les animaux sont hébergés dans des animaleries dont le fonctionnement a été conçu pour maximiser le confort et limiter la souffrance des animaux. En particulier, les souris sont hébergées en cohorte, elles font l'objet d'observations régulières tout au long de l'expérience, l'enrichissement est systématiquement appliqué à toutes les cages. Les animaux seront observés tous les jours et leur comportement sera suivi afin de déceler tout signe d'inconfort ou de stress. En cas de nécessité des décisions seront prises en accord avec le vétérinaire, la Structure chargée du Bien-Etre des Animaux (SBEA) et/ou le personnel zootechnique de l'institut pour stopper tout signe de mal-être de l'animal.

17763 De nouvelles approches de traitement anti-tumoral se basent sur l'injection chez le patient de cellules immunitaires reconnaissant et éliminant spécifiquement la tumeur. Bien qu'ayant obtenu des résultats très prometteurs, cette approche n'est pas couronnée de succès dans de nombreux cas (notamment les tumeurs solides ou les formes réfractaires) et nécessite un pré-traitement par radiothérapie ou/et chimiothérapie. Nous proposons dans ce projet d'étudier les perturbations engendrées par les conditionnements (radiothérapie ou chimiothérapie) afin d'optimiser l'efficacité d'une réponse anti-tumorale par greffe de cellules immunitaires T.

REMPACER : Il s'agit d'un projet sur une période 5 ans qui requiert une analyse intégrée in vivo de l'impact d'un état lymphopénique/conditionnement sur le devenir de cellules immunitaires anti-tumorales, en présence ou en absence de tumeurs. Ces questions ne peuvent pas être abordées à l'heure actuelle au moyen de méthodes alternatives in vitro ou in silico, et demandent ainsi de faire appel à des modèles animaux, murins dans le cas présent, en raison des grandes similitudes du système immunitaire murin et humain, ainsi que du panel important de modèles à disposition pour identifier les paramètres essentiels dans ces processus.

REDUIRE : Les données obtenues précédemment ainsi que les données disponibles dans la littérature nous ont permis d'estimer le degré de variabilité expérimentale des procédures proposées dans ce projet. Compte-tenu de cette variabilité, des résultats attendus, et des tests statistiques choisis, et après vérification de la puissance statistique (à l'aide du logiciel G*power) le nombre de souris nécessaires pour atteindre une puissance statistique d'au moins 80% et avec $p < 0.05$ a pu être estimé pour chaque procédure.

RAFFINER : Toutes les dispositions sont mises en œuvre pour le raffinement des conditions d'élevage et d'expérimentation, en accord avec la structure de bien être animal de la zone protégée (SBEA). Le bien être des animaux est évalué quotidiennement et leur environnement est enrichi en cotons ou cabanes. Toutes les procédures expérimentales sont clairement définies, décrites dans la littérature et validées par le comité de pilotage de la zone protégée. Toutes les personnes impliquées sont formées et sensibilisées à l'évaluation de la souffrance animale, pour détecter et réduire la douleur, et limiter les variations expérimentales. Une fiche de suivi est établie pour chaque animal de la procédure expérimentale

Nombre total d'animaux requis pour la mise en œuvre de ce projet : 6472 souris.

17764 Notre projet porte sur la mise en évidence d'anomalies du développement périnatal des neurones moteurs de la moelle épinière de la souris SOD1G93A, modèle murin de la maladie sclérose latérale amyotrophique (SLA). La SLA ou maladie de Charcot est caractérisée par une dégénérescence des neurones moteurs qui survient pendant la vie adulte et qui conduit à une paralysie fatale. La plupart des études se sont focalisées sur les périodes symptomatiques ou pré-symptomatiques et non sur les mécanismes initiaux conduisant fort probablement à la survenue de la maladie. Il est montré que les inhibitions sont altérées très tôt au cours du développement chez la souris SOD1G93A. Nous proposons donc, grâce à une approche génétique, de renforcer les inhibitions chez cette souris et d'en tester les effets bénéfiques potentiels sur la survenue de la maladie SLA.

Un développement anormal des inhibitions pourrait avoir des conséquences tardives conduisant à la dégénérescence des neurones moteurs pendant la vie adulte et à la paralysie fatale chez les

patients SLA. Notre programme est un premier pas vers de nouvelles stratégies de recherche qui seront essentielles pour diagnostiquer la SLA à des stades précoces.

D'un point de vue méthodologique, nous nous engageons à respecter au maximum la règle des 3 R (remplacement, réduction, raffinement):

- Remplacement: des expériences de simulations informatiques sont réalisées afin de remplacer/compléter certaines expériences. Cela permet de remplacer l'utilisation des souris et de réduire le nombre d'animaux.

- Réduction: afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, notre projet basé sur des méthodes variées permet d'utiliser au maximum tous les embryons et animaux néonataux disponibles issus d'une portée. Concernant les expériences réalisées chez l'adulte, un nombre minimum d'animaux est programmé en accord avec les tests statistiques qui seront réalisés à posteriori.

- Raffinement: les souris sont élevées avec un enrichissement. Des points limites sont établis afin de réduire au maximum la souffrance des animaux liée à leur incapacité à se nourrir en fin de vie.

Dans son ensemble, notre projet est basé sur l'utilisation de 4220 animaux sur 5 années de recherche.

17765 Le tryptophane (Trp) est un acide aminé essentiel au fonctionnement normal de l'organisme, puisqu'il est nécessaire à la biosynthèse des protéines et un précurseur biochimique de métabolites qui ont des effets majeurs sur la physiologie des mammifères. Cet acide aminé provient principalement de l'alimentation. Dans le tractus gastrointestinal, le métabolisme du Trp peut suivre trois voies principales, qui sont toutes sous le contrôle du microbiote intestinal (population microbiennes et fongiques) : la voie de la kynurenine, des indoles et de la sérotonine. Les produits finaux de ces voies jouent un rôle clé dans la modulation de la réponse immunitaire, des fonctions intestinales et du comportement. Plusieurs maladies sont impactées par les métabolites du Trp, comme la maladie de Crohn et le cancer colorectal associé aux MICI (maladies inflammatoires chroniques de l'intestin). Cela suggère que l'effet du microbiote dans ces maladies pourrait être, au moins partiellement, médié par l'altération du métabolisme du Trp. Nous étudions d'ailleurs en ce moment des pistes pour des thérapeutiques visant à moduler le métabolisme du tryptophane dans des modèle de MICI et de syndrome métabolique. Ces pathologies et notamment le cancer colorectal, sont de plus en plus prévalentes dans les pays occidentaux et impactent fortement leur population, il est donc nécessaire de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu, afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

L'objectif principal du projet est donc de comprendre l'effet des trois voies du tryptophane dans le développement des cancers colorectaux. Effet, il existe plusieurs stades de développement du cancer colorectale, ceux qui nous intéresseront plus particulièrement seront : un stade précoce, le polype, un stade plus avancé, celui de l'adénome et un autre stade précédant l'invasion de l'organisme par les cellules tumorales, celui du carcinome. Plus précisément, nous souhaiterions : (i) déchiffrer l'équilibre entre les 3 voies du métabolisme du tryptophane pour évaluer sa modulation au cours de la carcinogénèse, (ii) évaluer de potentielles approches thérapeutiques et (iii) identifier la pertinence de ces stratégies chez des patients humains.

Afin d'appliquer au mieux la règle des 3R, nous avons prévu dans nos projets scientifiques d'utiliser des expérimentations in vitro sur des lignées cellulaires ou des cellules primaires préalablement à l'utilisation d'animaux, ce qui permet d'en réduire le nombre. Nos études imposent le modèle animal pour valider les hypothèses soulevées grâce aux résultats des expérimentations in vitro. Il n'existe pas aujourd'hui de modèle in vitro récapitulant tous les paramètres du tube digestif. Des expérimentations animales seront donc réalisées afin de mieux comprendre le rôle du métabolisme du tryptophane dans les mécanismes intervenant dans la transition inflammation chronique – cancer colorectal. Nous déclencherons chez ces animaux un cancer colorectal à l'aide d'agents chimiques initiateurs, tels que l'AOM (azoxymethane) et des produits induisant des colites, tels que le dextran sodium sulfate (DSS). Ces expérimentations seront réalisées sur plusieurs semaines en fonction de l'étape de carcinogénèse étudiée (polype, adénome ou carcinome), de 8 à 20 semaines. Nous administrerons en parallèle des bactéries, des levures, un microbiote complexe ou des métabolites

afin de moduler le métabolisme du tryptophane. Nous vérifierons alors l'impact de ces microorganismes ou molécules sur l'évolution de la pathologie. Durant la totalité des protocoles, les animaux seront quotidiennement évalués par l'expérimentateur, notamment au niveau de la perte de poids et de la sévérité de la maladie. L'essentiel des prélèvements (sang, tissus, contenus intestinaux) sera fait post mortem à l'exception des fèces qui pourront être prises régulièrement. Nos groupes de souris seront réduits à 12 animaux par traitement testé. Le nombre de lignées de souris étant relativement élevé pour décrire et comprendre les voies et mécanismes du métabolisme du Trp (10 lignées génétiquement modifiées) dans ce projet, nous utiliserons un maximum de 352 souris / an sur 5 ans, soit 1764 souris au total. En effet, pour cette étude, chaque expérience sera reproduite 3 fois pour garantir la qualité statistique des données et des souris non traitées seront également indispensables à la compréhension des différents résultats obtenus (variabilité basale de certaines cellules et protéines en fonction du génotype de la souris). Les souris seront hébergées dans des pièces thermo-régulées et contrôlées afin de garantir un cadre de vie optimal. Nous veillerons à enrichir le cadre de vie des souris par ajout d'une feuille de cellulose dans chaque cage.

17766 L'efficacité alimentaire d'un animal correspond à sa capacité à convertir la prise alimentaire en gain de poids. En production animale, améliorer l'efficacité alimentaire est un objectif à atteindre car il permet de réduire l'utilisation des ressources nécessaire à l'élevage. Introduire ce caractère dans les programmes de sélection diminuerait l'impact environnemental de la pisciculture marine. Ainsi, une génération de sélection de l'efficacité alimentaire du bar pourrait induire une réduction significative de l'impact environnemental (diminution de 3.3 kg d'équivalent Phosphate et de 55 kg d'équivalent CO₂ par tonne de poisson produite) et augmenterait les gains économiques (de 6 cts d'euros par kg de poisson produit).

Cependant, ce caractère était jusqu'à présent impossible à améliorer chez les poissons du fait de l'impossibilité de mesurer l'ingéré individuel. Deux caractères liés à l'efficacité alimentaire des poissons en groupe ont été explorés : la perte de poids après une période de mise à jeun et l'efficacité alimentaire mesurée individuellement en aquarium en condition d'alimentation restreinte. Cependant d'importants questionnements scientifiques restent à éclaircir. En particulier, la comparaison entre sélection sur la perte de poids au jeûne et l'efficacité alimentaire en aquarium. Mais aussi l'impact sur d'autres caractères tel que la composition en lipide. Cette comparaison est un réel enjeu de la possible mise en œuvre sur le terrain par les pisciculteurs.

Dans le projet faisant appel aux procédures objets de la présente demande, des bars (*Dicentrarchus labrax*) très domestiqués (issus de la 7^{ème} génération de sélection et domestication d'une entreprise de sélection) seront évalués pour deux critères, la perte au jeun et l'efficacité alimentaire individuelle. En compléments, les animaux seront évalués pour leur métabolisme énergétique, caractère physiologique clef dans l'efficacité énergétique des animaux. L'objectif du projet sera de déterminer la démarche pour améliorer l'efficacité alimentaire du bar.

Afin de réaliser ce projet, au total 1600 poissons seront utilisés. La mise en place de la règle des 3Rs (Réduire, Raffiner, Remplacer) a été suivie de sorte que :

Réduire : Le nombre d'animaux utilisé correspond au nombre nécessaire pour mettre en évidence des différences significatives entre les deux critères de sélection dans ce projet.

Raffiner : En dehors des conditions d'élevage classique, un enrichissement spécifique est mis en place pour les phases d'élevages individualisées afin d'améliorer le bien-être des poissons dans ces conditions inhabituelles.

Remplacement : pour ce type d'expérimentation il n'est pas possible de substituer l'animal vivant.

17767 La grippe est une maladie infectieuse fréquente et contagieuse due à l'infection par le virus de la grippe. Souvent banalisée, la grippe représente un réel problème de santé publique à l'échelle mondiale puisqu'elle est responsable de 250 000 à 500 000 décès chaque année, essentiellement des jeunes enfants et des personnes âgées. En France, la grippe touche plusieurs millions d'individus chaque année. En période endémique, la prévention est basée sur l'hygiène, en particulier des mains. De nombreux traitements prophylactiques ou curatifs existent, cependant,

tous ces moyens de prévention ne sont efficaces que lorsqu'ils sont utilisés tôt au cours de la maladie, et ils ne sont pas totalement protecteurs. C'est pourquoi la recherche de nouvelles molécules thérapeutiques est nécessaire. L'intérêt ici est de trouver une molécule qui serait plus efficace que celles déjà existantes.

Le projet correspond à une phase préclinique qui consiste en l'étude de l'action des agents pharmacologiques in vivo chez le rongeur, étape essentielle dans le développement de médicaments à visée anti inflammatoire. Ce projet a pour but de tester de nouveaux médicaments antigrippaux. Les animaux infectés seront ensuite mis à mort au bout de 3 ou 7 jours post-infection, en respectant les règles de sécurité adéquates (travail sous poste de sécurité microbiologique : PSM) pour analyser différents paramètres immunologiques et virologiques. Ceci permettra d'étudier l'efficacité des molécules testées sur le développement de la maladie (signes cliniques) et l'inflammation pulmonaire.

L'animal utilisé est la souris C57BL/6 ou BALB/c. L'administration du virus à l'animal se fait par voie intra-nasale sous anesthésie générale afin de minimiser les situations douloureuses et stressantes. Ce modèle expérimental induit des douleurs inflammatoires aiguës à l'animal, liées au développement de la maladie pulmonaire. Les conditions d'hébergement sont celles requises par l'annexe II de l'arrêté relatif à l'agrément des EU. Lors de l'expérimentation les animaux sont observés quotidiennement, des points limites sont mis en place à partir d'une grille de score impliquant comme critères l'aspect, le comportement et l'amaigrissement. Afin de minimiser le mal-être des animaux, des croquettes humides sont mises au fond de la cage, si les animaux atteignent le point limite le plus haut ils seront mis à mort. Les analgésiques pourraient interférer avec les molécules thérapeutiques testées et ils ont un effet connu sur la réponse immunitaire, ils ne pourront donc pas être utilisés dans cette étude. Les animaux seront sacrifiés selon la réglementation en vigueur.

Le projet pourra comporter jusqu'à 2 études en phase préclinique. Une étude comportera jusqu'à 80, soit 160 animaux au total.

A ce jour, l'animal de laboratoire reste le seul recours fiable et pertinent permettant de tester des nouvelles molécules thérapeutiques ciblant l'infection par le virus de la grippe. Ce projet sera réalisé en respectant les principes fondamentaux de l'expérimentation animale :

Remplacement : le modèle animal est fondamental dans notre cas, puisque l'étude de l'inflammation et de la pathologie ne peut se faire que sur un organisme vivant entier.

Raffinement : les animaux sont observés 1 à 3 fois par jour en fonction de l'évolution du score clinique afin de respecter le bien-être de l'animal. Les animaux montrant des sévères signes de souffrance (léthargie, respiration rapide) seront mis à mort.

Réduction : le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement pertinents et reproductibles, évitant ainsi de refaire plusieurs fois les mêmes expérimentations. La dose du composé est choisie en fonction des études in vitro, permettant aussi de vérifier l'absence de toxicité du composé par le laboratoire pharmaceutique ou le laboratoire de recherche public donneur d'ordres. La dose ayant un effet sur les cellules doit induire moins de 20% de mortalité cellulaire pour pouvoir être administrée aux animaux.

17768 Le présent projet concerne l'évaluation de l'efficacité d'un produit immunologique destiné à la prévention d'une pathologie respiratoire chez un carnivore domestique.

Il n'existe pas pour le moment de méthode d'évaluation de l'efficacité du produit; aussi l'efficacité de ce produit est-elle évaluée par un essai avec épreuve virulente chez la souris, qui n'est pas une des espèces de destination du produit.

La procédure est décrite dans le présent projet : essai d'activité sur souris dans le cadre strict du contrôle qualité pour la libération de chaque lot de fabrication.

Ce projet est conçu en accord avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement (3R), avec notamment :

Lorsque cela est possible, l'utilisation d'animaux témoins communs au test d'activité de plusieurs lots, de manière à réduire le nombre global d'animaux utilisés,

L'enrichissement apporté dans les cages des animaux,

La définition de points limites adaptés permettant la réduction de la souffrance chez les animaux,

Il n'existe pas pour le moment de méthode d'évaluation de l'efficacité du produit; aussi l'efficacité de ce produit est-elle évaluée par un essai avec épreuve virulente chez la souris, qui n'est pas une des espèces de destination du produit.

Le nombre d'animaux envisagé sera de 1200 souris pour l'ensemble du projet.

17769 Ce projet concerne les traitements de la douleur neuropathique. Celle-ci, due à une lésion ou une pathologie du système nerveux, affecte environ 6% de la population. Certains antidépresseurs, anticonvulsivants et opioïdes représentent actuellement les meilleures thérapies disponibles, mais elles ne sont pas efficaces chez tous les patients et leurs effets secondaires sont nombreux. Le mécanisme conduisant à la douleur neuropathique, ainsi que les mécanismes d'action des traitements actuels ne sont que très partiellement connus, mais les données précliniques déjà existantes ouvrent des pistes pour de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

Le projet vise à évaluer l'efficacité d'une combinaison thérapeutique entre un antidépresseur aminergique et un ligand sigma, dont l'efficacité a déjà été démontrée dans le cadre de la douleur neuropathique. La combinaison vise à terme à diminuer les doses nécessaires à l'effet thérapeutique de l'antidépresseur utilisé seul et donc les effets secondaires associés. Cet effort préclinique nécessite des modèles reproduisant la condition neurologique ainsi que sa réponse aux traitements existants.

Remplacer : de tels modèles ne peuvent être obtenus que grâce à l'animal car la douleur est un processus intégré. Ce projet vise à tester des molécules et leur combinaison pour évaluer leur capacité à soulager la douleur neuropathique. Il nécessitera un maximum de 1648 souris (sur une période de 5 ans) et sera conduit en réduisant chaque fois que possible le nombre d'animaux ainsi qu'en optimisant les procédures.

Réduire : les animaux étant quasiment consanguins la variabilité phénotypique est considérablement diminuée, ce qui permet de réduire le nombre d'animaux tout en mettant en évidence un effet statistiquement significatif.

Raffiner : les animaux (souris) sont hébergés de 3 à 5 par cage. Chaque cage est enrichie avec de la frisure pour faire un nid, ainsi qu'avec un morceau de bois. Les procédures chirurgicales se feront sous anesthésie. Des points-limite sont systématiquement établis afin de permettre à l'animal de se soustraire à la souffrance. Le non-déplacement des points limites sera une préoccupation essentielle.

17770 L'hypertension pulmonaire est une maladie progressive grave qui touche les petits vaisseaux sanguins des poumons et dont le symptôme principal est l'essoufflement à l'effort. Ces vaisseaux transportent le sang à partir du cœur vers les poumons, où il se charge en oxygène (O₂) pour alimenter tout l'organisme. La prévalence de cette maladie est estimée de 15 à 25 cas pour un million d'habitants et le pic de fréquence se situe entre 30 et 40 ans. L'évolution naturelle de cette maladie varie fortement d'un individu à l'autre, mais elle conduit à une insuffisance cardiaque droite responsable du décès du patient seulement quelques années après la déclaration de la maladie. De nombreux médicaments permettent de réduire les symptômes de l'hypertension pulmonaire, cependant aucun permet à ce jour un traitement complet de la maladie. Lorsque l'hypertension pulmonaire menace la vie du patient, ces patients peuvent subir une greffe cœur-poumon. Ainsi, la découverte de nouveaux médicaments apparaît primordiale afin de lutter ou diminuer le développement de cette maladie. Avant de tester ces molécules thérapeutiques chez les patients atteints d'hypertension pulmonaire, il est crucial d'appréhender au préalable la posologie et l'efficacité de ces molécules sur un modèle animal, et notamment le rat. En effet, les rats sont des modèles standards de maladies cardiovasculaires. Ils présentent une anatomie vasculaire et des caractéristiques hémodynamiques similaires à celle de l'homme. L'utilisation de l'animal vivant est

indispensable par l'impossibilité de simuler ex vivo la mise en place de l'insuffisance cardiaque qui est un processus complexe. De plus, dans un but d'étude préclinique il est crucial de pouvoir tester nos molécules pharmacologiques sur l'animal entier afin de déterminer la présence d'effets secondaires non désirés. Toutes les procédures seront pratiquées en utilisant des anesthésiques et des analgésiques. Les fonctions cardiovasculaires seront étudiées par des méthodes non invasives permettant de limiter le nombre d'animaux utilisés. Les rats sont mis à mort en fin d'expérimentation et les tissus prélevés sont partagés afin de minimiser encore le nombre d'animaux utilisés. Des expériences de biochimie et de biologie moléculaire à partir des différents tissus collectés et des études sur cellules isolées seront effectuées dans la mesure du possible afin de réduire le nombre d'animaux utilisés. Ainsi, toutes les procédures de ce projet sont conçues pour respecter le principe de 3 R (Réduction, Raffinement, Remplacement). De l'enrichissement sera ajouté dans les cages des animaux. Les rats seront surveillés quotidiennement et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer que les animaux ne subissent aucun stress. Le nombre total de rats utilisés sera de 85 sur l'ensemble de l'étude en combinant plusieurs approches expérimentales par différents expérimentateurs sur le même animal.

17771 Le but de cette procédure est de mettre en évidence, chez le rat, les actions d'un antipsychotique et d'un psychoanaleptique sur le système nerveux central. L'appréciation de ces actions se fait à l'aide de tests comportementaux simples et sans douleur. Aucune chirurgie n'est opérée.

L'expérimentation animale de pharmacologie est inscrite dans le programme pédagogique national (PPN) des études du Diplôme Universitaire de Technologie (DUT) option génie biologique « analyses biologique et biochimique » (ABB). Elle est présente dans les modules de 1ère année (physiologie animale) et 2nde année (pharmacologie expérimentale). Les étudiants du DUT ABB seront des futurs techniciens polyvalents. Ils doivent donc acquérir des gestes techniques dans le domaine de l'expérimentation animale qui leur serviront au cours de leur vie professionnelle, de leur poursuite d'étude éventuelle en UFR sciences.

Les travaux pratiques sur rats vivants sont en lien direct avec l'enseignement dispensé au cours des 2 années de DUT ABB. Ils illustrent les régulations des grandes fonctions physiologiques, ici le système nerveux central.

Notre projet vient compléter les procédures d'un projet autorisé précédemment en y apportant une nouvelle procédure sur l'étude du comportement animal.

680 rats sur 5 années seront utilisés.

Notre projet respecte le principe des « 3R » :

Le remplacement est utilisé si possible car des appareils de monitoring modernes permettant des simulations d'expériences ont été acquis, cependant toutes les manipulations ne sont pas disponibles en virtuel et aucune simulation ne pourra remplacer le geste technique acquis, comme ici.

La réduction du nombre d'animaux :

- Plusieurs binômes travaillent sur des modalités différentes au cours du TP, mettant en commun leurs résultats au cours d'une même séance (donc une réduction du nombre de lots nécessaires)
- Un animal euthanasié en fin de séance servira aux prélèvements d'organes pour l'histologie ou pour l'étude de l'anatomie.

Le raffinement : les conditions d'hébergements respectent la directive 2010/63/UE (acclimatation de 7 jours, eau et nourriture à volonté, enrichissement, rythmes réguliers jour/nuit, hébergement par lot en cage respectant les dimensions minimales)

17772 L'asthme est une maladie très fréquente des voies respiratoires qui touche 300 millions personnes dans le monde. Le terme « d'asthme sévère » s'applique aux patients présentant un asthme dont le contrôle est impossible malgré des traitements inhalés à fortes doses, dont l'observance et la technique d'inhalation est bonne, et malgré une gestion optimale des comorbidités. Un des besoins

non couverts dans l'asthme sévère est la prévention efficace des exacerbations. Ces exacerbations sont des épisodes caractérisés par une majoration des symptômes d'essoufflement, de toux, de respiration sifflante ou d'oppression thoracique et par une diminution de la fonction respiratoire. L'asthme est caractérisé par une hyperréactivité, une inflammation et un remodelage bronchique. Le remodelage bronchique est un changement structurel qui comprend entre autre des altérations de l'épithélium, des modifications de la matrice extracellulaire, un épaississement de la membrane basale, une hyperplasie des cellules à mucus, et une augmentation de la taille du muscle lisse bronchique (MLB).

La taille du muscle lisse bronchique est une valeur très importante car son augmentation est associée à une fonction respiratoire dégradée et à un taux d'exacerbation plus élevé. Les muscles lisses des bronches d'asthmatique se caractérisent par l'excès de prolifération cellulaire dont les mécanismes sont encore inconnus. Les données de littérature ont déjà mis en évidence un lien entre la taille du muscle lisse bronchique et l'augmentation de la masse mitochondriale. L'augmentation de la masse mitochondriale est un support pour la prolifération des cellules du muscle lisse bronchique.

Le but de ce travail est d'étudier si le blocage du métabolisme des acides gras est capable de diminuer les symptômes de la maladie dans le modèle murin de l'asthme allergique chronique.

Dans notre projet, nous accordons la plus grande importance au respect de la règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer). Les mesures mises en place sont les suivantes : 1) Réduire : se souciant de réduire le nombre des animaux en expérimentation, nous avons calculé le nombre de souris minimal par groupe pour obtenir des résultats significatifs, 160 souris seront incluses et nous réaliserons de multiples études ex vivo sur différents organes et selon différentes techniques. 2) Raffiner : pour diminuer la souffrance et l'angoisse des animaux, des dispositifs sont prévus (anesthésie pour les instillations, analgésie et anesthésie pour les mesures des paramètres respiratoires, raffinement des conditions d'hébergement : les animaux hébergés en groupe sociaux, le milieu enrichie- les bâtons, les copeaux..., l'accès à la nourriture et à l'eau) et nous avons soigneusement décrit des points limites en relation avec notre protocole (critères de perte de poids, comportement anormal ou difficulté respiratoire). 3) Remplacer : En raison de la complexité de la communication intercellulaire menant à la maladie, il n'existe pas de modèle in vitro qui permet d'estimer l'évolution du remodelage bronchique dans l'asthme suite au blocage du gène clé de la biogénèse mitochondriale. L'utilisation du modèle d'asthme chronique murin dans nos études nous donnera une meilleure compréhension des phénomènes.

17773 Au cours du siècle dernier, le cancer du poumon est passé de la catégorie des maladies les plus rares à celle des cancers les plus courants et à la première cause de décès par cancer dans le monde, représentant environ 19 % de tous les décès par cancer. L'une des principales raisons de ce mauvais pronostic est un diagnostic tardif. Les résultats d'un traitement précoce de la maladie sont nettement meilleurs. C'est ce qui explique l'introduction du scanner et la nécessité d'un diagnostic rapide, sûr et précis.

La biopsie pulmonaire est un outil indispensable dans l'évaluation des anomalies pulmonaires en raison de sa grande précision diagnostique et de sa nature moins invasive que la chirurgie. La biopsie transthoracique exige qu'une aiguille soit passée à travers la peau dans les poumons pour retirer un petit morceau du tissu suspect. En 2008, plus de 50 % de toutes les biopsies du poumon et de la plèvre ont été réalisées avec cette technique. Elle est généralement effectuée sous contrôle scanner par un radiologue interventionnel afin de prélever un échantillon de tissu d'une lésion pulmonaire suspecte pour établir un diagnostic. Le pneumothorax reste la complication la plus courante de cette biopsie et peut apparaître dans 12 à 45 % des procédures. Le pneumothorax est une accumulation anormale d'air dans le thorax qui provoque le désaccouplement du poumon de la paroi thoracique. En raison de la perforation du poumon par l'aiguille, l'air peut s'échapper par le trou créé par l'aiguille et provoquer un pneumothorax. Si le pneumothorax ne se résorbe pas de lui-même, le patient aura besoin d'un drain thoracique pour traiter celui-ci. Il s'agit d'une procédure invasive qui nécessite une hospitalisation et des radiographies intermittentes du thorax pendant plusieurs jours.

Le système Selio Sealant est un nouveau dispositif médical développé pour réduire le risque de pneumothorax lors des procédures de biopsie pulmonaire. Le système délivre une petite quantité d'hydrogel juste sous la surface du poumon avant d'effectuer la biopsie afin de former un bouchon protecteur autour de l'aiguille de biopsie pour éviter les fuites d'air. Lorsque l'on retire l'aiguille à biopsie, le bouchon d'hydrogel remplit le trajet de la biopsie, empêchant ainsi un pneumothorax.

L'objectif de cette étude est d'évaluer la cinétique de la dégradation et de la migration de l'hydrogel Selio dans le site intramusculaire et le poumon chez le rat, ainsi que la biocompatibilité. La composition de ces hydrogels a été définie afin de trouver le meilleur compromis en termes de biocompatibilité, de réaction inflammatoire, de cinétique de résorption et d'intégration tissulaire.

De nombreux modèles *in vitro* ont été mis en place pour étudier la dégradation d'un matériel. Cependant, les interactions matériel-hôtes sont importantes et nécessitent une étude *in vivo*.

- Remplacer : Les données manquantes sur la biocompatibilité, la dégradation de matériel au sein du parenchyme pulmonaire ne peuvent être menées que sur l'animal entier vivant : la réaction inflammatoire, hémostatique et hémodynamique sont des processus vivants et dynamiques, mettant en jeu des mécanismes complexes qui ne peuvent être reproduits *in vitro*.

- Réduire : Des études *in vitro* ont été menées au préalable afin de sélectionner les formulations d'implants les plus intéressantes à tester *in vivo* pour réduire au maximum le nombre de tests et le nombre d'animaux. De plus des études bibliographiques ont été menées afin de choisir au mieux le modèle animal et le matériaux contrôles (BioSentry). Afin de réduire le nombre d'animaux, les mêmes animaux seront utilisés pour l'étude de biocompatibilité et l'étude de biodégradation de l'hydrogel.

- Raffiner : 51 rats seront inclus dans l'étude. Tout le projet sera conduit dans des locaux agréés, avec du personnel dédié et expérimenté. Un protocole précis de prémédication, d'analgésie, d'anesthésie est mis en place. Les rats auront une période d'acclimatation d'au moins une semaine avant l'implantation. Ils seront hébergés dans une animalerie conventionnée, avec eau et alimentation *ad libitum*, dans des conditions de température et d'hygrométrie contrôlées, avec un cycle jour/nuit de 12h.

L'injection d'hydrogel sera réalisé sous anesthésie générale avec analgésie préopératoire et post-opératoire par un vétérinaire.

Les animaux seront observés quotidiennement : état général, alimentation, abreuvement, nettoyage, respiration, morbidité et mortalité.

En cas d'animal considéré comme anormal, la personne en charge des observations :

-manipulera l'animal pour confirmer ou infirmer cet état

-Toutes anomalies cliniques seront signalées au vétérinaire pour un examen clinique complet si nécessaire.

La douleur et le bien-être sont évalués selon des paramètres précis. En cas de signe de douleur importante, des antalgiques seront administrés jusqu'à disparition des signes. Si une souffrance et/ou une détresse de l'animal est mise en évidence, des mesures seront directement mise en place : fin de la procédure, traitement afin de soulager la souffrance.

Les animaux seront hébergés en cage collective, dans un milieu enrichi avec des maisonnettes, de la paille, du coton et des bois à ronger. Différents enrichissements seront proposés en alternance pour introduire de la nouveauté.

17774 Développée depuis 1947, l'insémination animale (IA) est aujourd'hui une pratique de reproduction incontournable chez les bovins avec plus de 8 millions d'IA réalisées chaque année en France, principalement en élevages laitiers. Parallèlement, d'autres biotechnologies de la reproduction ont été développées dans le cadre des schémas d'amélioration génétique avec notamment une utilisation croissante des technologies de l'embryon depuis les années 1980. Simultanément à ces évolutions zootechniques, la relation que les hommes entretiennent avec les animaux a beaucoup évoluée, par l'accroissement des animaux de compagnie (63 millions en 2016 contre 26 millions en 1988 en France) et l'exode rural. La notion de bien-être animal (BEA) est apparue aux alentours de

1960, étant d'ailleurs à cette époque davantage une notion de bienveillance que de bien-être. Cependant, ce n'est qu'en 2015 que le caractère sensible de l'animal est mis en avant et débouche au statut de l'animal comme être vivant doué de sensibilité. Employant une grande partie des animaux domestiques présents sur le territoire français le monde agricole a vu ses techniques pointées du doigt. Le secteur de la reproduction ne déroge pas à la règle, avec par exemple la remise en cause de l'IA.

À la vue de ce contexte et du manque de connaissances sur ce sujet, il convient de mener des études pour évaluer l'impact de ces technologies sur le BEA. L'objectif est de mener une étude exploratoire visant à préciser les mesures pertinentes à effectuer pour évaluer l'impact des pratiques de production et de transfert d'embryons sur le BEA des bovins. Le choix de ces technologies se justifie par l'absence de références scientifiques sur le sujet mais aussi par le fait qu'elles requièrent un ensemble d'actes successifs représentatif des pratiques de reproduction actuelles chez cette espèce, dont l'IA. Le bien-être de ces génisses sera évalué de façon multicritère par le recueil de phénotypes physiologiques et comportementaux. Pour les besoins expérimentaux 10 génisses de race Holstein, âgées de 1 à 2 ans, seront recrutées pour suivre un protocole de production (procédure expérimentale 1) et de transfert d'embryons (procédure expérimentale 2). Parmi les indicateurs mesurés pour le BEA, seules des prises de sang régulières font l'objet d'une procédure expérimentale (procédure expérimentale 3), les autres observations étant non invasives. Ce projet respecte la règle des 3 R :

Remplacement : aucun système ex vivo permet de mesurer l'impact de ces technologies sur le BEA.

Réduction : l'étude étant exploratoire, il n'est pas possible d'estimer un effectif minimum nécessaire. L'effectif d'animaux utilisé a donc été déterminé pour avoir un minimum de variabilité individuelle mais également par des raisons pratiques et organisationnelles. Toutefois, chaque animal étant son propre témoin ceci permet de diminuer le nombre d'animaux nécessaires à l'expérimentation.

Raffinement : La finalité de cette étude est de raffiner les technologies de la reproduction. Toutefois, selon les pratiques actuelles, une anesthésie épidurale est systématiquement pratiquée lors des procédures de collecte et de transfert d'embryons. De plus, les génisses utilisées dans ce projet seront placées sous surveillance quotidienne (activité, comportement) et hébergées dans une stabulation répondant aux normes de bien-être animal chez cette espèce (10m² par animal avec un accès aisé à l'auge et aux points d'abreuvements, présence de tapis caoutchouc derrière pour le confort des aplombs, accès à des brosses latérales et dorsales. . .).

17775 Le foyer de la pandémie de Covid-19 est né il y a un an, à Wuhan, en Chine. Aujourd'hui le SARS-CoV-2 (coronavirus responsable de la maladie) continue de se répandre à travers le monde: il est responsable à ce jour de plus de 68 millions cas d'infection et près de 1.6 millions de décès. Pour contenir cette avancée du virus, de nombreux pays ont adopté des mesures sanitaires parmi lesquelles on peut citer la distanciation physique, le lavage des mains, l'identification de chaque cas et de chaque contact par des tests de dépistage. Certains pays, les plus touchés, ont toujours recours à des mesures de confinement plus ou moins strictes, afin de contenir/ralentir la propagation du virus et soulager la pression énorme subie par les hôpitaux, les unités de soins intensifs et les agents de santé. Les espoirs de vaincre la maladie se tournent désormais vers les vaccins dont les récents progrès sont prometteurs. Il y a maintenant un réel espoir que les vaccins - en combinaison avec d'autres mesures de santé publique éprouvées et testées - aideront à lutter contre cette pandémie.

Une part importante des vaccins récemment développés contre le SARS-CoV-2 est destinée à générer une réponse anticorps vis-à-vis de protéines virales de surface du virus. Ces protéines sont variables au cours du temps pour un coronavirus donné et varient en fonction des espèces de coronavirus. Les vaccins développés actuellement contre le SARS-CoV-2 ne seront donc peut-être pas tout aussi efficaces dans quelques mois si la circulation des souches de SARS-CoV-2 perdurait. De même, ils pourraient ne pas être efficaces sur le prochain coronavirus émergent.

Le présent projet se propose d'évaluer l'efficacité d'un vaccin produit à partir d'une protéine conservée au sein de la famille des coronavirus, qui oriente la réponse immunitaire vers une réponse cellulaire (en plus de la production d'anticorps) en stimulant certaines catégories de cellules (les lymphocytes T) responsables de la destruction des cellules infectées. Pour évaluer l'efficacité de ce vaccin, nous aurons recours à des hamsters dorés qui présentent une forte sensibilité au SARS-CoV-2 (atteintes respiratoires, perte de poids) ainsi qu'une forte réceptivité (multiplication du virus dans les poumons) et qui focalisent donc particulièrement l'attention des chercheurs en matière d'évaluation de l'efficacité de nouvelles molécules thérapeutiques, de vaccins. Outre l'évaluation de l'efficacité du vaccin vis-à-vis du SARS-CoV-2, nous envisageons de tester, dans un second temps, ce vaccin contre le SARS-CoV-1.

Pour les deux contrôles d'efficacité, des groupes de 10 hamsters seront donc vaccinés à deux reprises à 1 mois d'intervalle, puis seront infectés par voie intra-nasale avec une souche de SARS-CoV-2 ou de SARS-CoV-1. Les vaccins seront testés seuls ou en association avec des adjuvants (substances permettant d'augmenter la réponse immunitaire). A l'issue de l'expérimentation, nous évaluerons la capacité du vaccin à modifier les effets de la maladie (réduction de la perte de poids, réduction des signes cliniques et de la charge virale dans une sélection d'organes d'intérêt) et la capacité des animaux vaccinés à produire des anticorps vis-à-vis des SARS-CoV.

Le nombre de hamsters engagés dans ces expériences est évalué à 50 pour l'évaluation de l'efficacité vis-à-vis du SARS-CoV-2, et de 30 à 50 pour l'évaluation de l'efficacité vis à vis du SARS-CoV-1 (fonction des résultats de la première évaluation), soit 100 animaux maximum. Ces hamsters seront hébergés en cage de 3 à 5 individus avec un enrichissement composé de nombreux tunnels, abris (afin de satisfaire leur besoin de cachette), cellulose, et de bâtonnets de bois à ronger. Un contrôle de leur état de santé sera assuré tous les jours. Des points limites précis et suffisamment précoces pour leur éviter toute souffrance prolongée et inutile ont par ailleurs été définis.

17776 La maladie hémorragique virale (VHD ou viral hemorrhagic disease) dans sa forme classique a émergé en 1984 en Chine et est apparue en France durant l'été 1988. Il s'agit d'une hépatite virale sévère du lapin sauvage ou domestique. Due à un calicivirus (nommé RHDV ou Rabbit Hemorrhagic Disease Virus), la maladie est généralement septicémique et touche surtout des lapins adultes ou préadultes. La VHD est enzootique dans les populations de lapins sauvages d'Europe, d'Australie et de Nouvelle-Zélande. Sa transmission, très rapide, a lieu essentiellement par voie oro-fécale et par contact direct.

Elle fait partie des maladies transmissibles des lagomorphes considérées comme majeures du point de vue socio-économique (liste B des maladies notifiables à l'OIE, l'Office International des Epizooties).

Il n'existe aucun traitement contre cette affection.

Chez des lapins non vaccinés, cette hépatite virale dans sa forme classique est habituellement responsable de 30 à 90 % de mortalité en région d'épizootie. Après une incubation de 2 à 5 jours, le lapin meurt. Seul le développement de vaccins efficaces a permis de la contrôler rapidement et d'enrayer des pertes économiques importantes de la VHD dans sa forme classique.

En 2010, plusieurs dizaines de déclarations sur le manque d'efficacité des vaccins existants contre la forme classique de la VHD sont parvenues à l'Agence Nationale du Médicament Vétérinaire dans le cadre de la pharmacovigilance. Les mortalités enregistrées dans les élevages touchés varient entre 10 et 30%. Des analyses phylogénétiques ont permis de mettre en évidence l'apparition d'un nouveau variant (nommé RHDV variant 2010) formant un nouveau groupe génétiquement distant des autres calicivirus connus. En 2011 les foyers se sont multipliés dans l'ouest de la France puis cette forme variante de la maladie a rapidement diffusé vers l'Est et a touché les pays voisins (Italie, Belgique). La faune sauvage de lapins de garenne n'est pas épargnée. Depuis 2017 une augmentation de la virulence de ce virus est rapportée avec des taux de mortalité comparables à ceux de la souche classique.

Notre laboratoire a développé un vaccin permettant de lutter contre les deux formes de la maladie, il contient d'une part la souche classique inactivée de la VHD et d'autre part la souche variante

inactivée de la VHD. Ce vaccin a reçu une autorisation de mise sur le marché délivrée par l'Agence Nationale du Médicament Vétérinaire en 2015.

Notre laboratoire a également développé un vaccin contenant uniquement une nouvelle souche variante hypervirulente inactivée de la VHD, cet autre vaccin a reçu une autorisation temporaire d'utilisation délivrée par l'Agence Nationale du Médicament Vétérinaire en 2020.

Ces autorisations définissent les méthodes de production et de contrôle des vaccins, et par conséquent le nombre d'animaux requis pour chaque procédure expérimentale.

Notre objectif est de fabriquer des vaccins efficaces contre les souches récentes et virulentes de RHDV.

Les contraintes biologiques et réglementaires justifiant notre recours à l'expérimentation animale dans le cadre de ce projet sont les suivantes :

- La méthode de culture du virus : à l'heure actuelle, la réplication du RHDV, nécessaire à la production d'un vaccin inactivé de la VHD (constitution des lots de suspensions virales rentrant dans la formulation du vaccin) ne peut être obtenue que chez des lapins sensibles. En effet, dans les dernières décennies, tous les essais de multiplication du RHDV en culture cellulaire ou sur oeufs embryonnés de poulet, qui auraient permis de s'affranchir de l'animal pour la production du vaccin inactivé, sont restés infructueux. Pour obtenir du virus RHDV, la maladie doit donc impérativement être reproduite expérimentalement chez des lapins sains et sensibles par inoculation d'un broyat d'organes de lapins infectés.

La suspension virale est ensuite préparée à partir de préparations homogénéisées de foies (organe contenant le titre viral le plus élevé) prélevés chez ces lapins inoculés dans les 4 jours suivant l'inoculation (la maladie évoluant sur un mode majoritairement aigu ou suraigu, les manifestations cliniques sont généralement très discrètes et limitées aux quelques heures précédant la mort, mais il est alors possible d'euthanasier l'animal de façon anticipée pour des raisons de bien-être animal). Cette méthode de production est celle recommandée par la monographie de la pharmacopée européenne, ainsi que par le manuel terrestre de l'OIE.

Les autres technologies disponibles qui ne nécessitent pas d'animaux, telle que le vaccin recombinant, ne permettent pas la mise en place d'une immunité rapide (trois semaines en utilisant le virus de la myxomatose comme vecteur, alors que nos vaccins inactivés apportent une protection dès 1 semaine après injection). Ils ne sont pas adaptés pour contrôler rapidement la mortalité fulgurante observée lors d'épisodes cliniques chez les lapins, entraînant parfois une mortalité considérable en quelques jours.

- Les expérimentations réglementaires exigées par les termes de l'autorisation de mise sur le marché, à effectuer sur l'animal pour contrôler la qualité de chaque lot de vaccin
- L'étude de la virulence de nouvelles souches identifiées sur le terrain, pour étudier l'impact de mutations potentielles des virus.

Le nombre de lapins nécessaires est défini par l'autorisation de mise sur le marché délivrée par les agences du médicament en Europe. Environ 11 450 lapins seront utilisés pour l'ensemble des expérimentations nécessaires sur 5 ans pour garantir la mise à disposition de vaccins efficaces.

Afin de réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux, les mesures suivantes sont appliquées :

- Respect des normes d'hébergement (taille des cages, densité etc.) spécifiées dans la directive 2010 63 UE ;
- Application de conditions d'ambiance en accord avec l'âge et l'espèce (température, éclairage, hygrométrie) ;
- Fourniture d'eau et d'aliment (adapté aux besoins d'entretien ou de croissance des lapins) sans restriction ;
- Contention des lapins dans des box isolés prévus à cet effet par du personnel qualifié ;
- Mise en place d'un suivi clinique rapproché par du personnel formé à l'expérimentation animale ;

-Mise en place d'une procédure d'évaluation des points limites spécifiques du lapin permettant d'euthanasier les animaux de façon anticipée.

-Mise en place de tuyaux en PVC, diffusion de musique, distribution de pebble toys (gallettes de fruits compressés) afin d'enrichir le milieu des animaux

17777 Les pneumonies virales et bactériennes restent un problème majeur de santé publique, notamment chez les personnes âgées. Le vieillissement s'accompagne d'un phénomène d'immunosénescence qui favorise la susceptibilité aux infections. Notre objectif est de mieux comprendre ce phénomène et d'optimiser la réponse anti-infectieuse chez les personnes âgées. Nous nous intéressons aux infections par le virus de la grippe et par le pneumocoque (*Streptococcus pneumoniae*).

A ce jour, aucun système *in vitro* ne permet de reproduire les interactions hôte-virus et hôte-bactérie aboutissant à la physiopathogénèse. Il est admis que le modèle de la souris est pertinent pour décrire la physiopathologie associée à l'infection par le virus grippal et par le pneumocoque. L'évaluation de l'efficacité de composés antiviraux ou antibactériens peut être évaluée dans ce modèle. Les études *in vivo* sont requises avant tout passage à l'homme.

La sénescence cellulaire est un phénomène naturel lié au stress (oxydatif, métabolique) qui s'amplifie avec l'âge et dont l'impact sur les réponses immunes, notamment anti-infectieuses, et sur le contrôle des réponses inflammatoires est encore mal compris. Notre objectif est double. Nous souhaitons mieux cerner l'impact de l'infection respiratoire aiguë sur le processus de sénescence cellulaire, et ce en fonction de l'âge. Nous souhaitons également appréhender les conséquences de la sénescence cellulaire (naturelle ou liée à l'âge) sur les mécanismes de défense et la physiopathologie associée à l'infection. Ce programme pourrait conduire au développement de nouvelles méthodes permettant de contrôler les pneumonies d'origine infectieuse.

Trois procédures expérimentales sont décrites : Impact de l'infection sur la sénescence cellulaire (procédure 1) et rôle des cellules sénescents sur les mécanismes de défense et la physiopathologie liée à l'infection (procédures 2 et 3). Concernant le deuxième objectif, les cellules sénescents seront éliminées grâce à une approche pharmacologique et une approche génétique. Nous proposons un traitement à court terme (procédure 2) et un traitement à long terme (système de mini-pompe osmotique, procédure 3).

Notre équipe bénéficie actuellement d'une autorisation pour travailler sur le virus influenza A et sur *S. pneumoniae*.

Ce projet expérimental répond aux exigences des 3R.

Remplacement : il n'existe pas de méthode de substitution pour étudier les effets physiopathologiques de l'infection par le virus grippal et le pneumocoque et pour évaluer l'efficacité de médicaments. Le modèle souris est pertinent pour ce type d'étude.

Réduction : Un nombre minimal et homogène d'animaux par groupe sera utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique. Les expériences seront répétées 2 fois avec un nombre de 5 à 8 animaux par groupe expérimental. Au total, 2788 souris seront nécessaires. Cette utilisation maximise les données obtenues à partir de chaque animal, afin de limiter ou d'éviter l'utilisation subséquente d'animaux supplémentaires, et ce, sans pour autant compromettre le bien-être animal. Raffinement : Le raffinement est obtenu par (i) la mise au point de procédures rigoureuses, (ii) la formation du personnel, (iii) un suivi quotidien de l'état de santé des animaux (iv) le recours à des procédures non invasives et non douloureuses.

17778 Les désordres vestibulaires sont des pathologies liées en premier lieu à des atteintes du vestibule, organe de l'équilibration localisé dans l'oreille interne. Ils se caractérisent par des sensations de vertige, des déficits posturo-locomoteurs pouvant conduire à des chutes, des mouvements incontrôlés de l'œil, ainsi que des altérations cognitives. Ils sont souvent accompagnés de nausées et de vomissements. Ces symptômes peuvent avoir des causes multiples, tels que des accidents vasculaires cérébraux, des infections ou des traumatismes de l'oreille, ou encore des atteintes ototoxiques (composés toxiques pour l'oreille interne). Ils peuvent aussi résulter tout simplement du

vieillesse normale de l'oreille interne. La prévalence des troubles vestibulaires est importante puisqu'elle représente 3 % de l'ensemble des prescriptions médicales chez les plus de 50 ans et près de 1 % des urgences hospitalières. La prise en charge thérapeutique des troubles vestibulaires associe approches pharmacologiques et physiothérapeutiques. Les solutions pharmacologiques restent peu efficaces par manque de spécificité.

Un effet antivertigineux de la levothyroxine (T4) a récemment été démontré sur modèle rongeur de vestibulopathie périphérique. Le présent projet propose de tester chez le rongeur, l'effet anti vertigineux (AV) des hormones thyroïdiennes (T3, T4) et de leurs métabolites (TRIAC, TETRAC) sur modèle rongeur de vestibulopathie périphérique. Des lésions vestibulaires de nature excitotoxique seront générées chez le rat adulte par administration transtympanique d'acide Kainique (TTK). Un total de 174 rats adultes mâles sera nécessaire pour atteindre les objectifs de ce projet qui se résument à 1/ évaluer l'effet anti vertigineux des composés T4, T3, TRIAC et TETRAC grâce à des analyses comportementales 2/ identifier les mécanismes et sites d'action de ces composés grâce à des analyses histologiques.

Afin de répondre à la règle des 3R : 1/ Réduction : Nous avons mené au préalable une analyse statistique via le logiciel G-Power afin de déterminer le nombre d'animaux requis pour obtenir des résultats statistiquement exploitables et fiables. Les différentes procédures seront réalisées sur les mêmes animaux, réduisant ainsi le nombre total de rats à utiliser pour l'étude. 2/ Raffinement : Une période d'acclimatation d'une semaine sera appliquée avant le début des tests. La TTK sera réalisée sous anesthésie à l'isoflurane et la température des animaux sera maintenue tout le long de la procédure. L'administration transtympanique n'occasionne pas de douleur post-opératoire et ne nécessite donc pas d'administration d'analgésiques pendant cette période. Les animaux seront injectés avec une solution physiologique avant le réveil visant à suppléer au déficit d'hydratation qui pourrait survenir dans les 24h après la lésion vestibulaire. En période post-opératoire, les animaux feront l'objet d'une surveillance quotidienne par le porteur du projet ainsi que les zootechniciens. Ils auront également accès à une nourriture riche en énergie et seront hébergés en groupes de 2 à 3 rats dans des cages enrichies. L'enrichissement se constitue de plaques de cellulose ainsi que de petites briques de bois. Les plaques de cellulose permettent de solliciter l'instinct de l'animal à nidifier préservant ainsi une activité et un exercice naturel tandis que les briques de bois lui permettent de satisfaire son instinct naturel à ronger. 3/ Remplacement : Aucun test chez l'homme et aucun test in vitro ne peut à l'heure actuelle se substituer aux tests sur modèles animaux de troubles vestibulaires.

17779 Le psoriasis est une maladie chronique, inflammatoire touchant 1 à 2% de la population mondiale. Cette pathologie entraîne des inflammations cutanées importantes caractérisées par des plaques érythémato-squameuses et évolue par des phases de poussées et de rémissions. Aucun traitement permettant la guérison n'est connu. Le traitement proposé permet uniquement de contrôler l'évolution de la maladie, en permettant la régression transitoire plus ou moins complète des lésions. Dans ce projet, nous proposons d'évaluer dans des modèles induits de psoriasis chez la souris les propriétés pharmacologiques et l'efficacité de molécules administrées par voie topique ou systémique.

Avantages: l'ensemble des modèles expérimentaux utilisés dans ce projet est documenté de façon extensive dans la littérature scientifique et est déjà mis en œuvre au sein de nombreux laboratoires nationaux et internationaux. Nos données contribueront à la fois à la validation préclinique de nouvelles molécules à visée thérapeutique et à l'étude des mécanismes d'action de médicaments actuellement utilisés, mais aussi permettront d'enrichir la caractérisation et la compréhension de ces modèles tant d'un point de vue anatomique que fonctionnel.

Domages escomptés: afin de mimer et d'induire un état inflammatoire similaire à celui retrouvé dans le psoriasis, il est possible d'utiliser des agents exogènes (chimiques, biologiques) appliqués sur la peau ou injectés dans la peau. Cet état inflammatoire retrouvé chez des animaux exposés à des agents exogènes est susceptible d'entraîner un certain niveau d'inconfort pour les animaux (par exemple: démangeaisons, sensation de chaleur au niveau de la peau) qui est déjà identifié dans la littérature. Le bien-être des animaux sera attentivement suivi durant toute la durée de la phase

expérimentale grâce à des fiches d'observation/points limites adaptés. Des procédures de prise en charge adaptées seront également mises en place. Des points limites préalablement définis permettront d'assurer un suivi de l'état général des animaux et de mettre en place des interventions précoces et adaptées en cas de souffrance animale.

Méthodes alternatives (principe de remplacement): l'utilisation d'animaux vivants est justifiée par le fait que les modèles décrits dans ce projet visent à étudier les effets de molécules (exemple : molécules chimiques, biologiques...) afin de prédire leur efficacité clinique. Même si des tests in vitro peuvent être réalisés au préalable afin de mettre en évidence les propriétés des molécules testées, ces propriétés devront être confirmées in vivo dans des modèles animaux (étude du comportement de grattage, de l'évolution d'un érythème, de l'infiltration cutanée de cellules immunitaires par exemple). L'utilisation d'animaux (souris principalement) est donc indispensable.

Nombre et type d'animaux; conditions d'hébergement et de soins (principe de réduction et principe de raffinement):

-Choix des espèces: des souris seront utilisées car les modèles expérimentaux décrits dans ce projet ont été caractérisés de façon extensive dans la littérature scientifique chez cette espèce.

-Nombre d'animaux: le nombre d'animaux utilisés dans ce projet a été réduit à son minimum sans compromettre les objectifs du projet. Selon les méthodes d'analyses utilisées et compte-tenu des variations interindividuelles anticipées, un maximum de 10 animaux par groupe sera nécessaire pour permettre une analyse robuste des résultats générés.

Sur une période de 5 ans, et pour les 2 procédures décrites, un maximum de 10600 animaux (dont 600 surnuméraires) sera utilisé pour la réalisation des procédures expérimentales, la formation et/ou le maintien des compétences techniques. Des études statistiques seront réalisées après chaque étude, ceci afin de nous permettre de réduire le nombre d'animaux par groupe expérimental, tout en gardant la puissance et la robustesse du modèle.

-Conditions d'hébergement et de soins:

Les conditions d'hébergement et de soins utilisés ont été choisies et conçues de manière à réduire au maximum toute douleur, souffrance, angoisse ou dommages durables que pourraient ressentir les animaux, en conformité avec les législations françaises et européennes. Les animaux seront hébergés en cage collective pendant la période d'acclimatation (5 jours minimum). Les animaux étant traités directement sur la peau (traitement topique), ils seront mis en cage individuelle en début d'étude pour éviter qu'ils ne se lèchent et ingèrent le composés (et ainsi limiter le passage des composés en systémique). Cette mise en cage individuelle limite également les lésions cutanées supplémentaires due à des bagarres entre animaux. Cependant les cages utilisées permettront un contact visuel, auditif et olfactif entre les animaux. Pour les autres traitement (systémique), les animaux seront hébergés en cage collective (par sexe) tout au long de l'étude.

L'hébergement est enrichi par la mise en œuvre de techniques adaptées aux besoins spécifiques et individuels des animaux leur permettant de reproduire au mieux leur comportement naturel (ex : présence de tunnels). De la musique peut également être diffusée dans l'enceinte d'hébergement. La stratégie d'enrichissement est régulièrement revue et mise à jour.

Ce modèle étant un modèle d'inflammation induite, l'utilisation d'anti inflammatoire serait contre productif ; En cas d'altération de l'état de l'animal, la surveillance sera rapprochée et les animaux seront soignés en fonction de la sévérité de la douleur observée, sans altérer les objectifs de l'étude.

Le contrôle des animaux sera assuré quotidiennement et des points limites ont été établis afin d'anticiper toute dégradation de l'état de santé général des animaux et, le cas échéant, d'appliquer des protocoles de soins adaptés.

17780 La dépression majeure est aujourd'hui une maladie psychiatrique extrêmement répandue et représente la première cause d'invalidité dans le monde. Elle est précipitée par le stress et les événements de vie néfaste, notamment la maltraitance infantile, qui représente le plus grand prédicteur pour le développement de dépression et de suicide. Cependant, les conséquences à long terme de la maltraitance infantile varient d'un individu à l'autre et certains vont présenter la

capacité de s'adapter en réponse à un stress précoce et éviter ses conséquences néfastes, c'est le concept de résilience au stress précoce. Comprendre les mécanismes neurobiologiques qui contribuent à la résilience est primordiale afin de mettre en évidence des facteurs de protection face au développement de psychopathologies qui pourront servir de nouvelles cibles thérapeutiques pour cette population de patient. Le système noradrénergique du locus-coeruleus (LC-NE) joue un rôle majeur dans la résilience au stress chez l'adulte. Par ailleurs, bien que certaines études aient montré une dérégulation du LC-NE dans des modèles animaux de stress précoce, la compréhension de son implication dans la résilience au stress précoce est manquante.

L'objectif de ce projet est de mettre en place un modèle de stress précoce chez la souris (modèle de séparation maternelle associé à un environnement pauvre en litière) afin de dissocier des groupes d'animaux susceptible vs résilient en fonction de leur phénotype comportemental à l'âge adulte et d'étudier si des altérations différentielles sur le système LC-NE peuvent être mises en évidence.

Seule l'expérimentation in vivo, permettant d'étudier les conséquences neurobiologiques du stress et mettre en évidence des comportements anxio-dépressif, nous permettra de répondre à cette question.

Pour cela nous utiliserons une approche comportementale dans le but d'étudier les conséquences du stress précoce sur le développement de comportement anxio-dépressif à l'âge adulte ainsi que des techniques d'immunohistochimie et de biologie moléculaire pour étudier les conséquences du stress précoce sur le système LC-NE en fonction de la susceptibilité au stress. Ces études seront menées sur un total de 300 souris sauvages C57BL/6J sur une période de 4 ans.

Dans le respect de la règle des '3R', les différentes procédures expérimentales ont été consciencieusement pensées et élaborées afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en permettant d'obtenir des résultats statistiquement satisfaisants. De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'anxiété infligées aux animaux, des points-limites ont été établis, entraînant l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire.

Les résultats de ce projet permettront de mieux comprendre le rôle du système LC-NE dans la résilience au stress précoce et pourront servir de base pour développer des modèles de manipulation génétique ou fonctionnelle de ce système dans le but d'enrayer les conséquences à long terme du stress chronique et de promouvoir la résilience.

17781 Le diabète est une maladie chronique caractérisée par une hyperglycémie chronique. En 2019, l'Organisation Mondiale de la Santé a estimé le nombre de personnes atteintes de diabète à 463 millions. Il est prévu que d'ici 2030, le diabète sera la septième cause de décès dans le monde. Le diabète est classé selon son origine en deux types : le type 1 et le type 2.

Le traitement du diabète de type 1 repose exclusivement sur de injections pluriquotidiennes d'insuline. Pour ces patients, la maladie est toujours présente dans la vie quotidienne, nécessitant des mesures de glycémie, des calculs d'apport en glucides et des injections d'insuline. Le traitement du diabète de type 1 impacte notablement la qualité de vie du patient. De plus, malgré une insulinothérapie intensive, les complications microangiopathiques demeurent une réalité pour les patients diabétiques. De plus, une faible proportion de patients développent un diabète dit instable une forme rare de diabète de type 1 exposant les patients à une forte variabilité glycémique et à des événements métaboliques graves tels que des comas hypoglycémiques ou des acido-cétoses.

La transplantation d'îlots ou la thérapie cellulaire du diabète de type 1 est une technique maintenant validée de thérapie cellulaire pour la prise en charge des patients diabétiques instables. On estime à plus d'une centaine le nombre d'implantations d'îlots de Langerhans par an en France. La transplantation d'îlots représente un espoir pour des millions de patients diabétiques de type 1 offrant la perspective d'une régulation endogène de la glycémie sans aucun recours aux injections d'insuline.

Le protocole de greffe consiste en une préparation d'îlots de Langerhans à partir du pancréas d'un donneur en état de mort cérébrale. La faiblesse de cette thérapie reste la rareté des organes, la perte à long terme de la fonctionnalité du greffon d'îlots d'origine multifactorielle (44% d'insulino-

indépendance des patients transplantés 6 mois après la greffe) et la nécessité du recours à une immunosuppression à vie. Pour palier la perte de fonctionnalité des îlots initiale et sur le long terme, on peut alors imaginer améliorer les capacités physiologiques des îlots de Langerhans, grâce à l'utilisation de thérapeutiques innovantes.

La photobiomodulation est une nouvelle approche thérapeutique innovante en plein développement. L'une des équipes partenaire du projet est pionnière dans l'utilisation de la photobiomodulation pour ralentir le développement de la maladie de Parkinson.

Le projet NIRILOT consiste à évaluer l'effet de la photobiomodulation (entre 670 et 810nm) dans l'objectif d'améliorer la résistance des îlots de Langerhans et de leur environnement aux stress inhérents au protocole de greffe, favorisant ainsi leur reprise.

Dans ce projet, nous prévoyons l'utilisation de 150 rats Wistar, un modèle classiquement utilisé pour l'isolement d'îlots pancréatiques par digestion enzymatique, et nous avons le savoir-faire au laboratoire pour l'induction d'un diabète. Nous avons appliqué la règle des 3R pour réduire le nombre d'animaux au maximum, remplacer ce modèle avec une partie exclusivement in vitro puis ensuite in vivo et enfin raffiner pour limiter tous signes de douleur ou de détresse animale.

En effet, dans un souci de respect de la règle des 3R, nous avons:

Réduit au minimum le nombre d'animaux, pour atteindre la puissance statistique recherchée.

Raffiné en améliorant l'hébergement des animaux avec milieu de vie enrichi, observation quotidienne par l'équipe responsable de l'animalerie (comportement, aspect, détection de toute souffrance).

Remplacé: cette étape intermédiaire est essentielle après les tests sur lignées cellulaires et avant les tests sur îlots humains.

17782 Au cours de la dernière décennie, les insecticides néonicotinoïdes (néonics) ont été utilisés intensivement dans de nombreux pays. Les études chez l'animal suggèrent que les néonics peuvent être toxiques pour le système nerveux et qu'une exposition à ceux-ci favorise la croissance de tumeurs du foie et cause des défauts de reproduction. Il est important de noter que le potentiel de perturbation endocrinienne des néonicotinoïdes n'est pas encore connu. Les données sur les effets spécifiques du thiaclopride sur le cerveau, le foie, la thyroïde et les organes reproducteurs, la glande mammaire, les testicules et l'ovaire, ne sont pas bien comprises. Il manque également les données des effets de l'exposition pendant le développement embryonnaire. Nous supposons que les néonics pourraient être des perturbateurs endocriniens et causer des effets transgénérationnels sur les organes hormono-dépendants. Notre objectif global est d'identifier la base moléculaire du mécanisme de l'action du thiaclopride pour créer une vue intégrative des effets des néonicotinoïdes. Dans notre étude nous évaluerons les effets du thiaclopride, un néonicotinoïde couramment utilisé. L'étude intégrative sur le thiaclopride augmentera la compréhension du risque associé à son exposition et aidera à développer les approches préventives pour limiter son impact sur l'environnement et sur la santé humaine. Notre étude mettra en évidence le risque potentiel de l'utilisation du thiaclopride sous sa forme actuelle dans l'agriculture. La dose quotidienne autorisée pour le thiaclopride pourrait être reconsidérée sur la base de nos données. Nous fournirons nos données aux organismes autorisés pour prendre les décisions correctes.

Ce projet de recherche a été pensé en respectant au mieux la règle des 3R :

-Remplacement : des études préliminaires ont été réalisées sur modèles in vitro et nous ont permis de définir la molécule à tester (parmi 8 autres) et d'estimer une échelle de doses en évitant d'atteindre une dose potentiellement toxique pour l'organisme. Cependant, les études de connexion des systèmes de reproduction, nerveux et de désintoxication ne sont possibles que dans des organismes entiers tels que les modèles animaux. Les cellules cultivées à partir d'organes ne peuvent pas refléter les véritables relations hormone-dépendantes comme c'est le cas dans le corps entier.

-Réduire : Le nombre d'animaux est choisi en fonction du nombre nécessaire pour être statistiquement significatif et scientifiquement irréprochable pour valider les données obtenues à la

fin de la procédure. Une expérience pilote sera réalisée sur un nombre limité d'animaux afin de mieux définir la dose à investiguer pour la suite de nos études. Pour ce projet nous prévoyons un maximum de 1012 souris, mâles et femelles.

-Raffinement : Les animaux seront hébergés dans une structure agréée qui tient compte de l'éthique animale et assure le suivi quotidien. L'hébergement se fait dans des cages de groupes de 2-3 animaux. La procédure est réalisée par un personnel expérimenté. La molécule thiaclopride est diluée dans de l'huile et administrée avec une sonde adaptée. L'état général des animaux est évalué quotidiennement et des points limites sont préalablement définis.

17783 Objectif du projet:

Pseudomonas aeruginosa (P. a) est une bactérie pathogène bien connue. En effet, cette dernière est responsable de sévères infections nosocomiales en milieu hospitalier mais également d'infections chroniques chez les patients atteints de mucoviscidose et de BPCO (broncho-pneumopathie chronique obstructive). Il est ici important de noter que l'infection permanente des poumons de ces patients marque un tournant dans la pathologie puisqu'elle est cause de morbidité et de mortalité. Il est important d'étudier cette bactérie, ainsi que les facteurs de l'hôte importants pour son éradication. Notre projet propose l'utilisation d'inhibiteurs de facteurs de virulence de P. a, connus comme étant délétères dans la réaction inflammatoire pulmonaire. Cette stratégie sera utilisée dans un contexte d'infection aigüe ou chronique afin de mimer les problématiques cliniques (pneumonie, syndrome de détresse respiratoire aigüe, mucoviscidose, bronchopneumopathies).

Nous disposons de modèles in vitro (lignées cellulaires) pour étudier les mécanismes d'élimination qu'engage l'hôte suite à l'infection par P. a. Cependant, la complexité de cette réponse immunitaire nécessite l'emploi de modèles animaux pour appréhender de manière globale l'inflammation pulmonaire mise en place suite à l'infection. Nous avons choisi la souris comme modèle animal car c'est un excellent modèle pour un certain nombre de mécanismes physiopathologiques rencontrés dans l'infection humaine (fibrose pulmonaire, BPCO, mucoviscidose...) et facilement utilisable. Nous utiliserons, pour ce faire, un facteur de virulence de P. a (LasB), différents mutants bactériens de P. a, des inhibiteurs de protéases, et des souris génétiquement modifiées. Les traitements, par voie intra-nasale ou oro-pharyngée (instillations uniques ou répétées), consisteront en l'instillation (sous anesthésie) de médiateurs ou de cellules transgéniques. Toutes les instillations seront faites sous anesthésie.

Le projet se déroulera en accord avec les exigences de remplacement, réduction et de raffinement très fortement encouragées dans la nouvelle directive européenne. Nous disposons de lignées cellulaires qui nous permettront d'identifier les cibles et les mécanismes cellulaires mis en place en réponse à l'infection par *Pseudomonas aeruginosa*. Par la suite, nous confirmerons la véracité de leur(s) rôle(s) dans des modèles souris qui nous permettront également d'évaluer les réponses de l'hôte dans sa globalité (voir ci-dessus). L'expérience de notre équipe dans l'utilisation de ces modèles nous permettra de réajuster le nombre de souris par groupe expérimental (5-8). Nous estimons à 954 le nombre de souris nécessaires pour la durée de notre projet. Nous utilisons des méthodes statistiques paramétriques ou non paramétriques (selon les protocoles) pour l'analyse des résultats, et ceux-ci sont présentés au sein de l'équipe lors de séminaires hebdomadaires, pour une analyse critique et pour affiner le déroulement des expériences complémentaires. Tous les éléments liés au raffinement seront pris en compte. En particulier, Les animaux seront répartis dans des cages par le personnel de l'animalerie dès réception avec un maximum de 6 souris par cage. Du coton sera inclus dans la cage comme mesure d'enrichissement de l'environnement, et les cages seront maintenues en portoir ventilé. L'entretien de la propreté de l'animalerie est également assuré par les animaliers. Il y aura une vérification des paramètres environnementaux (température, hygrométrie) et des niveaux de nourriture et de boisson quotidienne. Enfin, l'examen des points limites sera scrupuleusement respecté, avec en particulier, l'euthanasie systématique des animaux présentant des signes évidents de morbidité ayant atteint leur poids limite, correspondant à 25% du poids initial (voir annexe 2).

4 procédures seront réalisées dans ce projet (voir plus loin). Les procédures 1, 3, et 4 dureront 7 jours, alors que la procédure 2, durera 14 jours. A l'issue de ces procédures, les animaux seront euthanasiés selon les protocoles appropriés, les organes récupérés, et les analyses effectuées.

17784 Les pratiques d'élevage sont intrinsèquement liées à la santé, à la production et au bien-être des animaux. Les coûts d'alimentation représentent jusqu'à 70 % des coûts de production totaux et tous les efforts visant à améliorer l'efficacité de l'alimentation et la production laitière ont non seulement un impact positif sur les performances des animaux, mais aussi sur l'environnement.

La durabilité est une préoccupation mondiale et les ruminants ont un rôle important à jouer dans ce scénario en raison de la fermentation entérique. Le bétail est responsable d'environ 14 % des émissions mondiales de gaz à effet de serre d'origine anthropique, notamment l'oxyde nitreux, le dioxyde de carbone et le méthane.

Le potentiel de réchauffement planétaire du méthane est de 28 à 34 fois supérieur à celui du CO₂ et représente 2 à 12 % de la perte d'apport énergétique alimentaire brut des ruminants.

Les ruminants ont une relation symbiotique avec les microorganismes du rumen, combinant les conditions environnementales optimales pour une bonne fermentation des aliments et la dégradation par le microbiote des aliments pour fournir tous les nutriments nécessaires aux performances des animaux sous forme d'énergie et de protéines. Cependant, cette symbiose entraîne certaines pertes d'énergie (méthane) et de protéines (ammoniac). Ces pertes ont non seulement un impact sur les performances des animaux mais contribuent également à la contamination de l'environnement.

Il existe plusieurs stratégies pour améliorer les performances des vaches et atténuer les émissions de méthane, comme les composés chimiques, les huiles essentielles, les tanins, les produits phytochimiques, etc.

L'objectif de cette étude d'efficacité est de démontrer une augmentation des performances des vaches laitières recevant un mélange d'huiles essentielles dans leur ration quotidienne, en plus de valider leur intérêt pour diminuer les émissions de méthane entérique.

Un total de 28 vaches laitières en lactation, réparties en deux groupes (contrôle vs traitement aux huiles essentielles), seront étudiées au cours de cet essai. Les vaches recevront des concentrés de production contenant ou non des huiles essentielles grâce à un distributeur automatique de concentrés afin de fournir la bonne dose de mélange d'huiles essentielles (2g/VL/jour). L'administration des huiles essentielles devraient se traduire par une réduction de 5 à 10 % des émissions de méthane, ce qui contribuera à un système de production laitière plus durable. Une ration de base constituée de fourrages sera distribuée à volonté en parallèle. Les vaches seront traitées deux fois par jour.

Au cours de cet essai, on évaluera les performances de l'animal, (production laitière, qualité du lait, quantité ingérée). Des échantillons de sang et de jus de rumen seront prélevés pour caractériser l'efficacité d'utilisation de l'azote apporté via l'alimentation, ayant un impact sur les rejets d'ammoniac, et les modifications du microbiote ruminal pouvant être à l'origine des différences de performances observées entre les deux groupes, notamment en termes d'émissions de méthane.

Après deux semaines d'habituation au régime, les vaches recevront le traitement pendant 12 semaines.

Cette expérimentation sera menée dans le respect de la règle des 3R. Le modèle vache étant le sujet d'étude, il n'est pas remplaçable. Toutefois, le nombre d'animaux à recruter est réduit au maximum, sans compromettre la mise en évidence de différences statistiques entre les deux lots. Les conditions de logement des vaches laitières en stabulation répond aux exigences réglementaires et va même au-delà grâce à des équipements permettant un confort optimum des vaches (matelas, brosses...) et un suivi fin de leur santé et de leur bien-être (outils d'élevage de précision). Le recours au maximum à des procédures non invasives ou faiblement invasives, comme l'utilisation de GreenFeed, ou la limitation du nombre de prise de sang au maximum participent également au principe de raffinement.

17785 Les migraines constituent un problème de santé publique ayant un impact négatif majeur dans la vie quotidienne des patients. Les crises de migraine qui concernent 20% des femmes pour 6% d'hommes, sont caractérisées par des céphalées d'intensité modérée ou sévère, unilatérales, pulsatiles, pouvant durer entre 4 et 72 heures en l'absence de traitement. Ces céphalées sont associées à des modifications de la perception sensorielle telles que l'allodynie (douleur provoquée par une stimulation non douloureuse), la phonophobie et/ou la photophobie. Ainsi la physiopathologie de la migraine implique des régions cérébrales multiples pour rendre compte à la fois de la douleur et des troubles sensoriels associés. L'étude des mécanismes physiopathologiques nécessite donc d'avoir recours à l'animal afin de tenir compte de toutes les interactions cérébrales qui entrent en jeu lors d'une crise migraineuse.

Certaines plantes comme la Grande Camomille ont une efficacité reconnue, mais limitée. L'agence européenne de la médecine a depuis longtemps reconnu l'efficacité de celle-ci (appelée aussi Tanacetum Parthenium ou Feverfew) pour soulager les douleurs de migraine. Il a été montré que l'efficacité de cette plante était due à la présence d'un principe actif, le parthénolide. Or naturellement le parthénolide est présent dans la Grande Camomille à une concentration de moins de 1%. Des chimistes ont amélioré le principe d'extraction et ils ont obtenu un extrait concentré entre 3 et 5%. Nous souhaitons pour ce projet comparer les effets de cet extrait avec l'effet de la Grande Camomille non enrichie. Pour réaliser cette étude, nous utiliserons un modèle murin qui mime la phase de céphalée ou mal de tête de la migraine.

Pour respecter la règle des 3R, le nombre d'animaux utilisés a été réduit au maximum. Dans ce but, les animaux auront une période d'habituation à l'expérimentateur et aux tests avant de débiter l'étude comportementale. Cette période d'habituation permet de réduire le stress des animaux lors des tests comportementaux et ainsi de réduire le nombre d'animaux. Par ailleurs, notre modèle nécessite une chirurgie : elle est effectuée sous anesthésie générale (ketamine (100mg/kg)/xylazine (20mg/kg) ou isoflurane 2%), les animaux sont placés sur une couverture chauffante pendant le temps de la chirurgie et leur cornée est protégée par une couche de vaseline. Le temps de chirurgie est optimisé au maximum pour qu'il dure le moins longtemps possible. Les animaux sont gardés dans la pièce de chirurgie en observation jusqu'à leur réveil complet. D'après les études précédentes, notre modèle animal n'entraîne pas de dommages tissulaires. Les dommages attendus, mis en évidence précédemment dans notre modèle, sont une douleur céphalique utilisée pour modéliser la crise de migraine. Le nombre d'animaux dans cette étude tient compte des animaux non répondeurs dans notre modèle mais reste suffisant pour détecter un effet significatif entre les traitements (analyse de variance et tests post hoc paramétriques ou non). Au total, 300 rats seront nécessaires à la réalisation de ce projet. Ils seront mis à mort à la fin des procédures afin de prélever les tissus d'intérêt pour leur analyse.

Avoir un modèle qui se rapproche le plus possible des conditions cliniques pour comprendre les mécanismes moléculaires impliqués permettra par la suite de déterminer les substances et doses pharmacologiques susceptibles d'être une alternative aux traitements proposés aux patients migraineux.

17786 D'après l'organisation mondiale de la santé, la dépression est actuellement la seconde cause d'invalidité dans le monde, et contribue à des causes de mortalités majeures telles que le suicide, les maladies cardiovasculaires et le cancer. De manière importante, la dépression affecte les personnes différemment selon le sexe : les femmes ont deux fois plus de chance de développer la maladie au cours de leur vie. Pourtant, les études précliniques se concentrent généralement sur des individus mâles, pour des raisons pratiques et historiques.

Malgré l'existence des thérapies pharmacologiques (antidépresseurs), leurs résultats restent cependant limités avec 30 à 50% des patients ne répondant pas à ces traitements. L'amélioration de l'arsenal thérapeutique dans le traitement de la dépression représente donc un enjeu de santé publique majeur. Au vu de la résistance aux antidépresseurs de certains patients, il est capital de développer de nouvelles pistes thérapeutiques personnalisées et prenant en compte le facteur du sexe. Ces dernières années, les techniques de neurostimulation sont en train d'émerger. Au laboratoire, nous avons mis au point le traitement par Stimulation Transcrânienne Ultrasonore

répétée (rTUS) dans le traitement de la dépression et sommes en train de faire de même pour le stress posttraumatique (PTSD). C'est une technique qui offre l'avantage d'être non-invasive, et qui permet de cibler une ou plusieurs régions de manière précise. Cependant, l'efficacité à long terme demeure inconnue, ainsi que les mécanismes sous-jacents.

Pour explorer les effets thérapeutiques de la rTUS dans le contexte de la dépression chez les deux sexes, il est avant tout important d'avoir un modèle robuste provoquant un comportement dépressif. C'est pourquoi nous proposons de tester un modèle d'instabilité sociale (IS) récemment validé par un autre laboratoire chez les deux sexes. L'objectif de cette première étude est donc de reproduire ces résultats avant d'évaluer des approches thérapeutiques comme la rTUS ou les antidépresseurs.

Pour cette expérience, 80 souris réparties en 4 lots expérimentaux de 20 souris mâles et femelles.

En application de la règle des 3 R au modèle utilisé dans cette étude :

Raffinement : l'application de l'IS aux animaux peut être qualifiée de sévérité légère : en effet, malgré une durée de 7 semaines, ce protocole est très proche des conditions d'élevage des animaux optimales au regard des normes en vigueur. La différence principale (le stress) consiste à changer les animaux de cage et de s'assurer qu'ils rencontrent les mêmes souris le moins possible. De plus, aucun enrichissement ne sera disponible comme il n'est pas indiqué dans la publication originale. Les animaux stressés et non-stressés seront hébergés séparément, car les contrôles ne subiront pas les changements de cage. Les expérimentateurs sont experts dans la préhension des souris et sont soucieux d'éviter tout stress lors de la réalisation des procédures.

Remplacement : aucune méthode alternative in vitro n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée. Les modèles de dépression chez l'animal, comme modèle de pathologie psychiatrique humaine, repose sur l'observation du comportement de l'animal vivant.

Réduction : les effectifs sont optimisés, les observations comportementales nécessitent une taille d'effectifs suffisant compte tenu de la variabilité inter-individuelle (n=20 sujets par groupe).

17787 La leucémie aiguë myéloïde (LAM) est une forme de cancer qui touche les cellules de la moelle osseuse, qui produisent normalement les globules rouges, les plaquettes et les globules blancs. Dans la LAM, les précurseurs d'une population de globules blancs prolifèrent de façon anarchique, sans "mûrir" (sans se différencier). L'accumulation de ces cellules "immatures" (cellules leucémiques) empêche la production normale des cellules sanguines, ce qui conduit notamment à une anémie (manque de globules rouges et baisse de l'hémoglobine) et une thrombocytopenie (baisse des plaquettes).

L'arsenal thérapeutique dont dispose le clinicien pour freiner le développement de la (LAM) reste, encore à ce jour, limité à l'utilisation de molécules de chimiothérapie qui ne permettent pas malheureusement d'éradiquer cette maladie. Ainsi, environ 60% des patients présentent des leucémies résistantes au traitement conventionnel ou rechutent après la première ligne de traitement. Il apparaît donc crucial d'identifier les aspects génétiques impliqués dans la résistance des cellules leucémiques aux chimiothérapies conventionnelles.

Pour mener à bien notre projet, nous utiliserons deux modèles de souris permettant de reproduire le développement de la LAM (prolifération anarchique des cellules leucémiques dans la moelle osseuse et dans la circulation sanguine). Le premier modèle consistera à injecter des cellules leucémiques dérivées de la moelle osseuse de souris et pour lesquelles nous avons modifiés certains gènes pouvant être impliqués dans la résistance aux chimiothérapies et le second modèle des cellules leucémiques humaines dans des souris immunodéficientes (souris dépourvues de système immunitaire supportant la greffe de cellules humaines sans réaction de rejet).

L'administration des cellules leucémiques se fera par voie intraveineuse (injection non douloureuse dans la veine de la queue de souris éveillée) à des souris mâles adultes qui auront été préalablement irradiées. L'étape d'irradiation est indispensable et permet de « faire de la place » dans la moelle osseuse afin que les cellules leucémiques puissent y développer. Durant les deux semaines qui suivent l'irradiation, les souris seront traitées avec des antibiotiques pour éviter qu'elles ne développent des infections. Dans ces deux modèles, nous pourrons ajouter aux cellules différentes mutations retrouvées chez les patients atteints d'une LAM et, après traitement avec des

agents chimiothérapeutiques par voie intra-péritonéale en suivant des concentrations approuvées chez la souris (injection non douloureuse dans l'abdomen de la souris éveillée faite 8 semaines après l'injection des cellules leucémiques), déterminer les combinaisons qui favorisent l'apparition de la chimiorésistance. Nous suivrons le développement des cellules leucémiques et l'effet des traitements par des prélèvements de sang (prélèvement dans la veine de la joue, non douloureux sur souris éveillée) toutes les deux semaines : ces prélèvements, semblables à des prises de sang, permettent de suivre l'avancée de la leucémie en fonction du taux de cellules leucémiques dans le sang. Dans certains cas, nous réaliserons également un suivi directement au niveau du site de prolifération, c'est-à-dire au niveau de la moelle osseuse, maximum 2 fois pour chaque animal. Ce type de prélèvement sera réalisé sous anesthésie générale et suivi d'un traitement analgésique. Nous regarderons ensuite quels mécanismes des cellules présentant les mutations sont responsables de la chimiorésistance. Enfin, nous utiliserons ces modèles pour tester de nouvelles molécules susceptibles d'améliorer les effets de la chimiothérapie, tout en minimisant sa toxicité globale. Les molécules thérapeutiques seront administrées par voie intra-péritonéale (injection non douloureuse dans l'abdomen de la souris éveillée), par voie intra-veineuse ou par gavage en adaptant les concentrations et la fréquence déjà utilisées chez l'Homme. Au terme de notre projet, les résultats obtenus devraient contribuer à l'amélioration des traitements proposés aux patients.

Tout au long de ce projet, nous veillerons à appliquer la règle des 3R (remplacement, réduction, raffinement). Les souris sont placées dans des cages avec des enrichissements (rouleaux en carton, coton, buchettes de bois...) qui leur permettent d'exprimer leurs comportements naturels. L'usage des souris dans ce projet est essentiel car il n'existe actuellement aucun modèle *in vitro* (n'utilisant pas le modèle animal) pertinent pour l'étude des LAM. En effet, les rechutes post-chimiothérapeutiques observées chez les patients impliquant de nombreuses interactions notamment l'environnement de la moelle osseuse et les cellules leucémiques.

Nous nous attacherons à limiter au minimum le nombre de souris utilisés dans ce projet. Nous utiliserons des lots de 5 à 10 souris, nombre nécessaire pour obtenir une puissance statistique suffisante permettant de conclure à partir des résultats obtenus. Nous ferons en sorte de regrouper au maximum les conditions à tester afin de réduire au minimum le nombre d'animaux. Ainsi nous utiliserons 400 souris pour l'identification des gènes possiblement impliqués dans la résistance à la chimiothérapie. Afin de tester l'effet de nouvelles molécules thérapeutiques (10 molécules différentes), nous prévoyons d'utiliser 1980 souris (990 du modèle 1 et 990 pour le modèle 2). Ces tests seront réalisés en suivant les concentrations thérapeutiques utilisées chez l'Homme lorsque cela est possible (concentrations variables selon les molécules). Au total, 2380 souris seront nécessaires sur les 5 ans que durera le projet.

Une attention toute particulière sera portée sur le bien-être des animaux par une surveillance journalière qui sera assurée par le personnel de l'animalerie, en complément à celle des expérimentateurs. Chaque semaine, une grille d'évaluation des signes cliniques sera renseignée (aspect des souris, comportement, blessures, poids) et les souris présentant une souffrance et/ou une douleur mise en évidence par une modification comportementale et/ou physique seront euthanasiées. L'ensemble des animaux inclus dans ce projet sera euthanasié en fin de procédure (au plus tard 12 semaines après le début du protocole).

17788 Le bar *Dicentrarchus labrax*, occupe une place prépondérante pour la filière piscicole française et européenne, mais de nombreux freins persistent encore quant à l'amélioration de la production, et en particulier la maîtrise du sex-ratio des lots produits. En effet, cette espèce gonochorique présente la particularité d'avoir un déterminisme du sexe fortement influencé par l'environnement. Ainsi, les températures élevées généralement rencontrées en condition d'aquaculture conduisent à une production majoritaire de mâles (60 à 100%). Or chez cette espèce, comme observé chez de nombreux poissons, les femelles présentent de bien meilleurs taux de croissance que les mâles, avec une différence de poids allant de 70% chez les jeunes stades à 30% chez les poissons de 2 ans et plus. La mise en place d'un protocole non-invasif permettant de limiter la masculinisation, aurait un impact très positif sur l'économie du secteur piscicole. Les dernières avancées scientifiques dans le domaine ont mis à jour le rôle primordial du stress (et particulièrement de son

hormone majeure : le cortisol) dans la masculinisation de nombreuses espèces de poissons. Ainsi, en diminuant les niveaux de stress à certains stades clés du développement larvaire, on pourrait potentiellement augmenter significativement le nombre de femelles produites, tout en améliorant les conditions de bien-être animal.

Ce projet de recherche vise à trouver des alternatives aux prises de sang pour caractériser le stress de façon non-invasive (Phase 1) et à déterminer l'impact du stress sur le déterminisme du sexe grâce à la mise en place d'élevages considérés moins stressants par rapport aux conditions d'élevages classiques (densité plus faible, lumière bleue et ajout de tryptophane dans la nourriture) (Phase 2). Le dernier objectif est de comprendre si un stress alimentaire (période de Jeûne) pourrait aussi induire une masculinisation via l'axe du stress (Phase 3). La règle des 3R a été prise en compte dans ce projet de la façon suivante : 1) Réduire, en utilisant le minimum de poissons pour répondre à nos objectifs. Ainsi sur la phase 1, 120 poissons seront prélevés et seulement la moitié d'entre eux auront subi un stress chronique (succession de stress répétés). Pour la phase 2, seul les poissons d'un répliquât sera prélevé (40 poissons par condition prélevés à différents moments du cycle de vie). Pour la Phase 3, nous collecterons seulement 30 poissons par condition (chaque condition avec une période de jeûne de 7 jours) et un témoin. Ces effectifs ont été calculés à partir de données d'expérimentations précédentes et de la littérature pour assurer une puissance de détection suffisante des effets escomptés. 2) le raffinement comprendra l'optimisation des conditions d'élevage pour cette espèce (nombre d'individus suffisants pour être en bancs, densité faible) et la mise en œuvre de procédures spécifiques et standardisées (comme l'anesthésie et l'euthanasie). Au total, 3320 bars seront utilisés lors des 2 phases. 3) Le Remplacement n'est pas possible dans le cas présent car nous étudions une espèce dans son milieu d'élevage.

17789 Les pathologies du cœur ont souvent pour origine des anomalies vasculaires. C'est pourquoi Il est important de pouvoir observer les vaisseaux du cœur afin de détecter ces anomalies comme les infarctus ou les sténoses. Actuellement, l'examen clinique utilisé en clinique est la coronarographie. Cette méthode utilise des rayons X dangereux pour le patient et pour le personnel soignant. De plus, elle ne permet pas de visualiser les petits vaisseaux. Or, la détection des altérations de petits vaisseaux pourrait permettre de diagnostiquer précocement l'arrivée de futures pathologies.

Notre projet consiste à utiliser l'échographie ultrarapide en trois dimensions combinée à des agents de contraste pour imager les vaisseaux du cœur. Grâce à cette nouvelle technologie développée au laboratoire, nous pourrions d'une part, cartographier avec précision l'ensemble du réseau coronaire jusqu'aux petits vaisseaux et d'autre part, déterminer les vitesses de flux sanguins.

La forme et les propriétés très complexes du réseau artériel et veineux, ainsi que les mouvements du cœur ne peuvent pas être reproduits par des modèles mathématiques ou des systèmes artificiels, c'est pourquoi nous sommes obligés d'utiliser des modèles animaux pour développer cette méthode d'imagerie.

Nous utiliserons le rat car ce mammifère possède un système cardiovasculaire évolué complexe et extrapolable à celui de l'homme. Les nombreuses données de la littérature et notre grande expertise sur la fonction cardiaque de ce modèle déjà très étudié nous permettront d'optimiser efficacement notre méthode avec un nombre réduit d'animaux inclus dans l'étude.

Les animaux d'élevage agréés seront hébergés dans des conditions respectant les trois R avec enrichissement de leurs environnements.

L'expérimentation aura lieu sur le rat anesthésié par anesthésie gazeuse avec injection intra veineuse d'agents de contraste. L'échographie sera non invasive.

Nous estimons que nous aurons besoin de 50 rats pour ce projet pendant cinq ans.

17790 Au cours de la période périnatale, l'intestin subit une profonde maturation, conduisant à la mise en place de la structure et des fonctions intestinales adultes. Le retard de croissance pendant les premières semaines de vie, ou retard de croissance postnatal (RCPN), altère la maturation de l'intestin, en particulier de la barrière épithéliale, ainsi que la mise en place du microbiote intestinal. Ces altérations du développement des fonctions intestinales sont associées à une susceptibilité

accrue au développement ultérieur de colites inflammatoires. D'autre part, de nombreux travaux témoignent de l'importance de la nutrition des nouveau-nés prématurés sur leur santé et prônent ainsi l'apport de lait maternel afin de diminuer les risques de survenue de maladies intestinales et respiratoires graves. Ainsi des stratégies de prévention visant à réduire le risque de maladies intestinales du fait d'une prématurité ou d'un environnement nutritionnel précoce délétère sont à développer.

Le premier objectif de notre travail est d'étudier dans un modèle murin les effets de la supplémentation orale de deux ingrédients alimentaires pendant la période néonatale précoce sur la maturation intestinale au sevrage et la santé intestinale à long terme, en situation physiologique et dans un modèle pathologique de RCPN. Les ingrédients étudiés ont montré l'absence de nocivité chez le rongeur dans le cadre d'une administration chronique par gavage et sont autorisés comme supplément de l'alimentation chez l'Homme. Le RCPN sera induit à partir du jour postnatal 4 (PN4) en créant de grandes portées (GP) comprenant 15 souriceaux par échange des petits entre les mères. Des portées contrôles (PC) fixées à huit petits serviront de référence. Une supplémentation par un des deux ingrédients sera réalisée par gavage oro-gastrique de PN8 à PN21 chez les souriceaux des PC et des GP. Des souriceaux recevant une solution contrôle serviront de référence. Quatre groupes expérimentaux seront donc créés pour chaque ingrédient testé. L'impact de l'environnement nutritionnel précoce sur la maturation de la structure et des fonctions intestinales (étude de la morphologie intestinale, de la perméabilité et du microbiote) sera étudié au sevrage (PN21). Les effets de la supplémentation en ingrédient pendant la période néonatale précoce sur la susceptibilité aux colites inflammatoires chez la souris seront évalués après induction d'une colite aiguë à PN21 ou à l'âge adulte (PN60). Quatre portées dans chaque groupe seront nécessaires pour chaque analyse au sevrage et à l'âge adulte afin de lisser les variations, liées notamment à l'intensité du retard de croissance et de ses conséquences sur les paramètres de la physiologie intestinale, obtenir des résultats reproductibles, statistiquement exploitables et suffisamment puissants.

Le second objectif de notre travail est d'étudier l'impact de différents composés sur la maturation intestinale et pulmonaire via leur micro-injection au sein d'explants d'intestins et de poumons embryonnaires de souris afin de mimer une prématurité, puis mis en culture pendant plusieurs jours. Des tests seront réalisés afin de déterminer le jour de prélèvement, la durée de culture des explants ainsi que la concentration des composés nutritionnels et pharmacologiques utilisés avant de procéder aux études histologiques et d'expression pour chaque composé. Après ces mises au point effectuées, une étude sera menée sur des souris génétiquement modifiées pour préciser le rôle de certains gènes dans la maturation tissulaire.

Au total, au maximum 7716 souris (588 femelles, 216 mâles et 6912 souriceaux) seront nécessaires pour répondre au premier objectif et 1905 souris seront également nécessaires pour répondre au second objectif. Le nombre maximum de souris utilisées sera donc de 9621 sur 5 ans.

Les procédures expérimentales sont conçues pour respecter la règle des 3R et limiter le nombre de souris utilisées :

- Remplacement : il n'existe pas de méthode alternative à l'expérimentation animale pour tester l'impact à long terme de l'environnement nutritionnel précoce sur la santé et la maturation intestinale. Ce travail nécessite donc le recours à un modèle physiologique intégré de mammifère.
- Réduction : les reproducteurs (souris mâles et femelles) et les femelles issues de reproductions et non utilisées dans le cadre de notre premier objectif seront sevrées à PN21 pour être réutilisées afin de mettre au point la procédure expérimentale de notre deuxième objectif. Le nombre de souris a été réduit au maximum en tenant compte des variabilités inter-individuelles.
- Raffinement : Le lien social entre les souris sera maintenu autant que possible (2 femelles par cage jusqu'à la parturition, lien mère-souriceaux maintenu jusque PN21, cages transparentes) au cours de leur hébergement. Les souris seront surveillées tous les jours afin d'évaluer leur état clinique et de confort (douleur, stress, détresse). Les critères et signes qui permettent d'évaluer le niveau de douleur, de stress ou de détresse des animaux ont été dégagés sur la base des critères établis par d'autres équipes de recherche. Tout animal dont la perte de masse corporelle est

supérieure à 20 %, ou montrant les signes de souffrance (prostration, poil hérissé, dos voûté) sera immédiatement euthanasié par dislocation cervicale. Chaque procédure expérimentale sera réalisée par un personnel habilité. Lors des manipulations, les stratégies de raffinement des expériences (pièce calme, dispositions pour diminuer l'angoisse des animaux, anesthésie, surveillance de l'état d'endormissement) seront réalisées par le personnel habilité. Les souris seront surveillées quotidiennement et seront hébergées dans une animalerie agréée dans un environnement parfaitement contrôlé (température, hygrométrie, cycles jour/nuit).

17791 Chez un individu sain, les cellules effectrices du système immunitaire reconnaissent différents types d'antigènes (du soi et du non soi). Ces cellules sont sous le contrôle permanent des cellules régulatrices qui limitent leur activation. Dans le cas des maladies autoimmunes, les cellules régulatrices ne sont pas capables de contrôler la sur-activation des cellules effectrices qui reconnaissent et détruisent les cellules et organes du patient.

Le marqueur CD45RC permet de distinguer les cellules effectrices des cellules régulatrices. En effet les lymphocytes T exprimant faiblement le marqueur CD45RC ont des propriétés immunosuppressives (cellules régulatrices) alors que les cellules exprimant fortement ce marqueur sont des cellules effectrices. Ainsi, l'élimination des cellules effectrices par le ciblage du marqueur CD45RC à l'aide d'un anticorps permettrait, en agissant sur la balance du système immunitaire, de maîtriser les réponses auto-immunes.

L'objet de cette saisine est d'évaluer le potentiel thérapeutique d'un anticorps anti-CD45RC dans un modèle de souris développant spontanément un lupus.

Dans cette saisine, la règle des 3R est suivie de la façon suivante:

Remplacer: Des études fonctionnelles ont été réalisées in vitro. Les résultats sont prometteurs, mais limités par l'absence de contexte physiologique et de la complexité du système immunitaire. Il est donc maintenant nécessaire d'évaluer le potentiel de notre traitement dans un modèle d'auto-immunité in vivo.

Réduire: le nombre d'animaux utilisé dans cette étude doit être suffisant afin que les résultats obtenus soient statistiquement interprétables (log Rank test pour les courbes de survie, description des tests statiques utilisés détaillée ci-après). Le nombre de groupe a été réfléchi de sorte à avoir les contrôles suffisants pour pouvoir conclure quant aux résultats obtenus. Il n'y a pas à prévoir d'animaux pour la mise au point du modèle puisque les souris développent spontanément le lupus. Le nombre maximal de souris utilisé est de 30.

Raffiner: Les animaux atteignant une perte de poids de 20% par rapport à leur poids au début de la maladie seront euthanasiés, ainsi que les animaux montrant des signes physiques caractéristiques d'un mal être tel qu'un changement de comportement. Durant le protocole, la protéinurie des souris sera évaluée par prélèvement des urines chaque semaine. Le traitement sera initié dès que les souris verront leur protéinurie augmentée. Des prélèvements sanguins seront effectués toutes les 2 semaines au niveau de la veine faciale afin de faire un suivi des anticorps auto-immuns dans le sérum. Tous les animaux traités avec l'anticorps d'intérêt ou avec l'isotype contrôle seront analysés afin d'en obtenir un maximum d'information post mortem (anatomopathologie pour voir les lésions et la présence d'auto anticorps dans différents organes cibles, immun histologie, cytométrie pour étudier l'évolution de différentes populations lymphocytaires au cours de la maladie.

Les résultats obtenus permettront d'établir une preuve de concept quant à l'utilisation d'un anticorps ciblant la molécule CD45RC dans les réponses auto-immunes. Ces résultats permettront également d'évaluer la durée de traitement nécessaire et suffisant à envisager pour un traitement chez l'homme, ainsi que les mécanismes d'action de l'anticorps sur les cellules. L'anticorps anti-CD45RC fait l'objet d'un brevet quant à son potentiel thérapeutique prometteur dans le domaine de la transplantation d'organe solide et de cellules, mais aussi pour le traitement de maladies autoimmunes.

17792 Chaque étude de ce projet a pour but d'évaluer l'inocuité d'un candidat médicament chez la souris en utilisant le test d'Irwin. Le projet consiste à tester les effets des produits sur le comportement général, les réflexes neurologiques, le poids et la température corporelle chez la souris.

Le test d'Irwin consiste en une batterie d'observations comportementales permettant d'évaluer l'aspect et le comportement général de l'animal, différents réflexes neurologiques ainsi que la température corporelle et le poids suite à l'administration du produit à tester. Ces observations sont répétées dans le temps sur une période totale de 72 heures, période suffisante pour caractériser l'effet du produit.

Pour ce projet, il est prévu un nombre maximal de 2400 animaux sur 5 ans.

Règle des 3 R: remplacement, réduction et raffinement

Remplacement : Dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez la souris car il n'existe pas de méthode de substitution (in vitro ou in silico) pour évaluer les effets d'une nouvelle molécule sur le système nerveux. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité, la toxicité et la pharmacocinétique d'un candidat médicament. A ce jour, la souris est l'une des espèces les plus adaptées à ce type de modèle d'étude.

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

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

- la mise au point de procédures rigoureuses
- la formation du personnel
- le recours à des procédures les moins invasives possibles
- la recherche des points limites
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire

un protocole analgésique adapté pour la chirurgie et la période post-opératoire et un suivi post-opératoire de l'état de santé des animaux avec des soins et un enrichissement adaptés afin de permettre une bonne récupération des animaux

17793 Les troubles neuropsychiatriques (autisme, dépression) sont aujourd'hui les premières causes de souffrance et d'handicap à l'échelle mondiale. La résistance aux traitements pharmacologiques classiques a mené au développement d'alternatives thérapeutiques, plus prometteuses : les méthodes de neurostimulation. Le progrès considérable réalisé dans les domaines de la stimulation magnétique et électrique profonde souffre cependant de limitations techniques (précision ou chirurgie invasive). Il a été démontré récemment que la stimulation transcrânienne par ultrasons, c'est à dire l'application d'ondes mécaniques, permettait de moduler l'activité électrique cérébrale de façon non-invasive et géométriquement précise, outrepassant les limites des méthodes actuelles de neurostimulation. L'altération de l'activité de certaines zones cérébrales étant caractéristique des troubles neuropsychiatriques, la stimulation ultrasonore pourrait prendre place dans l'arsenal thérapeutique des maladies neuropsychiatriques. Malgré cet intérêt et certaines études exploratoires, les paramètres ultrasonores requis pour une stimulation ultrasonore précise et efficace sont peu ou pas connus. Dans ce contexte, nous proposons d'évaluer différentes sondes ultrasonores pour induire une stimulation ultrasonore précise et efficace chez le rat et la souris mâle physiologique (non affecté par une maladie neuropsychiatrique). Le choix de ces deux espèces repose sur le fait que nous disposons d'un modèle murin de dépression et d'un modèle rongeur d'autisme sur lesquels nous évaluerons le bénéfice thérapeutique de la neurostimulation ultrasonore.

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

Remplacement : Dans une première approche expérimentale, nous avons mis en place et validé un dispositif expérimental et des séquences ultrasonores permettant la stimulation ultrasonore. Dans la continuité de ce projet, nous souhaitons évaluer différentes sondes ultrasonores pour réaliser

une stimulation ultrasonore précise et efficace. Par conséquent, à cette étape du projet, le modèle animal ne peut être substitué par un autre modèle d'étude in-vitro ou in-silico.

Réduction : Sur la base de nos études antérieures et en raison des variables mesurées, notre étude nécessite 320 souris et 320 rats. Les groupes contrôles et expérimentaux seront constitués de 8 animaux. Nous réaliserons une étude statistique pour déterminer si les effets de la neurostimulation induisent une modification significative des variables mesurées (Puissance de test: 80%, Seuil de risque: 0.05).

Raffinement : Les animaux seront hébergés par groupe de 8 pour les souris et par 2 pour les rats en présence d'un objet d'enrichissement. Les animaux seront observés une fois par jour. Les procédures expérimentales sous anesthésie générale et les animaux sont manipulés sur un tapis chauffant avec une restriction minimum de l'isolement social. Les animaux sont placés sous surveillance à leur réveil.

17794 Le rhabdomyosarcome (RMS) est une tumeur pédiatrique qui représente 5% des cancers chez l'enfant et se développe majoritairement dans le muscle. Il en existe deux formes : le RMS embryonnaire et le RMS alvéolaire. Dans un cas rare, la tumeur s'est développée en site osseux et a finalement été décrite comme un « RMS indifférencié à tumeur primitive osseuse ». Cette tumeur en site osseux a mal répondu aux cures de chimiothérapie.

La mauvaise réponse de la tumeur aux chimiothérapies peut être due à l'étroite interaction qui existe entre la tumeur et le microenvironnement particulier de cet organe. Cette interaction peut être qualifiée de « cercle vicieux » entre les cellules tumorales et les cellules de l'os, plus particulièrement des ostéoclastes (cellules spécifiques qui régulent la dégradation osseuse). Les cellules tumorales produisent des facteurs qui vont activer la différenciation et l'activation des précurseurs ostéoclastiques en ostéoclastes matures capables de dégrader la matrice osseuse. Lorsqu'ils dégradent l'os, les ostéoclastes permettent la libération de facteurs de croissance stockés dans la matrice osseuse qui à leur tour vont induire l'activation des cellules cancéreuses (prolifération, migration...).

Le projet portera donc sur l'impact potentiel du microenvironnement osseux sur la réponse thérapeutique du rhabdomyosarcome. Deux molécules à activité anti-tumorale utilisées dans le cadre d'un traitement néo-adjuvant de ce type de cancer seront testées en monothérapie in vivo dans des modèles murins xénogéniques de rhabdomyosarcome (en site intra-osseux, paratibial ou intra-musculaire).

Ces expérimentations sont indispensables au bon déroulement du projet, permettant de faire un lien entre les observations cliniques et les résultats obtenus in vitro et ne peuvent être remplacées par des expérimentations in vitro. Le nombre d'animaux utilisés pour mener à bien ce projet sera réduit au strict minimum pour pouvoir conclure de façon statistiquement significative, à savoir 12 animaux par condition, à raison de 2 doses par molécule à tester ainsi qu'un contrôle véhicule et 3 types d'induction de tumeur, soit un total de 216 animaux par lignée cellulaire testée. Ainsi pour 2 lignées cellulaires, le nombre d'animaux est porté à 432. Selon l'homogénéité des résultats et de la reproductibilité des modèles une seconde expérience est envisagée et portera ainsi le nombre d'animaux à 864. Les animaux utilisés seront des souris nudes NMRI, femelles de 4 semaines. Nous évaluons à 2 le nombre de molécules anti-tumorales sur une période de 3 ans. Ces molécules seront testées en monothérapie dans des expériences d'effet-dose (2 doses testées). Si les résultats sont homogènes nous ne renouvelerons pas inutilement l'expérimentation selon la règle des 3R. Néanmoins, si les résultats de la première expérimentation ne sont pas homogènes, nous renouvelerons l'expérimentation (pour un total de 2). Pour comparer les volumes tumoraux entre deux groupes à un temps donné, nous utiliserons le test de rang non paramétrique Mann-Whitney. Pour comparer différents groupes entre eux, nous utiliserons un test de Kruskal-Wallis (Anova non paramétrique).

Le bien-être des animaux sera primordial durant les expérimentations, notamment par des phases d'acclimatation, un enrichissement de l'environnement (ajout de papier dans chaque cage pour leur permettre la conception d'un « nid »). Afin de raffiner les procédures expérimentales, les animaux

seront observés quotidiennement afin de détecter le plus précocement possible tout signe de douleur. Les animaux anesthésiés seront placés sur un tapis chauffant lors de la réalisation des gestes techniques, une analgésie sera appliquée dès que nécessaire et des points limites strictes seront établis. Les points limites de l'étude dépendent des résultats de l'évaluation clinique et du volume tumoral. Une douleur non gérable entrainera la mise en place d'un protocole analgésique. La prise en charge de la douleur se fera par injection intra-cutanée du BupreCare®

17795 Les patients hémophiles (déficience en facteur VIII ou IX) ou patients déficients en facteur von Willebrand ont non seulement des troubles de la coagulation mais présentent également une ostéopénie, une sarcopénie et des altérations du processus inflammatoire. Cependant, le lien fonctionnel entre ces déficits moléculaires et l'impact sur le tissu musculo-squelettique et l'inflammation ne sont pas ou peu connus. Ces pathologies étant des maladies rares orphelines, il est nécessaire d'avoir recours à des modèles animaux (souris) mimant la pathologie humaine pour pouvoir mieux comprendre l'impact de la déficience de ces facteurs et de proposer des approches thérapeutiques complémentaires. Ce projet a pour objectifs :

- 1) de caractériser les réseaux moléculaires modulés par la déficience en facteurs de coagulation ;
- 2) de caractériser l'impact des facteurs de coagulation sur les pertes osseuses, musculaires et les populations immunitaires ;
- 3) de comprendre le lien fonctionnel entre les facteurs de coagulation et les cytokines impliquées dans le remodelage musculo-squelettique ;
- 4) de tester l'efficacité de monothérapie anti-catabolisme et proanabolisme osseux ou bithérapie associant un traitement anti-catabolique et pro-anabolique sur les pertes osseuses observées chez les souris hémophiles en vue d'une application potentielle chez l'homme.

Concernant l'application des 3R, le remplacement ne peut être assuré dans cette étape du programme de travail, l'accès aux échantillons humains est très limité en particulier en lien avec les risques hémorragiques et est essentiellement restreint à des cohortes de sérums. ce faible accès rend impossible l'étude du rôle des facteurs de coagulation sur les différents tissus. Des souris génétiquement invalidées pour ces facteurs miment la pathologie humaine et permettent de mieux appréhender la pathogénèse de la maladie et le développement de nouvelles approches thérapeutiques en particulier les pertes osseuses et musculaire.

Pour la réduction d'animaux, nous optons pour des études avec plusieurs molécules testées en parallèle pour avoir un groupe contrôle pour plusieurs molécules. Le nombre d'animaux utilisé pour mener à bien ce projet sera réduit au strict minimum pour pouvoir conclure de façon statistiquement significative.

Procédure 1 : Etude du phénotype des souris hémophiles : perte osseuse chez les souris femelles, perte musculaire et caractérisation des populations immunitaires, nous aurons besoin de 500 souris maximum sur 5 ans. Pour cette procédure, voici le détail des souris dont nous avons besoin, 4 souches différentes (FVIII, vWF, OPG, et souris sauvages) pour les femelles âgées de 8 semaines et les groupes seront composées de 15 souris par groupe, soit 60 souris/an, soit 300 souris femelles sur 5 ans et 4 souches différentes (FVIII, vWF, OPG, et souris sauvages) pour les mâles âgés de 8 semaines. Les groupes seront composés de 10 souris, soit 40 souris/an, soit 200 souris mâles sur 5 ans.

Procédure 2 : tests de molécules actives visant à prévenir les pertes osseuses chez la souris hémophile, nous aurons besoin de 910 souris maximum. Ces 910 souris seront répartis en 2 groupes :

- tests de molécules en monothérapie utilisant une drogue anti-catabolique ou pro-anabolique osseuse. Les animaux, utilisés seront des souris FVIII, mâles âgés de 22 semaines et séparés en 3 groupes (CT, Dose 1, Dose 2) de 13

souris. 10 molécules (5 cataboliques, 5 anaboliques) maximum seront testées, soit 390 souris sur 5 ans.

- tests de molécules en bithérapie associant des drogues anti-catabolique et pro-anabolique osseuse. Les animaux utilisés seront des souris FVIII, mâles âgés de 22 semaines et séparés en 4 groupes (CT, Dose 1, Dose 2, Combinaison dose 1 + 2) de 13 souris. 10 molécules (5 cataboliques, 5 anaboliques) maximum seront testées, soit 520 souris sur 5 ans.

Un nombre maximal de 5 molécules anti-cataboliques et 5 molécules pro-anaboliques sera étudié sur une période de 5 ans. Un nombre maximal de 1410 souris est prévu sur cette même période.

Concernant le raffinement, le bien être des animaux sera primordial durant les expérimentations, notamment par des phases d'acclimatation, un enrichissement de l'environnement (un tunnel et un carré de cellulose pour permettre la conception d'un "nid"), une visite quotidienne, une gestion de la douleur suivant une échelle stricte et des points limites bien établis. Les souris seront hébergées par 4 ou 5 selon la procédure. Les points limites de l'étude dépendent des résultats de l'évaluation clinique, de l'observation d'une douleur non gérable suite à la mise en place d'un protocole analgésique. De façon générale, les différents points limites observés sont, la diminution de poids corporel, l'apparence physique et le comportement de l'animal sans intervention humaine. Ces 3 critères sont évalués sur une échelle de 0 à 3. A partir de deux scores de 2, une injection de Buprénorphine à 0.05mg/kg en injection intra-musculaire sera administrée et la fréquence d'administration sera adaptée en fonction des signes de la douleur avec une fréquence toutes les 12h et pouvant être accrue toutes les 8 heures. Si une souris atteint un score de 3, elle sera alors mise à mort.

17796 Les pays développés connaissent depuis plusieurs années une augmentation de la prévalence des maladies neurodéveloppementales, les plus représentatives étant l'autisme et la schizophrénie. Ce sont des maladies chroniques qui se caractérisent par des déficits des performances cognitives dues à des dysfonctionnements neuronaux de la transmission et de la plasticité synaptique. Cependant des données récentes de la littérature suggèrent qu'une inflammation et une activation des cellules gliales sont impliquées dans les stades précoces de ces maladies. Les cellules gliales, en particulier les astrocytes, sont en contact étroit avec les synapses neuronales. Elles sont donc bien positionnées pour moduler la fonction des synapses lors du développement du cerveau.

Le but de ce projet est de mieux comprendre comment l'activation des astrocytes entraîne une modulation de l'activité des neurones lors du développement.

Seule l'expérimentation in vivo, reproduisant le plus fidèlement les interactions glie-neurones dans l'environnement physiologique, nous permettra de répondre à cette question.

Pour cela nous utiliserons majoritairement une approche virale de transfert de gènes dans les cellules gliales du cortex visuel. Des études d'électrophysiologie, de comportement, de biologie moléculaire et immunohistochimiques seront menées sur un total de 2385 souris sur une période de 5 ans.

Ce projet sera mis en œuvre dans le respect de la règle des 3R :

1) Remplacer :

Les procédures expérimentales ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information.

L'utilisation de cultures astrocytaires ou de co-cultures neurones-astrocytes ne permet pas une étude physiopathologique des interactions neurone-astrocyte : les cultures induisent des altérations morphologiques et physiologiques (électrophysiologiques et biochimiques) majeures des astrocytes ne reproduisant pas les mécanismes physiopathologiques existant in vivo.

Il n'existe pas, dans notre domaine, d'alternatives satisfaisantes aux méthodes expérimentales proposées dans ce projet (expériences ex vivo et in vivo sur l'animal).

Par ailleurs, il n'existe actuellement aucun moyen de tester notre question biologique à l'aide de modèles informatiques ou d'autres alternatives car trop de paramètres physiopathologiques entrent en jeu.

2) Réduire :

Les différentes procédures expérimentales ont été consciencieusement pensées et élaborées afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en permettant d'obtenir des résultats statistiquement satisfaisants.

3) Raffiner :

Afin de minimiser la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, les procédures se dérouleront sous anesthésie générale et des points-limites seront établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

A terme, les résultats de ce projet permettront de mieux comprendre le rôle des astrocytes dans les maladies neurodéveloppementales et les mécanismes impliqués.

17797 La barrière épithéliale intestinale (BEI) constitue la plus grande et la plus importante barrière contre l'environnement extérieur. Elle agit comme une barrière sélectivement perméable, permettant l'absorption de nutriments, d'électrolytes et d'eau tout en maintenant une défense efficace contre les toxines intraluminales, les antigènes et la flore entérique. La BEI est constituée d'une monocouche de cellules contiguës scellées par des complexes de jonction intercellulaires, mais aussi par une couche de mucus et des cellules immunitaires associées, qui sont étroitement régulées entre elles. Il existe une association étroite entre la perturbation de la BEI et l'augmentation de la perméabilité intestinale ou "leaky gut" dans la pathogenèse et l'exacerbation de nombreuses maladies chroniques. L'altération de la perméabilité intestinale contribue à des maladies situées principalement dans le système gastro-intestinal, telles que les maladies chroniques inflammatoires de l'intestin (MICI) mais également au développement de maladies extra-digestives comme l'obésité qui est associée à une inflammation systémique de faible intensité. La contribution de l'hyperperméabilité intestinale dans la pathogenèse de maladies digestives et systémiques fait de la BEI une cible thérapeutique intéressante. Notre projet vise à identifier et caractériser de nouveaux acteurs thérapeutiques permettant de moduler la perméabilité intestinale et l'inflammation dans un contexte physiopathologique. Seule une approche intégrée par l'expérimentation animale qui mime les pathologies de la barrière intestinale est envisageable en raison de la diversité des types cellulaires présents dans l'intestin et de la complexité de leurs interactions avec leur micro-environnement incluant le système immunitaire et le microbiote intestinal. Dans ce projet, nous utiliserons différentes lignées de souris génétiquement modifiées dont le phénotype n'est pas dommageable. Le nombre de souris utilisées sera de 384. Nous utiliserons différents modèles bien établis qui miment les perturbations de la barrière intestinale chez l'homme afin d'étudier les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans le contrôle de la perméabilité intestinale, la cicatrisation des muqueuses et la réparation de l'épithélium intestinal et les réactions inflammatoires intestinales lors de colite. Nos modèles comprennent l'induction d'une colite inflammatoire par traitement chronique au sulfate de dextran (DSS), l'irradiation aux rayons gamma, l'induction d'un stress psychologique modéré (stress d'évitement de l'eau) ou l'infection par *Citrobacter rodentium*, un agent pathogène des muqueuses murines. Pour respecter le principe des 3R, les animaux seront hébergés en groupe avec leurs congénères dans un milieu enrichi et le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum permettant une analyse statistique efficace des résultats d'après nos données antérieures. Afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux, une surveillance journalière des animaux sera réalisée en respectant des points limites bien définis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire. Des méthodes alternatives de culture cellulaire seront utilisées pour étudier les mécanismes moléculaires sous-jacents (utilisation d'organoïdes générés à partir de biopsies intestinales de nos modèles animaux). A terme, les résultats de ce projet permettront le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour prévenir et traiter les MICI et l'obésité et ses complications.

17798 La toxoplasmose, parasitose cosmopolite due au parasite protozoaire *Toxoplasma gondii*, touche 5000 femmes enceintes par an en France, soit 1% des grossesses, et peut se manifester par des malformations fœtales et des avortements. Il n'existe pas de vaccin contre la toxoplasmose. Les traitements actuels (spiramycine au premier trimestre de grossesse puis pyriméthamine/sulfadiazine) ne sont pas spécifiques du parasite et leur efficacité est critiquable. De

plus, ils doivent être pris quotidiennement jusqu'à la naissance entraînant une toxicité à plus ou moins long terme (atteintes hématologiques, allergies graves). Il est donc nécessaire de développer de nouvelles alternatives thérapeutiques dans le traitement de la toxoplasmose par l'identification de molécules plus spécifiques et moins toxiques. Des molécules ciblant une enzyme de *Toxoplasma gondii* sans homologue chez les mammifères, inhibent la prolifération du parasite in vitro et in vivo dans un modèle de toxoplasmose murine aiguë sans causer de toxicité rénale ou hépatique à court terme. Une de ces molécules a permis de réduire de plus de 90% l'infection foetale dans un modèle murin de toxoplasmose congénitale. La publication de ces résultats encourageants nécessite l'étude de l'impact de la molécule sur le nombre et la survie des souriceaux. Cette expérimentation nécessitera l'utilisation de 120 souris (40 femelles et leur descendance estimée à 80) dans le respect de la règle des 3R. - Remplacement : Les résultats de cytotoxicité in vitro et le dosage des enzymes hépatiques et rénales réalisés sur souris non gestantes ne suffisent pas à démontrer l'innocuité de la molécule au cours de la gestation. - Réduction : Le nombre d'animaux est calculé au plus juste à l'aide d'outils statistiques en tenant compte du rendement de gestation et de l'efficacité attendue. - Raffinement : Les souris sont hébergées en accord avec la législation dans un environnement enrichi (objets en cellulose pour faire un nid ou pour ronger). Aucun signe de souffrance n'a été observé lors des expérimentations précédentes mais tout animal présentant des signes graves (prostration, absence d'alimentation. . .) serait mis à mort. Toute médication pouvant interférer avec la molécule testée est proscrite. La classe de douleur des procédures ne justifie pas l'usage d'anesthésiant pendant plusieurs jours consécutifs.

17799 Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité et de morbidité dans le monde occidental et restent un problème majeur de santé publique. L'identification et la caractérisation de nouveaux régulateurs de la fonction cardiovasculaire est donc importante afin de développer de nouvelles thérapies contre ces maladies.

Ce projet vise à déterminer et comprendre le rôle de certains Récepteurs Couplés aux Protéines G (GPCR) dans la régulation de la pression artérielle et de la fonction cardiaque. De nombreux articles ont montré que ces récepteurs modulent la contractilité vasculaire et la fonction des cardiomyocytes. Cependant leurs rôles in vivo restent à mieux définir.

Ce programme de recherche est développé dans le respect des règles éthiques des 3R:

Remplacement : Seuls des modèles in vivo nous permettent d'étudier des processus physiologiques et pathologiques impliquant les GPCR dans la régulation de la pression artérielle. En effet celle-ci met en jeu des mécanismes à l'échelle de l'organisme entier et nécessite donc l'utilisation d'animaux vivants puisque l'étude des conséquences métaboliques de la fluctuation de la pression artérielle ainsi que son acquisition, avec ou sans traitement, ne peut s'envisager que dans un organisme entier.

Réduction : Nous avons réduit le nombre de souris utilisées au minimum nécessaire et suffisant pour valider scientifiquement notre étude du point de vue de l'analyse statistique. Le choix s'est porté sur la souris qui est un modèle reconnu et efficace pour l'accès à des animaux génétiquement modifiés. Ces animaux nous permettront d'appréhender le rôle spécifique d'un type cellulaire, d'un facteur ou encore d'une voie de signalisation des GPCR dans le maintien de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque.

Raffinement : Afin de prévenir la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux qui pourrait être associée aux procédures, Les actes chirurgicaux seront réalisés sous anesthésie générale et les animaux recevront un traitement antalgique en post-opératoire. Un suivi clinique et une surveillance des animaux seront réalisés par un personnel qualifié avec la mise en place de points limites. Tout animal présentant des signes de souffrance sera pris en charge et/ou euthanasié selon les procédures en vigueur.

Ce projet comprend cinq procédures qui nous permettront de surveiller la pression artérielle, la fréquence cardiaque et l'activité dans les conditions basales et en réponse au stress ou à la modulation pharmacologique chez les souris mutantes et leurs témoins respectifs.

La mesure de la pression artérielle se fera :

-avec un capteur de pression artérielle connecté directement à un appareil d'enregistrement chez des animaux anesthésiés pour des réactions aiguës et rapides (de 0 à 120 min).

-avec un capteur d'impulsions pneumatique pour mesurer la pression systolique chez les animaux éveillés.

-avec un capteur de pression artérielle connecté à un dispositif de télémétrie pour des mesures en continue de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque. Des radio-transmetteurs implantés par cathétérisme artériels transmettent de manière continue le signal des données physiologiques à un logiciel spécifique d'acquisition et de traitement.

Ce projet nécessite 1520 souris. Il a été élaboré afin de respecter les règles éthiques des 3R.

A terme, le nouvel aperçu physiopathologique fourni par les résultats de celui-ci sera utile pour le développement de nouvelles stratégies pour le traitement de l'hypertension.

17800 La prématurité est la principale cause de décès et de handicaps chez les nouveau-nés. Dans les pays industrialisés, en raison de l'amélioration des soins intensifs néonataux, le nombre des nourrissons de très faible poids de naissance qui survivent au-delà de l'enfance est en hausse. Cependant, le cerveau de ces prématurés reste extrêmement vulnérable. Les lésions diffuses de la substance blanche (LSB) constituent la principale forme de lésion cérébrale du prématuré même si certaines lésions de la substance grise (LSG) peuvent également survenir. L'inflammation périnatale que subissent dans 20 à 40% des cas les enfants prématurés et la grande vulnérabilité des cellules cérébrales en développement à ce stress inflammatoire est à l'origine de l'apparition de la plupart de ces lésions. Elles induisent des handicaps moteurs, des déficits cognitifs et des troubles comportementaux qui persistent à l'âge adulte qui sont regroupées sous le terme d'Encéphalopathie du Prématuré (EDP). Les relais majeurs des modifications environnementales dans le cerveau sont les cellules immunitaires cérébrales. Ces cellules ont un rôle fondamental dans le développement et la maturation du système nerveux central ; mais dans un contexte inflammatoire, ces cellules vont libérer des molécules toxiques qui vont retarder la maturation globale du cerveau, qui serait liée au développement des LSB. Pour comprendre l'impact de cette inflammation sur le développement cérébral, nous utiliserons un modèle de EDP induit par des injections d'une molécule inflammatoire chez le souriceau qui modélise l'inflammation associée à la prématurité. Cette molécule injectée sur animaux vigiles par voie intra-péritonéale les 5 premiers jours de vie, va induire une inflammation systémique chez le souriceau. Cette inflammation va induire des perturbations dans le développement cérébral visible tout au long de la vie de l'animal. Dans cette étude il y a 2 groupes : les souris contrôles qui se développent normalement et les souris ayant reçu la molécule inflammatoire dont le développement cérébral est perturbé.

Dans ce modèle, il sera étudié l'évolution des processus inflammatoires dans différents types cellulaires au cours du temps, des altérations de la maturation cérébrale et des déficits cognitifs à différents stades du développement. Cette étude permettrait ainsi de mieux comprendre l'EDP et donc d'améliorer la vie des enfants nés prématurés et de leur famille.

Les expériences seront réalisées chez 2 446 souris mâles sur une période de 5 ans. Deux groupes seront nécessaires : animaux injectés avec la molécule inflammatoire et le groupe contrôle. La bonne reproductibilité et le faible taux de mortalité (10%) de ce modèle expérimental permettent de limiter le nombre d'animaux par groupe nécessaire à la réalisation d'analyses statistiques. Travailler sur des souris mâles permet d'éviter l'influence des hormones sur les paramètres que nous allons mesurer. En outre, comme chez l'Homme, les femelles développent des lésions de la substance blanche bien moins sévères.

Ce modèle expérimental est de sévérité modérée et n'entraîne pas de phénotype dommageable chez la souris. La mise en place de points limites ainsi que l'observation quotidienne du comportement des animaux permettront d'identifier et de limiter toute souffrance et douleur. Si l'un de ces points limites est atteint, les animaux concernés seront euthanasiés selon les méthodes réglementaires.

Cette étude prendra en compte la réglementation des 3R :

Remplacement : Les mécanismes impliqués dans l'EDP mettent en jeu l'interaction de plusieurs types cellulaires au cours du développement cérébral qu'il est impossible de reproduire in vitro.

Réduction : L'analyse statistique de nos données nécessite 2 446 animaux pour mettre en évidence une différence significative. Toutefois, si nos résultats sont suffisamment significatifs, nous prévoyons de ne pas dupliquer l'expérience, alors 1 223 animaux suffiront à notre étude. Tous les efforts seront faits pour réduire le nombre d'animaux utilisés. Ce nombre minimum nous permettra d'être certains de répondre aux questions scientifiques de ce projet.

Raffinement : On optimisera l'acceptation des souriceaux par la mère en enrichissant l'hébergement avec du papier doux absorbant pour reproduire le nid. L'injection est effectuée en intra-péritonéal sur animal vigile, c'est un acte peu douloureux ne nécessite pas d'anesthésie. Des grilles de scoring seront proposées en fonction de l'âge des animaux déterminants ainsi les points limites prédictifs : durant la période d'injection de la molécule inflammatoire, on surveillera la fréquence respiratoire, la recoloration des extrémités, et le tonus ; à distance de l'inflammation on réalisera une surveillance régulière de la prise de poids, de l'absence de troubles du comportement (isolement, agressivité). Si l'un de ces points limites est atteint, les animaux concernés seront euthanasiés selon les méthodes réglementaires. A la fin de l'étude les animaux seront euthanasiés selon les méthodes réglementaires.

17801 En France, les cancers des voies aéro-digestives supérieures (bouche, gorge, nez, face) constituent 12% des cancers. Selon la localisation et la taille de la tumeur, le traitement repose sur la chirurgie puis la radiothérapie complétée ou non par de la chimiothérapie. Malgré les progrès techniques, les séquelles esthétiques et fonctionnelles sont lourdes et surviennent chez des patients en rémission carcinologique.

L'ostéoradionécrose est une complication provoquée par la radiothérapie de la sphère orale. Elle se traduit par la mise à nue douloureuse d'une partie plus ou moins étendue de l'os mandibulo-maxillaire qui ne cicatrise pas spontanément. Le traitement de l'ostéoradionécrose est difficile : médicamenteux au stade précoce, chirurgical parfois très lourd dans les formes étendues.

Depuis quelques années, le développement de biomatériaux a ouvert de nouvelles perspectives pour la reconstruction osseuse. Ces biomatériaux ont été largement étudiés et sont utilisés en pratique courante pour la régénération osseuse chez des patients sains. Après une radiothérapie, leurs propriétés sont moins connues. Plusieurs équipes ont déjà mis en évidence une cicatrisation partielle des foyers d'ostéoradionécrose par des biomatériaux phosphocalciques associées à de la moelle osseuse totale, riche en cellules multipotentes. Cette ré-ossification était encore accrue par des injections intravasculaires de lysat de moelle osseuse (suspension acellulaire obtenue à partir d'extrait de moelle osseuse) sur un modèle animal de membres postérieurs de rat irradié. L'émergence d'appareils d'irradiation plus perfectionnés permet l'administration du rayonnement de manière plus ciblée autorisant le développement d'un modèle animal d'irradiation de mandibule, plus pertinent pour étudier une maladie touchant principalement la sphère ORL.

L'objectif principal du projet est d'étudier sur un modèle de mandibule de rat irradié la régénération osseuse au sein des foyers d'ostéoradionécrose par l'association d'un comblement local (biomatériaux phosphocalcique et de moelle osseuse), et d'injection intravasculaire d'un lysat total de moelle osseuse, puis de sa fraction vésiculaires ou de sa fraction soluble.

Cette étude sera réalisée sur des rats consanguins de 8 semaines de souche Lewis 1A.

- La première phase de travail sera la réalisation d' « expériences préliminaires » qui consisteront à finaliser le développement du modèle animal (reproduire la manipulation réalisée sur membre inférieur, affiner la dose d'irradiation), et à isoler les vésicules extracellulaires (EVs) du lysat de moelle total et à les caractériser.

- La seconde phase de travail sera l' « expérimentation » en tant que telle qui consistera à comparer l'injection intraveineuse du lysat de moelle osseuse total à celle de ses fractions vésiculaire et soluble, en association avec le comblement du défaut osseux réalisé en zone irradiée, dans le but de préciser quel est le vecteur de l'information pro-ostéogénique.

43 individus seront nécessaires aux manipulations préliminaires : 33 pour le développement du modèle, et 10 pour la préparation/caractérisation des EVs.

Pour le développement du modèle, 24 rats seront irradiés au niveau mandibulaire, puis opérés 3 semaines plus tard afin de réaliser une perte de substance reproduisant une ostéoradionécrose qui sera alors comblée par l'association de biomatériaux et moelle osseuse. Un suivi clinique quotidien après chaque procédure aura lieu. Chaque individu recevra également 4 injections intraveineuses de lysat de moelle osseuse ou de sérum physiologique. Un scanner mandibulaire hebdomadaire permettra de définir précisément le moment de l'explantation en fonction de la repousse osseuse. Les mandibules seront alors prélevées puis analysées. Pour la réalisation des comblements locaux et des injections, 9 rats donneurs seront nécessaires.

Concernant la préparation et caractérisation des vésicules extracellulaires, 10 individus seront nécessaires pour la réalisation du prélèvement de la moelle osseuse totale, la préparation du lysat de moelle puis l'isolement et l'analyse des vésicules. La procédure sera effectuée après euthanasie des individus sous anesthésie générale.

La seconde manipulation nécessitera entre 52 et 104 individus (52 individus nécessaires à une manipulation qui pourrait être renouvelée une fois). Sur 54 rats, 20 individus seront des rats « donneurs » et 32 seront « expérimentaux ».

Les rats expérimentaux seront répartis en 2 groupes irradiés (dose déterminée par l'expérience préliminaire) ou non. Le protocole chirurgical et de comblement sera identique à la première manipulation. Les 4 injections intraveineuses seront soit le lysat total, les vésicules extracellulaires, ou la fraction soluble du lysat, ou du sérum physiologique. Les animaux seront ensuite sacrifiés et les mandibules prélevées puis analysées selon le délai déterminé dans la première expérience. Pour la réalisation des comblements locaux et des injections, 20 rats donneurs seront sacrifiés. Les fractions vésiculaires et solubles du lysat de moelle osseuse seront préparées par ultracentrifugation en utilisant un protocole standard du laboratoire une fois par semaine pendant 2 semaines.

Nous avons tenu compte des 3R dans l'élaboration du projet.

- Réduction: La première phase de travail pour confirmer l'effet de la procédure (comblement + injection du lysat) et définir la meilleure dose d'irradiation ne nécessite pas de contrôle non irradiés permettant une réduction du nombre d'animaux. La perte de substance osseuse sera réalisée sur chaque hémi-mandibule de rat, soit 2 par animal, réduisant de fait le nombre d'animaux tout en préservant la puissance statistique.

- Raffinement: les procédures de manipulation et de surveillance quotidienne sont élaborées avec l'objectif d'éliminer toute forme de souffrance animale. Chaque étape de l'étude tiendra compte du bien-être de l'animal, de son arrivée dans l'animalerie spécialisée à son sacrifice en fin d'étude.

- Remplacement: Il s'agit d'une étude animale dont l'objectif est à terme de développer une nouvelle prise en charge curative de l'ostéoradionécrose. Il n'existe malheureusement pas de solution de remplacement complet ou par des invertébrés en raison de l'étude menée sur le tissu osseux.

17802 Dans ce projet on s'intéresse au lymphome T. Il s'agit d'un cancer T chez l'adulte pour lequel aucune stratégie thérapeutique n'a été clairement décrite et la survie sur 5 ans n'est que de 30%. Nous utiliserons un modèle préclinique de souris qui développent un lymphome T rare équivalent à un lymphome T humain. Ce modèle de souris nous permettra pour la première fois de découvrir de nouveaux mécanismes à l'origine du développement des cellules T cancéreuses et d'évaluer de nouveaux traitements.

OBJECTIF: Nos travaux permettront de mieux comprendre comment les maladies lymphoprolifératives comme des leucémies, lymphomes et maladies auto-immunes (par exemple la polyarthrite), se développent.

METHODE : A l'aide de modèles murins adaptés génétiquement modifiés, nous modulerons, spécifiquement dans certaines cellules immunitaires, l'expression de protéines qui inhibent la mort

cellulaire et qui régulent l'apport énergétique de ces cellules, afin de révéler des mécanismes impliqués dans la croissance tumorale et la réponse immunitaire.

BENEFICE ATTENDU : La découverte de nouveaux candidats impliqués dans ces mécanismes nous permettra de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le cas de maladies lympho-prolifératives.

Conformément aux exigences de remplacement (R1), réduction (R2) et raffinement (R3), les expériences in vivo sont précédées de multiples expériences in vitro utilisant des méthodes in vitro de différenciation des cellules T mises en place au laboratoire ce qui permettra de n'utiliser que le nombre de souris strictement nécessaire (R1+R2).

Le métabolisme tumoral in vivo est profondément différent de celui observé in vitro. Malheureusement, il n'existe pas à ce jour d'autre alternative à l'expérimentation animale pour étudier in vivo des mécanismes moléculaires et métaboliques impliqués dans le développement des lymphomes T (R1). Pour réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés, tout en garantissant l'obtention de résultats robustes d'un point de vue statistique, nous avons utilisé le logiciel de prédiction statistique (GPower) (R2). De plus, les animaux transgéniques générés (mâles et femelles) seront tous utilisés et cela nous permettra de maintenir l'élevage à bas bruit (R2). Lorsque les animaux devront être traités avec deux molécules simultanément, le nombre de groupe témoin sera réduit de deux (un groupe témoin par traitement)

Les souris sont hébergées au maximum par 5 dans des cages de 500 cm² avec un enrichissement systématique du milieu avec du matériel de nidification et des maisonnettes (R3). De plus, toute manipulation des animaux sera effectuée par des manipulateurs expérimentés afin d'éviter tout geste susceptible de faire souffrir l'animal. Toute douleur, souffrance, angoisse sera limitée par l'application de points limites précises et adaptés.

Ce projet prévoit l'utilisation de 1830 souris et est soutenu financièrement par des organismes de recherche publique.

17803 Les reins assurent l'élimination des déchets de l'organisme en assurant la filtration du sang. Ils peuvent être affectés par de nombreuses maladies très différentes mais qui entraînent généralement une perte de filtration rénale, conduisant à l'apparition de protéines dans les urines (protéinurie) normalement absentes en cas de bon fonctionnement de l'organe. Dans les cas extrêmes, cette protéinurie peut aggraver les lésions rénales et aboutir à la destruction de l'ensemble du rein.

Les mécanismes d'apparition de la protéinurie sont nombreux et encore imparfaitement connus. Une protéine a été identifiée, la vasorine, dont l'absence entrainerait une protéinurie massive et des lésions rénales. Afin de mieux comprendre le rôle de cette protéine dans le fonctionnement du rein, nous utiliserons différentes lignées de souris mutantes.

Un premier modèle dans lequel on empêchera l'expression de la vasorine par injection de tamoxifène sera élaboré, afin de visualiser l'impact d'un manque de vasorine sur l'organisme. A partir de ce modèle d'étude, la relation entre l'effet de la vasorine et la voie du TGF β (rare ligand décrit de la vasorine, capable de l'inhiber) sera étudiée. Les souris adultes seront sacrifiées à différents temps après délétion de la vasorine. L'urine des animaux sera collectée une fois par semaine afin d'évaluer la fonction rénale de manière non invasive. De même, leur tension sera prise de façon hebdomadaire, et le sang sera prélevé lors du sacrifice des animaux ce qui permettra de doser plusieurs paramètres biologiques reflétant également la fonction rénale.

Un second modèle sera étudié, dans lequel la vasorine ne sera absente que dans certaines cellules rénales appelées podocytes, qui sont des éléments clés de la filtration du sang. Ces souris seront sacrifiées à différents âges après naissance, allant de 4 jours à 22 jours, pour établir une chronologie des lésions attendues. Des variants de cette lignée, n'ayant ni la vasorine ni le TGF β 1, seront également étudiés pour voir s'il y a une corrélation entre la voie du TGF β 1 et la vasorine dans le phénotype rénal.

Cette lignée de souris servira également à apprécier le rôle de la vasorine dans des modèles de néphropathies. Les souris hétérozygotes, n'étant pas totalement dépourvues de vasorine, seront

ainsi intégrées à plusieurs protocoles d'induction de pathologies. Elles seront rendues hypertendues, malades au niveau des reins de manière chronique par administration d'un produit chimique, ou recevront par injection un sérum détruisant les reins pour mimer les pathologies humaines.

L'urine et la pression artérielle de ces souris seront prises régulièrement, jusqu'au sacrifice des animaux, lors duquel le sang sera prélevé. Les actes chirurgicaux nécessaires à l'implantation d'une mini-pompe osmotique pour établir le modèle d'hypertension seront réalisés sous anesthésie générale.

Nous effectuerons également des échographies vasculaires, qui permettent d'obtenir de manière non invasive, sans souffrance, de nombreuses informations en cinétique sur les animaux sans avoir à les sacrifier.

Enfin, des souris rapportrices dont le profil d'expression de la vasorine sera visible par fluorescence seront aussi utilisées dans les modèles de néphropathie suscités afin d'y visualiser les éventuelles variations d'expression de la vasorine, car nous ne disposons pas d'anticorps fiable permettant sa détection. La fonction rénale de ces souris sera évaluée de la même façon.

L'insuffisance rénale est une maladie complexe et seule l'expérimentation animale, résumant l'ensemble des interactions cellulaires au sein du rein, dans un organisme vivant, permettra d'étudier les mécanismes impliqués dans la protéinurie et la destruction rénale. La souris est un modèle de choix car son architecture et sa physiologie rénale sont proches de celles de l'homme. Nous tirerons parti de la transgénèse, c'est à dire le fait de pouvoir modifier les gènes des souris, pour confirmer l'importance de la vasorine dans l'organisme. Les cibles identifiées grâce aux modèles murins seront étudiées dans des cultures cellulaires en parallèle afin d'affiner nos résultats et de limiter le nombre d'animaux utilisés.

Ce projet s'inscrit sur une durée de 5 ans et un nombre maximal de 910 souris sera utilisé dans ce projet. Afin de prévenir toutes formes de souffrance et d'angoisse, ce projet sera mené dans le respect des 3R:

Remplacer : L'utilisation d'un modèle animal est une nécessité car il n'y a pas de méthode alternative pour l'étude de l'importance de la Vasorine sur le rein et sur l'organisme de façon générale.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est le minimum nécessaire permettant une analyse statistique robuste des résultats grâce aux données collectées au cours d'expériences précédentes.

Raffinement : Pour éviter toute souffrance, les procédures de chirurgie se feront sous analgésie et anesthésie générale. Les souris seront observées régulièrement et une grille précise d'évaluation des points limites sera utilisée. Tout signe de douleur, souffrance, angoisse ou stress chez les animaux sera soulagé avec des analgésiques.

L'environnement des animaux sera enrichi par du coton de nidation, des bâtonnets à ronger. A terme, les résultats de ce projet permettront de comprendre plus précisément le rôle de la vasorine dans le fonctionnement rénal. Ils pourraient permettre l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et aboutir à une meilleure prise en charge des patients atteints de maladies du rein.

17804 Le développement de nouveaux traitements de type Host Directed Therapy (HDT) visant à manipuler directement le système immunitaire de l'hôte afin de lui permettre d'éliminer une tumeur ou une infection aigue ou chronique est en plein essor. Ce type de traitement ne cible pas un pathogène ou un type de tumeurs en particulier mais un ou des mécanismes immunitaires, métaboliques, cellulaires de l'hôte qui peuvent être communs à différentes infections ou différentes tumeurs, qu'ils soient inhibiteurs ou activateurs de la réponse immune. Ces nouvelles thérapies comprennent entre autres le développement de protéines recombinantes (anticorps ou cytokines), de stimulateurs non spécifiques de l'immunité innée (par exemple de type agonistes de TLR), des petites molécules visant à interférer avec le métabolisme cellulaire par exemple.

Le laboratoire s'intéresse actuellement à ces nouvelles thérapies, notamment dans le cadre du sepsis dont l'origine peut être bactérienne, virale et/ou fongique et dans le but de rétablir la fonctionnalité du système immunitaire dans la phase d'immunosuppression post-sepsis telle qu'elle est décrite chez les patients. Le savoir-faire du laboratoire repose sur la vectorisation virale et le projet vise à démontrer l'intérêt de l'utilisation de vecteurs viraux comme carriers de molécules HDT. Pour ce faire, dans des études précliniques chez la souris, différents vecteurs viraux carriers de molécules HDT seront évalués et comparés à des molécules HDT basées sur des protéines recombinantes. Le but est de comparer la pharmacocinétique de ces molécules portées par des vecteurs viraux à celle des protéines recombinantes et d'évaluer leurs effets biologiques au niveau de l'organisme.

Bien que le modèle murin ne reproduise pas complètement la complexité des mécanismes immunitaires chez l'homme, il reste néanmoins une bonne alternative. Il permet en effet d'évaluer in vivo la pharmacocinétique des molécules d'intérêt et d'évaluer leur activité biologique notamment sur les cellules du système immunitaire à l'échelle d'un organisme complet.

A l'heure actuelle, aucun modèle in vitro ne peut se substituer au modèle murin pour ce type d'étude.

Les conditions d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées seront appliquées pour respecter le bien-être de l'animal et limiter au maximum la souffrance subie par l'animal.

Un suivi des animaux sera effectué quelques heures après toutes les injections et tout au long de la procédure afin de détecter d'éventuels symptômes de mal être. Un anesthésique local sera appliqué aux animaux avant tout prélèvements sanguins.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet sera réduit au minimum et optimisé sans compromettre les objectifs de ce dernier. Certains groupes contrôles pourront voir leur nombre d'animaux diminuer en fonction des 1er résultats obtenus.

Ce projet inclura un maximum de souris 720.

17805 Après un traumatisme crânien léger (TCL), il est possible qu'il n'y ait pas de lésion cérébrale visible en imagerie par résonance magnétique (IRM) en dépit de troubles neurologiques ressentis, parfois même à long terme, par le patient. Il est donc important pour une meilleure prise en charge de ces patients de pouvoir objectiver l'existence d'une réelle souffrance cérébrale, à l'origine de ces troubles qui atteignent à distance la mémoire, la concentration, les fonctions exécutives, etc.

Dans cette étude, nous allons

(i) mettre au point un modèle de traumatisme crânien léger chez la souris, dont le critère de validation sera l'absence de lésion en imagerie conventionnelle (avec un suivi longitudinal par IRM à l'aide de séquences classiques T2 et T2*)

(ii) Etudier l'intérêt de l'imagerie moléculaire haute résolution pour détecter de possibles atteintes cérébrovasculaires inflammatoires. Cette approche a déjà montré sa valeur pour détecter des lésions autrement silencieuses dans un modèle d'accident ischémique transitoire.

(iii) Etudier l'intérêt de l'imagerie de l'inflammation parenchymateuse par tomographie par émission de positons.

(iv) Rechercher des preuves comportementales de l'existence de déficits fonctionnels après TCL.

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

Nous avons souscrit au principe de remplacement en sélectionnant le modèle présentant le meilleur compromis entre pertinence scientifique et sensibilité de l'espèce. La souris est avec le rat l'espèce animale la plus étudiée dans le domaine des traumatismes crâniens. La physiopathologie est donc globalement établie, ce qui nous permettra d'interpréter nos résultats de manière fiable. L'ensemble des acquis et des connaissances dont nous disposons rend cette espèce particulièrement intéressante dans le cadre de notre étude.

Nous utiliserons le nombre minimal d'animaux afin de souscrire au principe de réduction. 88 souris seront nécessaires pour réaliser les 4 étapes, et l'utilisation d'outils d'imagerie non invasive permettant un suivi longitudinal permet de réduire significativement le nombre d'animaux utilisés.

Afin de souscrire au principe de raffinement, les animaux seront anesthésiés durant chaque procédure. La douleur suite à la survenue du traumatisme crânien léger est considérée comme légère: en effet, les observations initiales montrent que les animaux se déplacent et s'alimentent normalement, prennent bien soin de leur pelage, n'émettent aucun son et ne présentent aucun « sickness behavior syndrom ».

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

17806 L'omble chevalier (*Salvelinus alpinus*) est une espèce emblématique et patrimoniale du lac étudié. Ce lac subit des stress majeurs liés au réchauffement climatique et à l'augmentation de la pollution. De récentes études sur l'omble chevalier ont montré l'impact négatif de la température sur les premiers stades de vie. En plus de ce stress thermique, certains lacs sont fortement contaminés aux polychlorobiphényles (PCB) rendant la consommation de l'omble chevalier interdite. Les femelles sont particulièrement impactées par cette contamination qu'elles vont transmettre à leur descendance via la réserve vitelline. Les polychlorobiphényles (PCB) sont des composés organiques semi-volatils d'origine humaine produits industriellement à partir des années 1920 aux Etats-Unis d'Amérique dont l'utilisation et la fabrication est interdite en France depuis 1987 en raison de leur toxicité. Les PCB sont liposolubles et fortement bioaccumulables. Dans le contexte actuel de changement climatique, les variations de température pourraient avoir des conséquences indirectes abiotiques sur le comportement des PCB les rendant davantage bio-disponibles. En effet, une augmentation de la température amplifiera la dégradation et la volatilisation des PCB et par conséquent leur concentration, en particulier dans les écosystèmes aquatiques.

L'objectif de ce projet est d'étudier les impacts couplés d'une hausse de température et des effets d'une exposition maternelle aux PCB sur les descendants. L'étude de ces effets cumulés nous permettra d'observer les impacts multi-générationnels de la contamination aux PCB afin de mieux comprendre les possibles mécanismes d'adaptations face à ces effets croisés de la température et des PCB issus de l'exposition maternelle. Elle sera également une aide pour la mise en place des stratégies de repeuplement (introduction d'individus pour le soutien des populations en lac naturel). Pour répondre aux questions posées, une approche en milieu contrôlé est nécessaire afin de pouvoir isoler les effets de l'exposition maternelle des PCB couplés à une hausse de température pour en analyser leurs effets sur la survie, la condition morpho-anatomique, et différents indicateurs physiologiques des descendants. Remplacer: Le modèle animal ne peut pas être remplacé pour répondre à la problématique posée par un modèle cellulaire ou autre car il vise à étudier la réponse d'un organisme entier à des molécules chimiques polluantes. Pour éviter tout problème de variabilité inter-individus dans nos résultats et ainsi permettre une meilleure puissance statistique, les poissons utilisés sont des poissons d'élevage qui présentent moins de variabilité que des poissons qui auraient été pêchés dans le lac concerné.

Une première procédure (Contamination aux PCB de femelles et récupération de gamètes potentiellement contaminés) consiste à contaminer aux PCB des femelles avec des doses réalistes de PCB constatée dans le lac étudié. Les génitrices proviennent d'une structure d'élevage agréée et auront une acclimatation de 15 jours afin de minimiser leur angoisse. Suite à cette acclimatation les femelles seront contaminées à différents degrés (250ng/g et 500ng/g.) via un mélange de PCB (@Arochlor1254) à l'aide d'une seringue prévue à cette effet et sous anesthésie. Un mois après la contamination, afin que les tissus aient le temps de bioaccumuler les PCB, les ovules seront prélevés après anesthésie par une pression exercée sur le flanc du poisson (technique dite du stripping, classiquement employée en élevage de poisson).

Une fécondation artificielle de ces ovules sera réalisée en milieu contrôlé avec des gamètes issus de mâles non contaminés en PCB, provenant de la même structure d'élevage.

Analyse du développement d'ovocytes contaminés maternellement aux PCB (procédure 2)

Un dispositif expérimental qui comprend 6 aquariums de 300 L est mis en place. Dans ces aquariums des alevins provenant des génitrices plus ou moins contaminés via un mélange de PCB et de gamètes mâles non contaminés sont exposés à deux gradients de température (5°C température optimal de développement embryonnaire et 8. 5°C hausse de température prévue pour 2100 par les scénarios pessimistes). Différentes métriques sont étudiées tout au long de l'expérience.

Au total, 2 892 poissons seront inclus dans cette étude.

Réduire: Ce total, permettra d'effectuer les analyses biologiques nécessaires et de réaliser des analyses statistiques mathématiquement soutenables en prenant en compte la variabilité des réponses physiologiques de chaque individu, et tout en limitant au minimum le nombre d'individus mis à mort.

Les poissons seront surveillés quotidiennement (semaine et weekend) tout au long de l'expérience avec une surveillance fine particulière pour les premiers stades larvaires (3-4 fois /jours) durant deux semaines puis cette surveillance sera réévaluée en fonction de la résistance et de l'avancée des poissons (5 jours /semaines). Des mesures biométriques seront réalisées sur 90 poissons prélevés par aquarium afin d'obtenir suffisamment de matériels pour l'ensemble des analyses. Les analyses suivantes seront réalisées, sur le foie, après mis à mort : marqueurs de stress oxydatif, extraction d'ARN en vue de réaliser un transcriptome. Le muscle sera prélevé afin de réaliser le dosage du mélange de PCB injectés. Ce dosage se réalise au niveau du muscle dorsal en raison de la difficulté de le réaliser au niveau des graisses, ces dernières rendant le dosage difficile. Le dosage de l'acétyl-choline estérase a été démontré comme un marqueur d'effets neurotoxiques associés aux PCB chez des espèces de vertébrés sera également réalisé.

Le début du nourrissage s'effectuera à résorption des 2/3 du sac vitellin avec des éléments secs qui évolueront avec la croissance des animaux. Les conditions d'hébergements seront classiques. Tout au long de l'expérimentation, les structures et conditions expérimentales évolueront avec la croissance des animaux (litage, nourriture, lumière). Raffiner: En outre, des points limites suffisamment prédictifs ont été établis de manière à minimiser au maximum une éventuelle souffrance animale. De plus, dans chaque bassin, des fractions de tubes PVC seront installées pour permettre aux alevins de se cacher.

17807 L'objectif de la formation est de permettre l'apprentissage de la microchirurgie en condition opératoire avant l'application chez l'homme (lambeaux microanastomosés). Le but étant d'apprendre à des étudiants chirurgiens ou vétérinaires en formation à réaliser des microsutures vasculaires (entre deux bouts d'une artère ou d'une veine) et des microsutures nerveuses (fragments de nerfs sciatiques). L'apprentissage se déroulera sous forme de travaux pratiques (TP). La haute autorité de santé a posé, en 2012, un principe fondamental : « jamais la première fois sur le patient ». De ce fait, l'utilisation animale reste de nos jours irremplaçable par une méthode substitutive. Toutefois, afin de réduire le nombre d'animaux utilisés pendant l'année scolaire, la première séance consistera en une vidéo commentée par « surgi trainer » de l'enseignant chirurgien référent qui expliquera notamment les gestes à acquérir pour anastomoser une artère, un nerf ainsi que de montrer les techniques d'asepsie. De plus, les deux premières séances seront réservées à la dissection sur des nouilles japonaises (diamètre d'un vaisseau comparable à celui d'un homme) afin que les étudiants commencent leur apprentissage (maniement du microscope, des micro-instruments). Puis pendant les deux séances suivantes, l'utilisation de pattes de poulet permettra de compléter l'apprentissage sur les modèles inertes (dissection du nerf sciatique). Par la suite, les étudiants débiteront les séances sur l'animal. Le modèle animal sera le rat mâle adulte OFA. En effet, la réalisation d'actes techniques sur le vivant (modèle dynamique) est indispensable à la maîtrise du geste chirurgical (dissection, micro sutures) et du stress opératoire (saignement, difficultés respiratoires) avant le passage à l'homme ; paramètres qui ne peuvent être simulés par

« surgi trainer ». Toujours dans un objectif de réduction, lors de chaque séance, l'étudiant se verra attribuer un seul animal sur lequel sera réalisé l'anastomose vasculaire et nerveuse. Cette formation se déroulant sur 23 semaines et concernant 12 étudiants, le nombre total d'animaux nécessaire est : $23 \times 12 = 276$ rats par an pour un total de : $276 \times 5 \text{ ans} = 1380$ rats pour les cinq ans. En ce qui concerne le raffinement, toutes les précautions seront prises. Les animaux arriveront la semaine précédente des travaux pratiques. Ainsi, ils seront acclimatés aux locaux et, afin de réduire l'angoisse des animaux un change de litière sera réalisé quatre jours après leur arrivée qui permettra aux rats une habitude à la manipulation. L'hébergement des animaux se fera par groupe de trois (hébergements en groupe sociaux). Un coton de cellulose sera inséré dans la cage des rats pour favoriser l'enrichissement du milieu. Le jour de la séance, une prémédication se fera 45 minutes avant l'acte chirurgical à l'aide d'une injection de buprénorphine (posologie : 0.05 mg/kg) en intrapéritonéale pour assurer une couverture antalgique. Celle-ci sera réalisée par la personne référente. Afin de limiter tout stress lié à l'anesthésie, chaque animal sera préalablement sédaté par inhalation d'isoflurane à 5%. Puis, chaque animal sera placé sous-anesthésie générale par maintien au masque en continu (2L/min à 2%) lors de l'opération. Pour simuler le protocole opératoire réalisé chez l'Homme, un rasage de l'animal ainsi que de la Bétadine seront prévus pour limiter les fautes d'asepsie. Dans un but d'assurer le bien-être animal, tout acte chirurgical ne sera réalisé qu'après vérification de l'efficacité de l'anesthésie (pincement de la patte arrière, présence de mouvements involontaires) par la personne compétente. En fin de séance, la mise à mort de l'animal sera réalisée par surdosage au pentobarbital en IP toujours par l'enseignant référent.

17808 Le lipofilling est une technique courante utilisée en chirurgie plastique et réparatrice pour apporter de manière autologue du volume graisseux notamment après résection tumorale du sein. La survie des adipocytes greffés dépend d'une revascularisation rapide afin d'éviter la nécrose cellulaire. Malheureusement, le taux de prise de la greffe adipocytaire est inconstant et pourrait être amélioré de manière significative. Récemment il a été proposé que des cellules progénitrices endothéliales murines puissent améliorer la prise de greffe de cellules adipeuses. A ce jour, des progéniteurs endothéliaux humains n'ont jamais été évalués au niveau préclinique ou clinique dans la prise de greffe adipocytaire.

L'étude de l'angiogenèse, c'est-à-dire de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, nécessite l'utilisation d'un organisme entier en raison de la complexité des interactions entre les cellules et le milieu environnant. Il s'agit d'un complément indispensable aux études effectuées in vitro par des techniques de culture cellulaire.

Nous injecterons au niveau dorsal en sous-cutané chez la souris de la graisse humaine. Ces greffons adipocytaire seront enrichis de différentes combinaisons de cellules humaines isolées en culture cellulaire : progéniteurs endothéliaux provenant de sang de cordon / cellules mésenchymateuses provenant de la gelée de Wharton Jelly du cordon ombilical / cellules mésenchymateuses provenant de la moelle osseuse.

Le volume des greffons graisseux sera évalué radiologiquement par IRM sous anesthésie générale à J1, M1, M2 et M3 post-injection.

Puis, 3 mois après la greffe adipocytaire, les greffons seront retirés pour analyse. Cette étude, prévue sur 5 ans, portera sur 300 souris au total.

Malgré l'existence de nombreux modèles in vitro évaluant les différents processus impliqués dans la survie des adipocytes, l'utilisation de modèles in vivo reste indispensable en raison des nombreuses interactions cellulaires complexes entre les cellules et leur environnement qui permettent la génération de vaisseaux fonctionnels.

A terme, ce projet permettra d'étudier la capacité des progéniteurs endothéliaux à former des vaisseaux sanguins fonctionnels in vivo afin d'améliorer le rendement de la greffe adipocytaire.

La notion des 3R sera respectée durant ce projet :

1) REMPLACER : Malgré l'existence de nombreux modèles in vitro évaluant les différents processus impliqués dans la viabilité des adipocytes, l'utilisation de modèles in vivo reste indispensable en

raison des nombreuses interactions cellulaires complexes entre les cellules et leur environnement qui permettent la génération de vaisseaux fonctionnels.

L'utilisation d'un autre animal que la souris Nude ne serait pas approprié car l'expérience de l'équipe concernant les modèles vasculaires est reconnue et maîtrisée sur cette espèce donnée.

2) REDUIRE : Nous injecterons en sous cutanées deux implants graisseux par souris afin de réduire au maximum le nombre de souris Nude final.

Concernant l'expérimentation sur les souris C57BL/6JR, seules les deux meilleures conditions d'implant graisseux validées chez la souris Nude seront testées afin réduire également le nombre de souris C57BL/6JR nécessaire.

3) RAFFINER : Les méthodes utilisées seront les moins douloureuses possibles : l'injection sous-cutanée et le retrait des greffons adipocytaires seront effectuées sous anesthésie générale (isoflurane 2-3%). Les animaux seront surveillés quotidiennement avec mise en place de points limites qui permettront une prise en charge précoce en cas de douleur ou de souffrance. Des antalgiques sont prévus en cas de nécessité et un niveau de souffrance trop élevé entraînerait l'euthanasie anticipée de l'animal fin de pouvoir prendre en charge précocement toute douleur ou souffrance.

Afin de réduire au maximum la douleur et le stress, les animaux disposent d'un accès sans restriction à la nourriture et à la boisson, d'un environnement enrichi (coton) et de jeux en cage.

3) RAFFINER : Les méthodes utilisées seront les moins douloureuses possibles : l'injection sous-cutanée et le retrait des greffons adipocytaires seront effectuées sous anesthésie générale (isoflurane 2-3%). Les animaux seront surveillés quotidiennement avec mise en place de points limites qui permettront une prise en charge précoce en cas de douleur ou de souffrance. Des antalgiques sont prévus en cas de nécessité et un niveau de souffrance trop élevé entraînerait l'euthanasie anticipée de l'animal fin de pouvoir prendre en charge précocement toute douleur ou souffrance.

Afin de réduire au maximum la douleur et le stress, les animaux disposent d'un accès sans restriction à la nourriture et à la boisson, d'un environnement enrichi (coton) et de jeux en cage.

17809 Depuis de nombreuses années il est admis que la formation des métastases, qui est la principale cause de mort attribuée au cancer, est un processus tardif dans l'évolution de la maladie. Pourtant récemment des publications utilisant des modèles murins notamment dans le cancer du sein et du pancréas suggèrent qu'il existe également une dissémination précoce avant même l'apparition des premières tumeurs. Nous voulons savoir ce qu'il en est pour le cancer du côlon.

Ainsi, nous proposons de générer une lignée murine génétiquement modifiée pour permettre la production d'une protéine fluorescente rouge (Tomato) uniquement dans les cellules intestinales et le colique. L'ensemble de l'épithélium intestinal et colique sera alors rouge. En concomitance, les cellules de cet épithélium perdront l'un des deux allèles du gène APC. Ce dernier étant connu comme le tout premier gène touché dans l'immense majorité des cas de cancer colorectal. Le deuxième allèle du gène APC sera perdu aléatoirement dans le temps et initiera la formation de polypes rouges. Pour aller plus loin, afin de comprendre le rôle des cellules disséminées de façon précoce, nous proposons de mimer celle-ci en injectant des cellules tumorales dans la rate pour promouvoir la colonisation dans le foie qui est le principal organe dans lequel se développent les métastases et étudier leur impact.

La dissémination tumorale dans son ensemble ne peut être étudiée que dans un organisme intégré, il est donc inévitable de réaliser ce projet sur un modèle murin. Une attention particulière sera portée au déroulement des phases expérimentales de façon à conjuguer au mieux les impératifs scientifiques et le bien-être animal.

Dans le cadre de la règle des 3R, le nombre d'animaux a été réduit au minimum après calcul de l'échantillonnage nécessaire afin d'obtenir une puissance statistique satisfaisante et aussi bien les mâles et les femelles seront utilisées (réduire). Des mesures destinées à réduire la contrainte, la douleur et la souffrance des animaux ont été prévues comme le suivi régulier des animaux,

l'injection d'analgésiques en cas de douleur, l'application des points limites (sang dans les fèces, prostration, pattes blanches) et enrichissement des cages avec de la sciure de peuplier, copeaux et briques de peuplier (raffinement). Enfin, pour pouvoir couvrir les différentes phases de la tumorigénèse nous prévoyons l'utilisation du nombre limité de 200 animaux (Contrôles compris) sur 1 an car de nombreuses expériences seront réalisées par culture cellulaire in vitro pour éviter au plus l'utilisation d'animaux (remplacement).

17810 L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une affection grave, caractérisée par une augmentation de la pression artérielle pulmonaire due à une prolifération des cellules musculaires lisses des artères pulmonaires et une diminution de la lumière des vaisseaux. Outre la transplantation pulmonaire dont les résultats restent insatisfaisants, il n'existe à ce jour aucun traitement disponible dans les formes graves d'HTAP. Définir de nouvelles stratégies thérapeutiques représente donc un objectif prioritaire.

Récemment, la possibilité d'éliminer les cellules sénescents du poumon a émergé comme une nouvelle voie thérapeutique prometteuse pour certaines maladies liées à l'âge comme la BPCO, l'emphysème, ou la fibrose qui peuvent aboutir à des formes graves d'HTAP.

L'objectif de ce projet est :

- d'évaluer le vieillissement prématuré dans un modèle animal d'HTAP inflammatoire chez le rat,
- de réduire, voire de réverser la pathologie à l'aide d'un agent pharmacologique, l'ABT263, ciblant spécifiquement les cellules sénescents.

Nous ne pouvons remplacer les animaux, aussi tout au long de cette étude in vivo, nous respecterons la règle des 3R : Nous limiterons le projet aux seules expériences considérées comme indispensables chez l'animal, en réduisant au minimum le nombre de rats tout en garantissant l'obtention de résultats robustes scientifiquement et statistiquement. Les animaux seront suivis quotidiennement à la fois par les zootechniciens et par les investigateurs de ce projet afin de respecter leur bien-être. Les animaux disposeront de coton et de lanières de peuplier pour enrichir leur environnement. Afin d'anticiper et éviter toute souffrance, une grille d'évaluation des points limites sera mise en place, et les rats seront sous anesthésie générale et analgésie lors des manipulations.

Les résultats obtenus seront ensuite recueillis et analysés par des tests statistiques adéquats.

Le nombre d'animaux utilisés dans cette étude sera de 50 rats.

17811 Le cancer pancréatique est reconnu comme l'un des cancers les plus agressifs au monde. L'adénocarcinome ductal (PDAC) en est la forme la plus répandue (85% des cas). Son mauvais pronostic est notamment lié à un diagnostic tardif, après que la tumeur ait produit des métastases. Malgré un traitement par chirurgie et chimiothérapie, l'espérance de vie moyenne est de 5 à 6 mois après diagnostic, ce qui correspond au plus faible taux de survie (5% à 5 ans) de l'ensemble des cancers.

Le développement de nouvelles thérapies anti-tumorales (nouvelles molécules de chimiothérapie, radiothérapie, immunothérapies, thérapies ciblées) a fait naître un espoir pour les patients. Cependant, les PDAC sont peu sensibles à ces nouveaux traitements en raison d'un microenvironnement tumoral (cellules qui entourent les cellules tumorales et souvent soutiennent leur croissance) très immunosuppressif et peu propice à la diffusion des molécules de chimiothérapie. Nous avons notamment observé que les PDAC sont infiltrés par des cellules qui produisent l'enzyme immunosuppressive IL4I1.

Il a été précédemment démontré par nos travaux et les travaux expérimentaux d'autres équipes que l'enzyme IL4I1 peut diminuer la réponse immunitaire contre le cancer. En effet, IL4I1 limite la prolifération et les fonctions des lymphocytes T cytotoxiques, une catégorie de cellules immunitaires normalement capable de tuer les cellules tumorales.

L'objectif de ce projet vise à démontrer le rôle d'IL4I1 dans la croissance tumorale, la modification du microenvironnement tumoral et l'abolition de la réponse contre la tumeur dans le modèle PDAC.

Si ce rôle est prouvé, il pourrait expliquer la résistance du PDAC à l'immunothérapie par les molécules actuellement disponibles chez l'homme (qui ne ciblent pas IL411) et établir la preuve de la nécessité de mettre au point des inhibiteurs spécifiques d'IL411.

Le schéma expérimental actuel consiste à greffer des cellules tumorales de PDAC au niveau du pancréas des souris afin de permettre aux cellules tumorales de reconstituer leur microenvironnement spécifique. Du fait de la complexité du microenvironnement tumoral qui ne permet pas de le reconstituer *in vitro*, seul ce type d'expérimentation peut mimer le développement du PDAC chez l'homme.

Deux groupes de souris seront analysés de façon comparative : les souris de phénotype sauvage (dont le gène codant IL411 est fonctionnel et dont les cellules sont capables de produire IL411) et les souris KO IL411 (dont le gène codant IL411 est déficient et dont les cellules ne peuvent pas produire IL411). Le but est d'observer une différence des paramètres étudiés (croissance tumorale, composition en cellules immunitaires et caractéristiques fonctionnelles du microenvironnement tumoral) entre ces deux groupes. Les analyses sont réalisées sur les organes prélevés post-mortem (mise à mort de l'ensemble des animaux au terme de 3 semaines après injection des cellules tumorales).

Dans ce projet, nous envisageons d'utiliser 40 souris. Toutes les mesures ont été prises afin de diminuer le nombre d'animaux pour cette étude et respecter le principe de 3R. L'efficacité des molécules anti-tumorales qui ciblent à la fois les cellules tumorales et les cellules immunitaires peut être testé *in vitro* sur des cellules isolées. Par contre les thérapies qui ciblent le microenvironnement immunitaire tumorale ne peuvent être testées qu'*in vivo* sur des modèles animaux qui miment au mieux la maladie humaine.

Des analyses statistiques sont appliquées pour réduire le nombre d'animaux. Afin de limiter la souffrance animale, nous avons établi des points limites pour chaque procédure. Un examen clinique des animaux sera effectué quotidiennement. Tout signe témoignant d'une souffrance, apathie, ou déshydratation des animaux conduira à l'interruption des expérimentations en cours.

17812 Les maladies cardiovasculaires représentent aujourd'hui la première cause de mortalité dans les pays développés. L'athérosclérose, qui est leur principale étiologie, consiste en la formation de plaques d'athéromes au niveau de la paroi des artères. Ces plaques, constituées d'un dépôt de lipides et de cellules entourées d'une chape fibreuse, sont le plus souvent stables, non-symptomatiques. Mais il arrive que la chape fibreuse devienne fragile, sous l'effet d'une réaction inflammatoire chronique locale, ce qui peut entraîner la rupture de la plaque et l'obstruction thrombotique de l'artère. Cette rupture de plaque est à l'origine de conséquences dramatiques comme l'accident vasculaire cérébral ou l'infarctus du myocarde, selon sa localisation artérielle.

Les dernières avancées scientifiques mettent en lumière le rôle majeur de la réponse immuno-inflammatoire dans le développement de l'athérosclérose et ses complications. La compréhension des mécanismes impliqués dans la régulation de l'inflammation est donc un enjeu majeur de santé publique.

La réponse immunitaire à un signal de danger est classiquement divisée en une réponse innée, non spécifique et immédiate, et une réponse humorale, spécifique, plus tardive impliquant une mémoire immunologique, dépendante des lymphocytes. Cependant, des travaux récents impliquant notamment les vaccins vivants atténués (BCG contre la tuberculose ou le vaccin de la rougeole) ont montré que les cellules de la réponse immunitaire innée possédaient elles aussi une mémoire immunologique. Ainsi les cellules de l'immunité innée répondent de façon exacerbée à la ré-exposition à un stimulus inflammatoire engendrant alors une réaction pouvant être, dans certains cas, délétère. Dans les modèles murins d'athérosclérose, il a été montré que l'hypercholestérolémie transitoire reprogrammait le profil inflammatoire et métabolique des monocytes vers un profil plutôt pathogène. Cependant, les conséquences de cette reprogrammation, appelée immunité entraînée ou « Trained immunity » sur le développement de l'athérosclérose restent peu connues. La meilleure compréhension de cette immunité entraînée pourrait permettre d'identifier des cibles moléculaires afin de mieux prévenir et traiter les maladies cardiovasculaires.

Notre projet a pour but de mieux comprendre le rôle de l'immunité entraînée ainsi que les mécanismes immuno- inflammatoires impliqués dans le développement de l'athérosclérose expérimentale, dans plusieurs modèles murins. L'immunité entraînée sera induite en utilisant un régime alterné, les animaux étant exposés transitoirement à un régime riche en matières grasses dans les premières semaines de vie puis de nouveau à l'âge adulte. Les animaux contrôles recevront un régime continu en matières grasses uniquement à l'âge adulte, la durée totale finale de régime étant identique entre les 2 groupes. La complexité des mécanismes à l'origine de la maladie athéromateuse et le besoin d'étudier les interactions cellulaires dans différents organes rendent indispensable l'utilisation d'un modèle animal. Ces données pourraient permettre de développer de nouvelles approches thérapeutiques ciblant les cellules inflammatoires dans les maladies cardiovasculaires.

Ce projet comporte 3 procédures qui impliqueront 720 souris au total sur une durée de 5 ans. Des souris génétiquement modifiées nous permettront d'analyser spécifiquement le rôle de ces cellules. Les animaux auront principalement un régime riche en matières grasses soit continu soit alterné pour induire l'immunité entraînée. Les mécanismes responsables de cette immunité entraînée seront modulés par des agents pharmacologiques, administrés lors d'injections intrapéritonéales. Une expérience de splénectomie sera réalisée, une semaine avant la mise sous régime, afin de caractériser le rôle des progéniteurs hématopoïétiques de la rate dans l'induction de l'immunité entraînée. A la fin de chaque expérience, les animaux seront mis à mort après une sédation profonde. La réponse inflammatoire dans le sang et dans différents organes lymphoïdes (rate, moelle, ganglions) sera analysée, les lésions d'athérosclérose seront quantifiées le long de l'aorte. Le nombre d'animaux utilisé sera réduit par l'utilisation de tests statistiques déterminant la taille minimale des groupes expérimentaux. Enfin, la souffrance animale sera réduite au maximum par le raffinement des méthodes expérimentales notamment l'utilisation d'anesthésie et d'analgésique adaptée durant les procédures, et l'établissement de points limites adéquats en utilisant un score de sévérité et une procédure adaptée en fonction de ce score.

17813 Les maladies génétiques représentent aujourd'hui un enjeu de recherche translationnelle mais demeurent encore difficiles à traiter. Parmi elles, la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) qui est une maladie orpheline touche un garçon sur 3500 à la naissance, son pronostic étant systématiquement léthal à 25 ans en moyenne.

Ce projet s'inscrit dans le cadre d'une preuve de concept préclinique visant à démontrer l'efficacité de nouvelles molécules têtes de série dans le rétablissement de la santé des muscles striés squelettiques lésés dans la DMD. Les têtes de séries auront été préalablement identifiées par criblage à haut débit dans un modèle *in vitro* et optimisées dans leur composition et leur formulation pour permettre l'administration *in vivo*. Les composés seront testés dans un modèle de rat DMD ainsi que sur des témoins sains. Les rats myopathes DMD créés au laboratoire ont l'avantage de récapituler fidèlement les symptômes de la pathologie DMD humaine. L'espérance de vie de cette lignée est plus courte d'environ 60% par rapport à la lignée sauvage. Cela s'explique par son vieillissement musculaire accéléré aboutissant à une mort prématurée pour cause d'affaiblissement musculaire généralisé et en particulier de défauts cardio-respiratoires. Les avancées de ce plan de recherche préclinique permettront de déboucher sur le développement de candidats/médicaments. Ils seront alors développés pour une utilisation en clinique en tant que traitement de cette pathologie rare de l'enfant et du jeune adulte.

Cette étude a donc pour objectif de décrire de manière quantifiée et exhaustive l'effet de trois composés pré-sélectionnés par des tests *in vitro* par notre partenaire Anagenesis, sur la progression de la pathologie DMD dans notre modèle de rat DMD. Les composés seront testés par injection *i. p* ou *per os* pendant 4 semaines chez les rats DMD soit précocement lorsque les sujets sont encore asymptomatiques soit plus tardivement lorsque la maladie est déjà établie pour voir s'il est possible de freiner/réverser le développement de la maladie. Cette étude utilisera un total de 156 rats au maximum, traités de 4 semaines à 6 mois ou de 5 à 12 mois et comparés à des rats DMD et à des rats sains traités avec la solution véhicule contrôle, suivis de la même manière et sur la même période. Ce nombre d'animaux a été réduit au minimum en tenant compte de la variabilité

observée dans une population de rats DMD tout en ayant suffisamment de matériel pour réaliser toutes les analyses biologiques nécessaires à l'évaluation du traitement sur le décours de la maladie. Cette étude a été établie avec un minimum de rats afin d'obtenir un échantillonnage permettant d'obtenir une puissance statistiquement significative. L'estimation du nombre de rats se base sur le savoir-faire acquis par les expérimentateurs de notre structure et incluant les risques de pertes liées aux manipulations.

A l'issue de la période de traitement de 4 semaines, les rats subiront des tests physiques permettant de ségréger les rats présentant une amélioration des symptômes. En cas d'amélioration d'un des groupes, tous les rats recevront jusqu'à deux cycles supplémentaires de traitement quotidien afin d'augmenter l'effet bénéfique observé. A chacun de ces cycles, les animaux subiront les mêmes tests physiques. A l'issue du dernier cycle, ou en cas d'absence d'effet bénéfique du traitement à la fin d'un des cycles précédents, les animaux seront mis à mort. Leur sang sera prélevé avant sacrifice et les muscles seront prélevés pour des études histologiques et moléculaires.

Pour limiter le stress, les rats seront évalués à l'aide de différentes mesures non invasives dérivées de méthodes utilisées chez les patients et adaptées aux rats. Les rats seront habitués aux manipulations dès leur plus jeune âge et seront hébergés par 2-3 individus selon l'âge dans des cages contenant des enrichissements correspondant à leur espèce. Ils seront observés quotidiennement afin de suivre au plus près les éventuelles complications liées à leur maladie. Des points limites précis et suffisamment précoces pour leur éviter toute souffrance prolongée et inutile ont été définis. Un effet bénéfique étant attendu sur l'ensemble des paramètres évalués (croissance, mobilité, force, longévité), cette étude permettra de déterminer précisément le niveau de cet effet. Les expérimentations in vivo sont maîtrisées et ne devraient à priori pas entraîner d'effets secondaires avec les composés utilisés cependant une attention particulière sera portée à la tolérance du traitement et surtout à celle des manipulations quotidiennes en terme de bien-être animal. Nous effectuerons en priorité le traitement sur les animaux jeunes, si la manipulation quotidienne notamment l'administration per os s'averait trop stressante et délétère pour les animaux lors du premier cycle, le protocole serait revu avant de pratiquer les cycles suivants ainsi que l'expérimentation sur les groupes d'animaux âgés qui sont plus fragiles.

Les effets biologiques recherchés ne permettent pas le remplacement du modèle animal par un quelconque modèle in silico ou in vitro. Effet, ici l'effet des molécules testées sont hautement tributaires de leur biodisponibilité, temps de demi-vie et activité dans un organisme complexe. De plus leur application finale est d'impacter directement la structure musculaire qui ne peut être observée que dans un mammifère vivant.

Les traitements qui seront testés dans ce projet sont tous perçus, à l'issue de tests in vitro, comme susceptibles d'améliorer la survie et/ou la qualité de vie et/ou la santé musculaire des animaux traités. Concernant l'administration de composés, l'injection I. P ou le gavage seront effectués par un expérimentateur averti afin de diminuer le stress lié au traitement répété dans le temps.

17814 La télomérase est une protéine qui joue des rôles importants dans la régulation de la prolifération des cellules. En effet, la télomérase permet de conserver la longueur des chromosomes et ainsi de contribuer à l'allongement de la vie des cellules. Ainsi, la télomérase est exprimée de façon anormale dans plus de 90% des cancers humains, toutes origines confondues. Outre la stabilisation des chromosomes, plusieurs études ont montré que la télomérase exerce d'autres fonctions, qualifiées de non-canoniques, qui favoriseraient la prolifération des cellules. Cependant, les mécanismes régulant cette activité non-canonique de la télomérase restent méconnus. Comprendre ces mécanismes permettrait de développer des stratégies thérapeutiques innovantes visant à limiter l'action de la télomérase dans les pathologies où son expression est augmentée de manière anormale.

L'étude d'une lignée de souris génétiquement modifiées permettant d'augmenter l'expression de la télomérase chez la souris adulte a montré que le rein est un organe particulièrement sensible à l'activité non-canonique de la télomérase. En effet, l'augmentation du niveau d'expression de la télomérase perturbe fortement les cellules du rein qui sont responsables de la filtration du sang. La perturbation de ces cellules, caractérisée par l'activation de leur prolifération, provoque un

dysfonctionnement de la fonction de filtration rénale associé à une augmentation de la concentration en protéines dans les urines. Ainsi, le rein de ces souris montre les caractéristiques d'une pathologie rénale décrite chez l'Homme : la hyalinose segmentaire et focale (HSF). Aussi, l'analyse de biopsies de patients atteints de HSF a montré que la télomérase est surexprimée dans le rein de ces patients. Cette pathologie humaine répond mal aux traitements actuellement disponibles est aboutit à une insuffisance rénale terminale. Le développement de traitements innovants est donc grandement souhaité pour la prise en charge de ces patients.

Dans ce projet, nous allons déterminer si la modulation de la protéine pX permet de limiter les effets néfastes de la télomérase sur le rein. La protéine pX est exprimée dans toutes les cellules du corps, mais avec des niveaux différents en fonction des organes ainsi qu'en fonction des types cellulaires au sein d'un même organe. L'organe montrant la plus forte expression de pX est le testicule. Ainsi, les souris mâles qui n'ont plus de protéine pX montrent des performances de reproduction amoindries. Cependant, aucun phénotype dommageable n'est observé chez ces animaux qui n'ont plus de protéine pX (femelles et mâles).

Des études précédentes ont montré que la protéine nommée protéine X (pX) joue un rôle crucial dans la régulation de l'activité non-canonique de la télomérase. Ainsi, l'invalidation totale de pX chez les souris surexprimant la télomérase empêche cette dernière d'induire la perturbation des cellules du rein. Ces résultats suggèrent que l'inhibition médicamenteuse de pX est une stratégie thérapeutique prometteuse pour le traitement des patients atteints de la HSF. Dans ce projet, nous voulons déterminer si la modulation de pX, grâce à un inhibiteur spécifique, permet de ralentir ou de stopper la progression de la HSF chez les souris surexprimant la télomérase. Pour ce faire, nous allons tout d'abord déterminer la dose d'inhibiteur à utiliser, puis nous testerons l'effet thérapeutique de l'inhibiteur de pX sur les souris surexprimant la télomérase.

L'invalidation totale de pX chez les souris ne provoque pas de phénotype dommageable. De plus, des études préliminaires utilisant l'inhibiteur de pX chez la souris, dans d'autres contextes pathologiques, ne montrent pas d'effets nocifs associés au traitement des animaux avec cet inhibiteur. Aussi, nous n'attendons pas d'impact du traitement avec l'inhibiteur sur le bien-être des animaux.

Deux caractéristiques physiologiques observables sont associées à l'augmentation de l'expression de la télomérase chez la souris adulte :

1-La pousse accélérée des poils, suivi par leur perte. Ce phénotype n'a aucun impact sur le bien-être des animaux, et l'hébergement des animaux en groupes de 2 à 4 souris par cages favorise le maintien de la température corporelle des souris malgré la diminution de la densité des poils. Aussi, l'ajout systématique de carrés de coton dans les cages permet aux animaux de faire un nid, et ainsi favorise le maintien de la température corporelle.

2-La perturbation des cellules du rein, associée à un dysfonctionnement de la filtration rénale et au développement de la HSF.

3Rs :

1) Remplacement : Avant de planifier ce projet d'expérimentation animale, nous avons réalisé des études in vitro sur des cellules de rein en culture qui nous ont permis de confirmer que dans ce contexte, l'inhibiteur de pX permet de restreindre de manière efficace l'action de la télomérase sur ces cellules. Cependant, la HSF est un processus pathologique complexe, et l'évaluation de l'effet thérapeutique de l'inhibiteur de pX sur la progression de cette maladie ne peut pas être réalisé sur des cellules en culture. Ainsi, par définition, cet objectif scientifique nécessite le recours à l'expérimentation animale.

2) Réduction : En tenant compte des exigences de réduction imposées par la législation, nous avons choisi d'utiliser un nombre minimum de souris par groupe expérimental qui nous permet d'obtenir des résultats statistiquement exploitables. Ainsi, pour réaliser ce projet sur 5 ans, nous utiliserons un maximum de 290 animaux.

3) Raffinement : L'évolution de la pathologie rénale sera surveillée étroitement dès le début des procédures. Aussi, dans le but de limiter l'impact de l'expression forte de la télomérase sur l'état général des animaux, et conformément à la réglementation éthique en vigueur qui impose de mettre

en place les mesures permettant d'augmenter autant que possible le bien-être des animaux de laboratoire, nous avons mis en place un suivi strict et régulier de la douleur et du stress potentiellement engendrés par les procédures expérimentales décrites dans ce projet grâce à l'utilisation d'une grille de score. Enfin, nous avons également planifié dans la première procédure, une expérimentation qui nous permettra de déterminer si les doses d'inhibiteur de pX, et si les fréquences d'injections, peuvent être diminuées dans les procédures suivantes.

17815 Les lymphocytes T (ou cellules T) sont des acteurs clés de l'immunité contre le cancer. Le transfert de lymphocytes T dirigés contre les tumeurs représente une nouvelle thérapie majeure, permettant à la fois d'éradiquer directement la tumeur mais aussi de constituer une protection sur le long terme contre les rechutes. Cependant, leur prolifération (persistance et taux) peut être altérée dans un environnement immunosuppresseur, tel que le site tumoral lui-même ou par le système immunitaire de l'individu receveur. Nous proposons ici d'identifier de manière non biaisée et systématique les inhibiteurs spécifiques de ces cellules T dans ces environnements immunosuppresseurs dans le but de potentialiser de nouvelles générations de thérapies cellulaires. Nous cherchons à identifier des inhibiteurs de l'infiltration tumorale de cellules T mémoires pour améliorer l'efficacité des thérapies anti-tumorales. De plus, nous explorons la résistance des cellules T à la destruction par le système immunitaire du receveur dans le but de générer des thérapies cellulaires universelles à partir de donneurs sains de lymphocytes T. Pour cela, nous allons utiliser des ciseaux moléculaires (CRISPR-Cas9), pour inactiver un gène codant du génome dans chacune des cellules T, et en tester ainsi environ 18000. Les cellules T mutées proliférant et persistant dans ces environnements immunosuppresseurs vont être enrichies dans différents organes et nous pourrons ainsi identifier les gènes qu'il faut inactiver pour permettre leur maintien et leur expansion dans l'organisme.

Nombre d'animaux pour ce projet: N= 714 souris

Remplacer : Ni les modélisations mathématiques, ni les systèmes in vitro ne permettent de reproduire l'environnement immunosuppresseur auquel est soumis le système immunitaire in vivo. En effet, le système immunitaire est très compartimenté entre les organes lymphoïdes et les tissus avec une régulation des flux de cellules et des signaux (cytokines, chimiokines) très précise entre ces différents compartiments. De plus, l'utilisation d'un mode de sélection puissant in vivo nous permet d'identifier les inhibiteurs majeurs et non-redondants des cellules T, avec une relevance clinique immédiate.

Réduire : Nous pratiquerons le minimum d'expériences permettant à la fois d'être certain de la reproductibilité des phénomènes observés en assurant la puissance statistique nécessaire en tenant compte de la variabilité expérimentale du modèle employé.

Raffiner : Les souris sont anesthésiées pour l'imagerie. Les animaux seront suivis tous les 2/3 jours afin d'assurer leur bien-être et pour monitorer les éventuels signes de douleur, de souffrance ou de stress. Des points-limites ont été établis.

17816 Ce projet a pour objectif d'explorer l'impact que peut présenter une exposition à des rayonnements ionisants sur la pathologie de l'anévrisme aortique dégénératif selon une large gamme de doses allant de faibles (50 mGy) à modérées (5000 mGy).

L'anévrisme aortique dégénératif, qui se caractérise par une dilatation irréversible de la paroi artérielle, représente l'une des principales pathologies vasculaires tant en terme de fréquence dans la population que de mortalité. C'est une maladie retrouvée principalement chez les hommes âgés, tabagiques, hypertendus et/ou présentant de l'athérosclérose sévère (dépôt de plaques de cholestérol dans les artères).

Afin de répondre à cette question, une approche in vitro sur cellules n'étant pas suffisamment représentative d'un organisme intégré et ne pouvant pas mimer une pathologie globale mais également en vue de la complexité des mécanismes physiopathologiques qui sont responsables du développement de cette pathologie, une approche in vivo sur animal semble être indispensable.

Ce projet prévoit l'utilisation de 180 souris mâles ApoE^{-/-} (qui développent spontanément de l'athérosclérose) âgées de 6 à 8 semaines sur lesquelles seront implantées des mini-pompes

osmotiques pour une durée de 28 jours (les rendant hypertendues et leur permettant ainsi de développer un anévrisme aortique). Cette étude vient en complément d'un précédent projet pour consolider la puissance statistique du fait de l'hétérogénéité de ce modèle animal.

Les procédures utilisées suivent la réglementation afin de limiter l'impact sur le bien-être des animaux : suivi des animaux avec établissement de points-limites précoces, chirurgie sous anesthésie générale avec prise en charge de la douleur.

A terme, une meilleure connaissance des effets des rayonnements ionisants pourrait avoir un impact sur la prise en charge des patients présentant un anévrisme aortique notamment lors d'exams médicaux irradiants (radiographie, scanner).

17817 Le cancer du poumon touche chaque année 48. 000 nouvelles personnes en France, avec un taux de survie à 5 ans inférieur à 20 %. Néanmoins, avec les avancées de l'immunothérapie et des thérapies ciblées, un nouvel espoir pour mieux guérir les patients est possible. L'immunothérapie agit sur le système immunitaire du patient. Il ne s'agit pas d'intervenir directement sur la tumeur mais de stimuler les défenses naturelles de l'individu, affaiblies par le cancer. Ces médicaments de nouvelle génération permettent de réenclencher les mécanismes de protection du corps. En effet, l'organisme devient en capacité de reconnaître les cellules cancéreuses et de les éliminer. L'immunothérapie constitue donc un véritable bond en avant dans la prise en charge de cette maladie et intègre de plus en plus souvent les protocoles thérapeutiques suivis par les patients. Cependant, il existe de nombreux phénomènes d'échappement de la tumeur vis-à-vis du système immunitaire justifiant le besoin urgent d'augmenter le répertoire actuel de l'option thérapeutique.

Dans ce contexte, nous souhaitons développer de nouvelles immunothérapies, à partir d'anticorps innovants dont nous avons au préalable démontré in vitro l'efficacité à optimiser les fonctions anti-tumorales de monocytes/macrophages. Pour cela, les modèles expérimentaux que nous souhaitons utiliser sont basés sur la transplantation de cellules tumorales humaines à des souris immunodéficientes à même de « mimer » la maladie observée en clinique et de prédire la réponse thérapeutique. Il n'existe à l'heure actuelle, aucune autre méthode satisfaisante qui pourrait se substituer à l'expérimentation animale durant cette étape préclinique.

Les animaux seront hébergés dans des salles dont les paramètres d'ambiance sont contrôlés (température : 20-22°C ; renouvellement d'air : 15 volumes/heure ; éclairage artificiel : 12h jour/12h nuit). Afin de respecter leur instinct grégaire, les souris seront stabulées par petits groupes de 3 à 5 dans des cages dont l'environnement est enrichi à l'aide de copeaux de bois compactés et/ou de coton. Les animaux feront l'objet d'une surveillance quotidienne par du personnel compétent afin de détecter précocement les points limites de souffrance.

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

- Remplacer : notre projet se fera dans la continuité d'une étude in vitro. Le passage au modèle in vivo est une étape indispensable avant d'envisager un essai thérapeutique chez les patientes.
- Réduire : du fait notamment et lorsque possible, de la mutualisation de groupes contrôles et de la transplantation bilatérale des cellules tumorales, le nombre d'animaux a été limité au minimum nécessaire pour permettre de fournir des résultats statistiquement significatifs.
- Raffiner : Afin d'améliorer le bien-être animal au cours de notre étude, les besoins physiologiques des animaux seront respectés (nourriture ad libitum, cages propres, enrichissement, stabulation en groupe). Le suivi du développement tumoral se fera au cours du temps de manière non invasive à l'aide d'un pied à coulisse. L'ensemble des procédures de transplantation sera réalisé sous anesthésie associée afin d'éviter toute douleur. L'apparition de signes d'inconfort ou d'éventuelle souffrance nous conduira à choisir l'action appropriée (comme par exemple un analgésique) à mener en fonction d'une grille de score du bien-être.

Pour ce projet, qui s'inscrit dans la recherche de nouvelles formes thérapeutiques dans le traitement du cancer du poumon, nous avons estimé pouvoir gérer au maximum 5 études de ce type durant une période de 2 ans. Le nombre maximal d'animaux utilisés au cours de cette période sera donc de 100 souris.

17818 Le but de notre équipe est de créer et/ou de caractériser des modèles animaux de maladies musculaires humaines (myopathies) et de tester l'éventuelle amélioration du phénotype grâce à différentes approches de thérapie génique. Notre travail est principalement axé sur les maladies génétiques affectant les muscles, ces pathologies impliquent notamment une perte de la force musculaire et potentiellement une paralysie progressive des membres. Pour comprendre comment les mutations génétiques sont responsables de ces pathologies, nous avons dans un premier temps utilisé des modèles cellulaires. Nous planifions maintenant d'utiliser des souris pour comprendre à la fois la physiologie et la pathophysiologie dans un organisme vivant. Dans le but de mieux comprendre les fonctions des protéines impliquées dans ces pathologies et leurs interactions, nous prévoyons d'utiliser 4 modèles murins pour les myopathies congénitales et 1 lignée de souris saines. Les modifications génétiques chez les souris nous permettent d'étudier les pathologies humaines, et de mieux comprendre leur développement. Nous appliquerons nos approches de thérapies géniques par injection de virus adéno-associés (AAV) pour modifier l'expression des gènes impliqués dans ces myopathies. Nous analyserons ensuite les souris sur leurs capacités physiques et leurs force musculaire via différents tests d'aptitudes pour mesurer l'amélioration des symptômes myopathiques tels que l'endurance, la force brute, la coordination etc. . . Des études cellulaires ont été effectuées au préalable afin de réduire au maximum le nombre d'animaux. En revanche, seul un organisme entier permet d'étudier d'une part la physiopathologie et d'autre part l'amélioration des symptômes en testant des thérapies. Le modèle animal choisi est la souris car nous avons généré des animaux portant les mutations responsables des myopathies (REMPACEMENT). Plusieurs procédures expérimentales (maximum une/jour) seront réalisées chez les mêmes souris, pour réduire le nombre total de souris. Le traitement sera injecté par voie intrapéritonéale ou intramusculaire dans un muscle de la patte de la souris. Pour la voie intramusculaire une patte sera injectée par le traitement et l'autre par un contrôle. Ainsi chaque animal sera son propre contrôle et cela permet de réduire le nombre d'animaux (REDUCTION). Les souris seront surveillées quotidiennement. Tout signe de douleur sera pris en charge en prenant les mesures appropriées en fonction du niveau de douleur observé, soit un analgésique sera administré, soit les animaux seront retirés de l'étude, prématurément si nécessaire. Le suivi de nos souris inclut une observation du comportement général (perte de poids, apathie, yeux fermés) et de la paralysie des membres postérieurs. Pour les souris qui ont des difficultés pour manger de la nourriture solide (croquettes), de la nourriture en gel sera déposée dans la litière de la cage. Les procédures expérimentales seront faites sous anesthésie générale pour éviter tout inconfort ou douleur pouvant en découler. Les souris seront placées sur une plaque chauffante à 37C pour éviter une hypothermie et de l'ocrygel sera appliqué pour prévenir tout dessèchement oculaire (RAFFINEMENT). Nous réaliserons dans un premier temps une pré-étude pour déterminer la meilleure voie d'injection, le meilleur vecteur ainsi que différentes concentrations d'agent permeabilisant des vaisseaux sanguin pour obtenir la meilleure diffusion du traitement. Nous utiliserons ces résultats pour les deux types de cohortes constituées de souris males prévues pour ce projet :

- Les cohortes de type A seront injectées systématiquement avec le vecteur. Les souris passeront par des tests phénotypiques musculaires pour évaluer l'efficacité du traitement, puis la force musculaire sera analysée directement au sein du muscle.
- Les cohortes de type B seront injectées intramusculairement dans le muscle Tibialis Anterior où l'expression du vecteur sera confinée. Les deux pattes seront injectées soit avec le traitement soit avec le contrôle puis la force musculaire sera analysée directement au sein du muscle.

Un maximum de 2262 souris seront utilisées.

17819 En France, le cancer du poumon représente le 2ème type de cancer en terme d'incidence. Jusque dans les années 2010, la prise en charge thérapeutique consistait en des protocoles de résection chirurgicale, chimiothérapie ou radiothérapie. Depuis une dizaine d'année, plusieurs stratégies d'immunothérapie, dont le principe est de réactiver et/ou stimuler le système immunitaire contre les cellules cancéreuses, ont permis des progrès considérables dans le traitement des patients. La

vaccination est une des ces stratégies, elle consiste à vacciner avec des antigènes tumoraux pour induire des cellules dites « tueuses » qui vont éliminer les cellules cancéreuses. Cependant, pour certains cancers, localisés notamment dans les muqueuses, (ex : cancer du poumons ou ORL), l'induction de cellules « tueuses » sur le site même de la tumeur est insuffisante et/ou peu efficace. Des précédents travaux ont montré dans un modèle animal murin que la vaccination par voie muqueuse (intranasale) est plus protectrice dans des modèles orthotopiques de tumeurs localisées dans les muqueuses comme le cancer du poumon comparée à une vaccination par voie systémique (sous-cutanée ou intramusculaire). En effet, seule la voie intranasale permet d'induire en grand nombre sur le site même de la tumeur des cellules tueuses dites « résidentes ».

Notre projet a pour but d'optimiser la stratégie vaccinale pour induire in vivo ces cellules qui constituent une cible thérapeutique dans le cancer du poumon et de caractériser ces cellules.

Dans un premier temps, nous évaluerons l'efficacité de plusieurs adjuvants et des voies d'immunisation (sous-cutanée ou intranasale) sur la génération de ces cellules in vivo. Ensuite, nous caractériserons ces cellules : phénotype, persistance à long terme, analyses transcriptomique, moléculaire et métabolique. Enfin, un modèle orthotopique de tumeur du poumon sera induit par greffe de cellules tumorales dans le poumon ; ces souris seront ensuite vaccinées (par voie sous-cutanée ou intranasale). Nous évaluerons l'ensemble de la réponse immunitaire et l'efficacité de la réponse anti-tumorale. L'analyse des réponses immunitaires sera réalisée sur les prélèvements de sang et d'organes en post mortem.

L'utilisation du modèle murin est indispensable puisqu'il n'est pas possible de reproduire in vitro l'ensemble des acteurs cellulaires et moléculaires nécessaire à l'induction d'une réponse immunitaire ou de mimer le microenvironnement tumoral.

Cette étude nécessite 500 souris pour une période de 5 ans.

Nos travaux s'inscrivent dans une dynamique de réduction de l'utilisation d'animaux ainsi que du raffinement des conditions expérimentales afin de garantir le bien-être des animaux respectant ainsi les 3R. Les paramètres expérimentaux (stratégies vaccinales, modèles tumoraux, nombre de cellules à implanter, nombres d'animaux suffisants pour des études statistiques) ont déjà fait l'objet de publications scientifiques. Chaque procédure expérimentale sera optimisée afin de récupérer le maximum d'échantillons possible sur le même animal pour réaliser toutes les analyses.

Afin de réduire au maximum la douleur des animaux, l'implantation des tumeurs et la vaccination intranasale seront réalisées sur des souris anesthésiées, et les animaux seront hébergés dans un environnement adapté avec enrichissement du milieu (coton) et présence d'autres congénères. Ils sont suivis régulièrement. Pour chaque procédure, et afin de limiter la souffrance animale, des points limites et des critères d'arrêt sont définis selon une grille de score. L'euthanasie anticipée de l'animal sera aussi effectuée en cas d'atteinte de ces points limites.

Ces travaux de recherche pourront permettre l'identification d'une voie vaccinale thérapeutique protectrice dans le cas de cancer localisé dans les muqueuses comme le cancer du poumon.

17820 Le diabète de type 2 (DT2) et la dépression constituent des problèmes de santé publique majeurs. Ces 2 pathologies présentent une forte co-morbidité et un lien bidirectionnel. En effet, d'une part, le DT2, caractérisé par une hyperglycémie et une résistance de l'organisme à l'insuline, est associé à une prévalence élevée de développer une dépression et d'autre part, la dépression constitue un facteur de risque aux troubles métaboliques et au DT2. Cependant les processus physiopathologiques sous-tendant ce lien bidirectionnel restent mal connus et sont difficilement étudiables chez l'homme.

La plupart des modèles animaux utilisés en recherche fondamentale sur le DT2 utilise des modèles obèses et ne reflète pas le contexte clinique complet du DT2 humain. En effet, le DT2 n'est pas toujours associé à l'obésité et il est diagnostiqué à un âge de plus en plus jeune. Il a par ailleurs une composante génétique importante et est fortement augmenté en cas de diabète gestationnel. Nous utiliserons un modèle préclinique de rat non obèse atteint d'un DT2 : la lignée Goto-Kakizaki (GK). L'utilisation du modèle GK permet d'étudier l'impact du diabète sur le cerveau indépendamment de l'obésité. Le modèle GK est par ailleurs caractérisé par une exposition précoce

à un diabète gestationnel. Le modèle de diabète spontané chez le rat GK caractérisé par une période prédiabétique représente un outil majeur dans l'étude de la physiopathologie du DT2 et des troubles neuropsychiatriques associés au diabète.

Le but de notre étude est d'explorer, grâce à ce modèle rongeur, le rôle des dérégulations de l'axe corticotrope et des processus inflammatoires dans les troubles émotionnels associés au DT2. Cette étude s'inscrit dans un projet collaboratif plus large impliquant plusieurs équipes visant à explorer les changements épigénétiques au niveau du pancréas et du cerveau des rats GK. L'impact global de ce projet sera d'améliorer notre compréhension des processus sous-tendant le lien DT2 - dépression.

Ce projet nécessitera l'utilisation de 926 rats sur une durée de 4 années.

La règle des 3rs sera respectée dans ce projet. L'étude de comportements anxieux-dépressifs ne peut être réalisée que sur animaux vivants ce qui rend impossible le remplacement de ceux-ci par des modèles in vitro. Le nombre d'animaux sera réduit au mieux grâce à l'utilisation de tests statistiques montrant la différence entre plusieurs groupes. Toutes les précautions possibles (analgésie, enrichissement des cages d'hébergement) seront prises afin de raffiner nos procédures et réduire au mieux l'inconfort des animaux.

17821 Le régime maternel pendant la vie fœtale peut altérer le développement cérébral du fœtus. Ceci peut se traduire par des défauts au niveau des processus de différenciation neuronale, qui obéissent à une régulation spatio-temporelle stricte. Un défaut de développement cérébral pendant les périodes embryonnaire, fœtale et postnatale précoce peut avoir des conséquences à court, moyen ou long terme sur les capacités motrices, cognitives et métaboliques de l'individu. Le développement de l'hypothalamus en particulier peut influencer les capacités d'un individu à contrôler son métabolisme énergétique et sa prise alimentaire, ceci pouvant se traduire par une prise alimentaire excessive ou incontrôlée.

L'hypothalamus est une petite structure située au cœur du cerveau qui joue un rôle majeur dans le lien entre le système nerveux et le système endocrinien. Il intervient dans de nombreuses fonctions dont en particulier la régulation de l'équilibre énergétique et de la prise alimentaire. L'hypothalamus agit comme un centre capteur et intégrateur du corps. Il reçoit des informations hormonales, humorales ou nerveuses issues d'organes périphériques ou d'autres structures nerveuses et y répond par la sécrétion de neuro-transmetteurs et de neuro-hormones hypothalamiques.

La régulation de l'appétit en particulier résulte de l'intégration au niveau de l'hypothalamus de différents types de signaux, en particulier ceux indiquant les besoins énergétiques et la quantité de masse grasseuse du corps. Ces signaux vont entraîner une réponse hypothalamique se traduisant par une stimulation ou au contraire une inhibition de la sensation de faim ayant pour rôle d'adapter la prise alimentaire aux besoins de l'organisme. L'hypothalamus se forme pendant le développement embryonnaire et fœtal et, chez les rongeurs, la mise en place des projections et connexions neuronales se poursuit au cours des 2 premières semaines de vie. L'environnement nutritionnel pendant ces périodes peut avoir une influence importante sur le développement de l'hypothalamus en agissant sur le nombre et les caractéristiques des différents types cellulaires mais également sur la migration de ces cellules au cours du développement de la structure et sur les projections qu'elles vont initier entre les différentes zones de l'hypothalamus.

Lors d'un protocole précédent qui est en cours d'achèvement (Apafis n°7768), nous avons montré qu'une alimentation maternelle carencée en protéines (régime à 8% de protéines au lieu de 20%) pendant la gestation avait pour conséquence une altération de la neurogénèse dans l'hypothalamus des fœtus. Nous avons montré que le métabolisme et le destin cellulaire des cellules souches/progénitrices était perturbé et que ceci était associé à des variations au niveau de l'expression de nombreux gènes. Nous avons également identifié plusieurs processus de régulation qui étaient altérés par la restriction protéique maternelle.

L'objectif du présent protocole est d'approfondir les analyses cellulaires et moléculaires afin de caractériser plus précisément les voies métaboliques et régulatrices que nous avons identifiées lors

du protocole précédent. Ainsi, les expérimentations porteront majoritairement sur des cultures cellulaires réalisées à partir de cellules prélevées sur les fœtus.

Méthodologie : Nous utiliserons des femelles Sprague Dawley nullipares qui seront, à l'issue d'une période d'acclimatation, mises en présence d'un male pendant la nuit. La saillie sera confirmée le lendemain par un frottis vaginal et les rates recevront à partir du premier jour de gestation (G0) soit un régime contrôle contenant 20% de protéines, soit un régime restreint en protéines (8%). Les femelles gestantes seront sacrifiées au 17^{ème} jour de gestation (G17) et l'hypothalamus des fœtus sera prélevé pour de la culture cellulaire de cellules souches/progénitrices. Selon le nombre de fœtus de la portée et le ratio males/femelles, certains hypothalamus ne seront pas utilisés pour la culture cellulaire mais congelés à -80°. Nous sommes désormais capables de déterminer le sexe des fœtus au moment du sacrifice ce qui nous permet de combiner pour la culture cellulaire plusieurs hypothalamus provenant d'individus de même sexe. Le regroupement de plusieurs hypothalamus permet d'obtenir un nombre de cellules plus important ce qui favorise la prolifération in-vitro.

Application de la règle des 3R :

Remplacement : La complexité des effets de l'environnement nutritionnel et la complexité des processus de développement neuronal ne peuvent être reproduits autrement que par l'utilisation d'un modèle animal. Le modèle de rat né avec un retard de croissance intra-utérin suite à une restriction protéique maternelle est couramment utilisé dans le monde et parfaitement caractérisé au niveau physiologique dans notre laboratoire. Cependant, les approches cellulaires que nous souhaitons développer dans ce protocole ont aussi pour but, à terme, d'utiliser les cultures cellulaires pour tester l'impact des nutriments sur les processus cellulaires et moléculaires et ainsi limiter le nombre d'animaux. Nous prévoyons donc également dans ce protocole de tester la possibilité de congeler les cellules pour pouvoir les utiliser ultérieurement. Pour le moment, nous utilisons uniquement des cellules fraîches ce qui nous rend encore dépendants de l'utilisation des animaux.

Réduction : Pour les analyses moléculaires de type ATAC-seq et DGE-RNA-seq, qui sont des approches faisant appel à des techniques de séquençage à haut débit, le nombre de femelles gestantes et de fœtus est assez facile à déterminer du fait des contraintes de coût et d'exigences statistiques. Nous avons donc estimé que 12 portées seraient suffisantes pour ces 2 approches. Pour les approches de culture cellulaire lors desquelles nous souhaitons tester la présence de certains nutriments spécifiques, il est plus difficile d'appréhender les effectifs car nous devons dupliquer certaines conditions de culture et certaines analyses afin de confirmer les résultats obtenus. Mais il nous est impossible de connaître à l'avance les résultats. Nous estimons pour le moment que 10 portées seront suffisantes, ce nombre pouvant être réduit à la baisse. Nous prévoyons donc d'acheter 22 femelles primipares et 4 males (2 par an).

Raffinement : Les femelles seront hébergées par 2 pendant la période d'acclimatation et individuellement pendant la gestation (pour permettre un suivi de leur consommation alimentaire) et ne seront manipulées que pour une pesée 3 fois par semaine. Elles seront observées quotidiennement (consommation de nourriture, comportement défensif éventuel, signe de souffrance) et leur courbe de poids sera surveillée afin d'apprécier le bon déroulement de leur gestation.

17822 Chaque année dans le monde, entre 250 000 et 500 000 personnes souffrent d'une atteinte de la moelle épinière résultant majoritairement de traumatismes (accidents de la route, chute, violence) ou d'origine non traumatique (cancer, maladie neurodégénérative). En France, près de 10 000 personnes par an conservent à vie des handicaps invalidants après une lésion d'origine traumatique. La majorité des lésions de la moelle sont plutôt des contusions et rarement des sections totales. A l'heure actuelle, il n'existe aucun moyen de réparer une moelle épinière endommagée et de nombreuses voies de recherche se concentrent sur les moyens de limiter l'extension des dommages liés à la lésion (lésion secondaire). Cette lésion secondaire est causée par une réponse inflammatoire aigue locale au site de la lésion. Mais une réponse inflammatoire

systémique et chronique peut également être constatée dans les cas de traumatisme sévères, ce qui peut induire des dommages tissulaires en plus de la moelle épinière.

Le but de ce projet est d'étudier la réponse inflammatoire locale et systémique dans un modèle de compression de la moelle épinière en T10 chez la souris, ainsi que ses effets sur la moelle épinière et autres organes tels que poumons, foie et reins. Le prélèvement d'organes vitaux ne permet pas d'envisager cette étude chez l'homme ni l'utilisation d'un modèle in vitro (remplacement). De plus, nous chercherons à moduler cette réponse inflammatoire en traitant les souris avec des modulateurs de l'inflammation. Nrf2 est un facteur de transcription qui contrôle de nombreuses réponses cytoprotectrices, anti-inflammatoires et anti-oxydantes. Notre stratégie thérapeutique consiste à traiter les souris lésées à la moelle épinière par compression avec des modulateurs de Nrf2. Les prélèvements tissulaires seront analysés par des techniques biochimiques et histologiques et permettront d'évaluer les effets des modulateurs sur l'inflammation.

Dans le respect des 3R (réduire, raffiner, remplacer), nous utiliserons un nombre total 1485 de souris sauvages et transgéniques Nrf2 sur 5 ans. Ce nombre sera réduit au minimum nécessaire (réduction) pour la réalisation des tests statistiques envisagés (n=10 souris par groupe). Cette technique de compression de la moelle épinière en T10 induit une paraplégie temporaire de l'animal. Lors de la chirurgie, les animaux seront traités par anesthésie et analgésie afin de limiter le stress et la douleur (raffinement). Les souris lésées auront la vessie vidangée deux fois par jour (méthode de Credé), jusqu'à la récupération du contrôle de la miction. Un suivi quotidien de l'état général et du poids des animaux sera mis en place pour une action rapide en cas de souffrance. Les points limites seront la perte de poids et le dépassement de la grille de score modifiée de Morton et Griffiths (raffinement). Les animaux seront hébergés en groupe de 5 maximum pour réduire leur stress et favoriser leur interaction sociale, leur milieu sera enrichi et l'accès à la nourriture et à la boisson sera facilité et à volonté (raffinement).

17823 Le microbiote humain est composé de milliards de cellules, et de nombreuses études ont montré qu'une altération du microbiote intestinal pouvait être associée à différentes pathologies dont le Syndrome de l'Intestin Irritable (SII). Le SII est une colopathie chronique fonctionnelle touchant jusqu'à 15% de la population européenne et altérant significativement la qualité de vie des malades. Il s'agit d'une pathologie multifactorielle associant notamment un déséquilibre du microbiote intestinal ou dysbiose, se traduisant par une augmentation et/ou une diminution de certaines populations bactériennes, une hypersensibilité viscérale et une augmentation de la perméabilité intestinale. D'autre part, bien qu'étant le parasite intestinal le plus fréquemment retrouvé chez l'Homme (5 à 15% de la population française), Blastocystis reste négligé du fait de l'incertitude quant à son rôle en santé humaine, entraînant une prise en charge thérapeutique des patients limitée, et cela malgré de récentes études épidémiologiques rapportant de fortes prévalences de Blastocystis chez les patients souffrant du SII. Ainsi, dans une étude préliminaire, nous avons pu montrer que la prévalence de Blastocystis pouvait atteindre 23,2% chez les patients SII contre 16,1% dans une population contrôle. Jusqu'à présent, peu de travaux se sont intéressés aux interactions entre parasites et flore bactérienne au sein du microbiote intestinal. Des études préliminaires semblent pourtant montrer l'existence d'un « dialogue » entre les bactéries et certains parasites tels que *Entamoeba histolytica* ou *Giardia intestinalis*.

L'objectif de ce projet est de maintenir une parasitose à Blastocystis chez le rat afin d'étudier l'impact de la parasitose sur l'hôte et la transmission de la parasitose entre différents individus. Pour cela, les rats seront infectés par gavage avec des kystes purifiés de Blastocystis puis la transmission entre individus sera suivie par récupération de fèces et visualisation du parasite dans les fèces. Pour cela, des lots de 10 animaux seront régulièrement infectés par Blastocystis, et ceci 2 fois par an soit un total de 20 rats par an sur l'ensemble du projet.

De plus, ce projet est conforme aux exigences éthiques en matière d'expérimentation animale. En effet, (1) les expérimentations sont organisées de façon à obtenir des résultats statistiquement exploitables avec le plus petit nombre d'animaux possible. Les tests statistiques seront réalisés grâce au programme d'analyse statistique GraphPad Prism 7. 0 et les principales analyses, notamment de suivi du poids seront effectuées grâce à des tests ANOVA one-way ou two-way suivis d'un post test

adéquat en fonction du résultat. (2) Les expérimentations et la méthodologie sont optimisées afin de réduire l'inconfort, la douleur ou l'angoisse subies par les animaux (soin porté à l'amélioration des conditions d'élevage et d'hébergement, enrichissement du milieu pour les animaux en bas âge). Après réception, les rats sont placés dans leur cage en animalerie et une période d'habituation d'une semaine est réalisée. Les rats, mâles et femelles, seront hébergés séparément par 2 ou 3 dans une cage contenant du milieu d'enrichissement de type petite maisonnette de chez Genobio ainsi que du coton. De plus, les modèles animaux sont choisis avec pertinence afin de répondre à la problématique posée. (3) Le recours à l'animal est indispensable afin de pouvoir évaluer le niveau de sensibilité viscérale puisqu'il n'existe pas d'alternative pour réaliser ces expériences.

17824 Face à la demande croissante des consommateurs en produits de la mer, l'aquaculture est un secteur en pleine expansion au niveau mondial. En France, la pisciculture marine se distingue par le savoir-faire de ses écloséries, qui exportent à l'international. Cette filière est confrontée à des épisodes infectieux dus à des agents pathogènes qui impactent les élevages de bars européens (ou bar commun ; *Dicentrarchus labrax*) et de daurades royales (*Sparus aurata*). Les mortalités et morbidités induites ont un effet sur le bien-être animal et la productivité. Pour répondre à ces menaces, contribuer à la réduction de l'usage d'antibiotiques en nutrition animale et valoriser les ressources naturelles, le développement et l'utilisation de probiotiques, complément microbien vivant qui a un effet bénéfique sur l'hôte, représentent une solution innovante et durable.

Des souches bactériennes de *Pseudoalteromonas* isolées de l'environnement marin ont démontré in vitro des propriétés intéressantes d'inhibition de la croissance de plusieurs bactéries pathogènes d'animaux aquatiques. Des expérimentations menées sur crevettes ont confirmé la capacité de ces souches à rendre les animaux plus résistants à des épisodes infectieux mais également à améliorer leurs performances de croissance et à limiter la formation de biofilms bactériens dans les installations d'élevage. L'objectif de ce projet est déterminer le potentiel de ces souches pour améliorer les performances de croissance et de résistance à des pathogènes chez des poissons marins (bars communs, daurades royales).

La première phase expérimentale, qui fait l'objet de cette demande, consiste à définir les modalités d'administration des souches probiotiques aux poissons au travers de 3 procédures. La première visera à déterminer les conditions expérimentales optimales permettant d'imprégner durablement des alevins de bars avec ces souches et de vérifier leur innocuité. La seconde examinera la persistance de ces souches dans les poissons et leur environnement. La dernière consistera à valider pour la daurade le protocole mis au point chez le bar. Un total de 1540 poissons juvéniles (1260 bars et 280 daurades) seront utilisés.

Ces procédures expérimentales seront menées dans le respect de la règle des 3R, à savoir la réduction du nombre d'animaux utilisés au seuil de la pertinence scientifique et statistique et le raffinement dans la gestion des lots de poissons. Les mesures de raffinement viseront à assurer des conditions optimales d'hébergement des animaux, à savoir, un volume d'eau adapté en circuit ouvert avec une oxygénation suffisante en fonction de la biomasse, un rythme jour/nuit naturel, la présence de suffisamment de congénères pour exprimer un répertoire comportemental riche, une alimentation adaptée à leur stade de développement. Aucun effet négatif des souches probiotiques sur les poissons n'est attendu. La nécessité de reproduire in vivo le potentiel de ces souches, déjà identifié chez les crevettes, sur deux espèces marines majeures de poissons ne permet pas de remplacer l'utilisation d'animaux.

17825 Les troubles du sommeil sont très fréquents, ils touchent environ 1/3 de la population. Ils sont encore plus élevés dans les maladies neurologiques, telles que la maladie de Parkinson ou la maladie d'Alzheimer. Ces troubles se caractérisent par une désorganisation du sommeil, ce qui se traduit par une mauvaise qualité de l'éveil et du sommeil. Ces troubles altèrent fortement la qualité de vie des sujets car ils sont incompatibles avec la réalisation d'activités quotidiennes nécessitant de l'attention, comme la conduite automobile. A l'heure actuelle, ces troubles du comportement de veille/sommeil ne sont pas améliorés de façon optimale par les traitements disponibles. Il semble

même que les troubles du sommeil soient des facteurs aggravants pour les maladies neurodégénératives.

Afin d'améliorer la qualité de vie de nombreux sujets, sains ou atteints de maladies neurodégénératives, il est important de mieux comprendre les troubles de veille/sommeil pour pouvoir proposer un traitement efficace. Les mécanismes à l'origine de ces troubles ne sont pas du tout élucidés. Il est clairement établi que l'activité du cortex cérébral nous aide à déterminer les différents états de veille/sommeil. Ainsi, l'impact de la stimulation électrique de certaines régions profondes du cerveau sur l'activité du cortex sont des éléments fondamentaux pour mieux comprendre ces troubles.

Nous avons donc pour objectif de mieux comprendre les activités cérébrales qui déterminent le comportement de veille/sommeil chez le macaque.

Dans un 1er temps nous mettrons au point un dispositif permettant d'enregistrer les différentes zones du cerveau impliquée dans le comportement de veille/sommeil, et dans une 2eme temps nous étudierons l'effet de la stimulation électrique de ces zones dans le but de restaurer une activité normale.

Raffiner : la plupart du temps, ces expériences seront réalisées dans la cage d'hébergement permettant de diminuer considérablement l'inconfort et le stress de l'animal. Les autres expériences seront réalisées sur un dispositif auquel il aura été habitué afin de diminuer le stress et l'inconfort durant ces expériences. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance. De plus, les procédures expérimentales seront effectuées sous traitement analgésique, sous anesthésie générale et locale et dans des conditions stériles afin de réduire au maximum tout risque de douleur ou d'infection. Après les procédures expérimentales, un suivi intensif de l'animal avec des points limites adaptés sont mis en place. Et pour prévenir de douleurs et d'infections potentielles, il recevra un traitement analgésique et antibiotique.

Réduire : Cette étude pilote nécessitera 1 animal, afin d'obtenir des résultats exploitables permettant d'évaluer les paramètres de stimulation électrique capables d'influencer de façon optimale les activités cérébrales et donc le comportement de veille/sommeil. Mais un 2ème animal pourra être inclus dans cette étude si nécessaire. Ce nombre d'animaux est suffisant pour ne pas compromettre la validité des expériences.

Remplacer : Le macaque constitue un modèle de choix pour mieux comprendre les troubles du comportement de veille/sommeil. Il présente des structures cérébrales similaires à celles de l'humain, avec un comportement de veille/sommeil identique à celui de l'humain. Ce qui n'est pas le cas des rongeurs qui sont des animaux nocturnes avec un comportement de veille/sommeil très différent. Il est également impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique.

Le dispositif utilisé dans cette étude, s'apparente à un équipement déjà développé pour l'humain. Cette étude nous permettra d'élargir son utilisation aux traitements des troubles de veille/sommeil.

17826 L'obésité est un facteur de risque majeur des complications cardiométaboliques telles que le diabète de type 2 ainsi que les maladies cardio-vasculaires et hépatiques. Cependant, certains individus obèses semblent protégés des complications métaboliques de l'obésité. L'hypothèse de la « limite d'expansion du tissu adipeux » propose que chaque individu possède sa propre capacité de stockage de graisses au sein de son tissu adipeux blanc (TAB) et que lorsque celle-ci est atteinte, les lipides vont se déposer de manière ectopique dans différents organes et contribuer au développement de l'insulinorésistance par des mécanismes de lipotoxicité. Dans ce contexte, la dysfonction adipocytaire, qui altère la capacité de stockage et d'expansion saine du TAB, est un élément physiopathologique clé des complications cardiométaboliques associées à l'obésité. Cependant, les mécanismes moléculaires rendant l'adipocyte dysfonctionnel et insulinorésistant restent peu connus.

Nos travaux préliminaires font état de l'implication du cholestérol dans la mise en place de la dysfonction adipocytaire. Nous avons notamment montré que l'estérfication du cholestérol dans

l'adipocyte est primordiale : chez la souris nourrie avec un régime gras et présentant un TAB dysfonctionnel, la capacité d'estérification est saturée. Nos données chez des patients obèses et en culture cellulaire confirment le rôle clé de l'estérification du cholestérol dans l'homéostasie adipocytaire.

Les acides gras mono-insaturés (AGMI) sont les acides gras majoritaires des esters de cholestérol. Plusieurs travaux et données de la littérature montrent qu'une supplémentation alimentaire en AGMI est bénéfique sur des paramètres systémiques liée à l'insulinorésistance dans des modèles murins d'obésité et de diabète de type 2 induits par un régime gras. Cependant, nous ne savons pas les effets d'une telle supplémentation sur l'homéostasie adipocytaire, le métabolisme du cholestérol dans l'adipocyte ainsi que sur les complications cardiométaboliques associées cette dysfonction adipocytaire. L'objectif de ce projet est de mieux comprendre les effets des AGMI alimentaires sur le métabolisme du cholestérol dans l'adipocyte, sur la dysfonction adipocytaire ainsi que sur les complications métaboliques qui en découlent (insulinorésistance, complications hépatiques et complications cardiaques).

Nous nous sommes efforcés de respecter dans ce projet la règle des 3 R (Réduire, Raffiner, Remplacer). Le projet préconise l'utilisation d'un nombre de 720 animaux, ce qui, dans un souci de réduction correspond au nombre minimal d'animaux permettant d'obtenir des résultats significatifs. Nous avons précédemment défini la cinétique de l'apparition des complications métaboliques associées à la prise d'un régime gras et donc raffiné le nombre d'animaux et le temps de l'expérimentation. Nous avons raffiné nos protocoles en prenant en compte le bien-être animal, un examen régulier permettra de prévenir les risques de stress et de souffrances. Nous avons intégré la gestion de la souffrance animale en utilisant les anesthésiques et analgésiques adaptés à chaque procédure. Les animaux seront hébergés dans des cages ventilées avec de l'enrichissement et ne sont pas plus de 5 par cage. Les souris sont anesthésiées à l'isoflurane avant d'être mises à mort par dislocation cérébrale. Nos expériences chez l'animal sont indispensables pour observer des réponses physiologiques intégrées mais nous effectuerons de nombreuses études en cultures cellulaires (fibroblastes 3T3-L1 différenciés en adipocytes matures) afin de remplacer au maximum l'utilisations des souris.

17827 Le sepsis est une affection médicale sérieuse caractérisée par des réponses inflammatoires systémiques dérégulées en réponse à une infection, conduisant à un dysfonctionnement d'organes, concomitantes d'une phase d'immunodépression responsable d'une susceptibilité accrue au développement d'infections secondaires. Malgré une prise en charge précoce des patients (antibiotiques à large spectre, réanimation hémodynamique, etc.), le sepsis reste associé à un taux de mortalité important dans les unités de soins intensifs (20-40% des patients septiques 28 jours après le sepsis et 50-70% dans les mois suivants) essentiellement dû à l'incapacité du système immunitaire du patient immunodéprimé à répondre contre de nouvelles infections. Rétablir l'homéostasie du système immunitaire du patient septique représente donc un enjeu capital.

Le modèle animal est actuellement le seul modèle permettant d'étudier le système immunitaire et reproduisant la complexité de la dynamique du sepsis qui englobe à la fois des mécanismes hémodynamiques, biochimiques et immunologiques.

Le modèle CLP combinant la nécrose tissulaire et le sepsis polymicrobien, reproduit le plus fidèlement possible les mécanismes biologiques observés chez l'Homme. De plus, il s'agit du seul modèle dans lequel coexistent les deux phases clés du sepsis : la phase inflammatoire et la phase d'immunodépression.

De précédents travaux ont montré que le modèle murin CLP induisait des paramètres caractéristiques de l'immunodépression du système immunitaire adaptatif et inné tels que ceux observés chez le patient septique. Les cellules de la réponse immunitaire innée et adaptative ont des rôles différents, mais complémentaires, dans l'instauration de la réponse immunitaire. En effet, à la suite d'une infection, la réponse innée représente la première ligne de défense de l'organisme et précède donc la réponse adaptative. Restaurer le système immunitaire inné et adaptatif représente donc un intérêt médical majeur chez le patient septique immunodéprimé.

L'objectif de cette étude est de comparer la capacité d'un candidat immunothérapeutique à celle de la protéine recombinante référente à restaurer la réponse immunitaire adaptative de l'animal immunodéprimé à la suite d'un épisode septique.

Cette étude s'inscrit dans un projet de recherche global visant à développer de nouveaux traitements de l'immunodépression induite par le sepsis ciblant à la fois les cellules de la réponse immunitaire innée et adaptative. Ceci permettrait aux patients de restaurer leur système immunitaire et ainsi prévenir les infections secondaires pouvant leur être fatales.

Règle des 3R: Pour atteindre les objectifs de ce projet, il n'existe pas de méthode alternative reproduisant l'immunodépression à la suite d'un sepsis n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptible d'apporter le même niveau d'information. Le nombre d'animaux utilisés a été calculé comme étant nécessaire et suffisant pour pouvoir analyser statistiquement les résultats en tenant compte des études précédentes.

Un suivi d'éléments physiologiques et comportementaux des animaux aura lieu deux fois par jour jusqu'à la fin de chaque expérience afin d'évaluer le bien-être animal et d'intervenir de manière rapide et appropriée en cas de nécessité. Ainsi, des points limites adaptés au modèle CLP ont été définis. De plus, les analgésiques appropriés seront utilisés tout au long de la procédure. Les conditions d'hébergements des animaux seront rigoureusement contrôlées.

Le nombre de souris nécessaires pour ces expériences est évalué à 180 maximum. Cependant, les expériences prévues ne seront réalisées que si les conditions énumérées dans la procédure sont atteintes, afin de diminuer au possible le nombre d'animaux utilisés.

17828 L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre du développement d'un composé d'intérêt thérapeutique, destinés à l'amélioration des troubles métaboliques, notamment l'obésité.

L'objectif de la présente étude sera d'évaluer l'impact de ce composé sur la prise alimentaire, le poids corporel, les dépenses énergétiques et la composition corporelle chez des souris préalablement rendues obèses par un régime hyperlipidique (60% de l'énergie issue des graisses) pendant 14 semaines (préconditionnement réalisé chez le fournisseur). Le traitement sera administré par sous-cutanée pendant 16 jours, pendant lesquelles les animaux seront soumis au même régime enrichi en graisse.

Au cours du traitement, les paramètres suivants seront mesurés: poids corporel et prise alimentaire, composition corporelle, activité locomotrice, dépenses énergétiques.

La présente étude nécessitera l'emploi de 24 souris C57Bl/6 réparties en 2 groupes expérimentaux de 12 animaux (Groupe contrôle traité au véhicule et groupe traité avec le composé testé).

La règle des 3Rs a été prise en compte dans l'élaboration du présent protocole:

- Raffinement: Le modèle animal qui sera utilisé est un modèle parfaitement caractérisé dans la littérature et couramment utilisé dans les études précliniques cherchant à mettre en évidence les effets bénéfiques de composés sur la prise alimentaire, le poids corporel et les troubles métaboliques. Le protocole a été planifié de façon à limiter au maximum tout stress et tout inconfort pour les animaux. Les animaux seront hébergés en cages individuelles du fait de la nécessité de mesurer précisément l'impact du composé sur la prise alimentaire individuelle des animaux.

Néanmoins, les animaux conserveront des contacts visuels avec leurs congénères et un enrichissement des cages sera assuré par l'ajout d'igloos et de matériels de nidification. Enfin, un suivi journalier des animaux à l'aide d'une grille de score permettra une action rapide en cas d'atteinte des points limites établis.

- Réduction: Le nombre d'animaux utilisés a été rationalisé à partir de l'expérience acquise par notre laboratoire sur l'analyse des paramètres d'intérêt. Ainsi, le nombre d'animaux par groupe a été adapté en fonction des paramètres d'intérêt de façon à être en mesure de mettre en évidence une différence statistiquement significative sur les paramètres étudiés.

- Remplacement: L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe aucune méthode de substitution n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude de l'impact d'un

composé sur le poids corporel, la prise alimentaire et les autres paramètres altérés dans le cadre des troubles métaboliques.

17829 L'État de Stress Post-Traumatique (ESPT ou PTSD, pour Post-Traumatic Stress Disorder, APA 1994) est une pathologie psychiatrique qui touche 8 à 12% de la population générale et qui se caractérise par une constellation de symptômes qui surviennent après l'expérience d'un événement traumatique comme un attentat par exemple. Ce traumatisme va provoquer une réaction de peur intense, un sentiment d'impuissance ou d'horreur. La symptomatologie du PTSD apparaît au bout de quelques mois, et se caractérise par un syndrome de reviviscence traumatique, un évitement et épuisement affectif et une activation neurovégétative.

L'efficacité des thérapies pharmacologiques (antidépresseurs) ou psycho-cognitive reste cependant limitée. L'amélioration de l'arsenal thérapeutique dans le traitement du PTSD représente donc un enjeu de santé publique majeur. Ces dernières années, les techniques de neurostimulation sont en train d'émerger. Au laboratoire, nous avons mis au point le traitement par Stimulation Transcrânienne Ultrasonore répétée (rTUS) du cortex infralimbique dans le traitement de la dépression et sommes en train de faire de même pour le PTSD. C'est une technique qui offre l'avantage d'être non-invasive. Cependant, l'efficacité à long terme demeure inconnue, ainsi que les mécanismes sous-jacents.

L'objectif de cette étude sera de tester l'efficacité à long terme d'une stimulation rTUS du cortex infralimbique dans le traitement du PTSD. Cette étape est nécessaire pour étudier ensuite les mécanismes sous-jacents.

Pour cette expérience, 120 souris réparties en 4 lots expérimentaux de 30 souris, mâles et femelles en proportions égales par groupe.

En application de la règle des 3 R au modèle utilisé dans cette étude :

Raffinement : le stress traumatique appliqué aux animaux peut être qualifié de moyen, en raison de sa brièveté. Les conditions d'élevage des animaux seront optimales au regard des normes en vigueur. Tous les animaux seront hébergés ensemble, stressés et non stressés, avec enrichissement du milieu (cabanes, smarthome® et tubes). Les expérimentateurs sont experts dans la préhension/contention des souris et sont soucieux d'éviter tout stress inutile lors de la réalisation des procédures. Pendant la stimulation rTUS, les animaux sont sous anesthésie gazeuse, ils sont placés sur une couverture chauffante pour éviter toute hypothermie et leurs cornées sont protégées de la déshydratation par un gel.

Remplacement : aucune méthode alternative in vitro n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée. Le PTSD chez l'animal, comme modèle de pathologie psychiatrique humaine, repose sur l'observation du comportement de l'animal vivant.

Réduction : les effectifs sont optimisés, les observations comportementales nécessitent une taille d'effectifs suffisant compte tenu de la variabilité inter-individuelle (n=30 sujets par groupe mâles et femelles).

17830 Le syndrome du côlon irritable (IBS) fait référence à un trouble qui implique notamment des douleurs viscérales (cisaillement, tension, brûlure, crampe...) en absence d'inflammation. Cette pathologie affecte 10-20% de la population générale. Les causes de l'IBS sont mal connues et les traitements actuels ne sont pas satisfaisants.

Les méthodes alternatives, permettant une évaluation nociceptive viscérale, sont inexistantes. Ainsi, ces limitations rendent incontournables le recours à l'expérimentation animale afin de valider de nouveaux candidats médicaments pour le traitement des douleurs viscérales. Le modèle d'hypersensibilité viscérale induit par le butyrate chez le rat se rapproche de la pathologie humaine puisque l'hypersensibilité viscérale se développe en absence d'inflammation. Ce modèle, peu invasif, demande une manipulation minimisée des animaux et met en jeu deux méthodes d'évaluation non invasive permettant une évaluation au cours de temps sur le même animal.

Le butyrate sera administré par voie intra-colique deux fois par jour pendant trois jours successifs. La réponse nociceptive sera évaluée à l'aide de 2 méthodes non-invasives : la première méthode

évaluera la réponse viscéromotrice en réponse à la distension colrectale et la seconde, évaluera la douleur référée en réponse à des stimuli mécaniques (filaments de von Frey). Ces 2 méthodes pourront être faites en parallèle, sur les mêmes animaux, au cours du temps, permettant ainsi de réduire le nombre d'animaux utilisés et de répondre ainsi à la règle des 3-R.

L'objectif de cette étude sera donc d'évaluer l'efficacité de nouvelles molécules thérapeutiques dans le modèle d'hypersensibilité viscérale induit par le butyrate chez le rat. Afin de répondre à cet objectif le nombre d'animaux utilisés sera de 720 rats en raison de 12 animaux par groupe (minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs), le nombre de groupe étant fonction du nombre de molécules et/ou doses à tester.

Conformément à la directive européenne 2010/63/UE, un enrichissement adapté à l'espèce sera rajouté aux animaux (aspen brick, tunnels...). Nous ne pouvons utiliser de médication analgésique puisque la douleur est le paramètre évalué. Cependant, un contrôle quotidien sera réalisé afin de s'assurer de l'état général des animaux et de détecter des comportements atypiques suite aux éventuels effets secondaires des traitements :

- Altérations des fonctions normales (impossibilité d'uriner, de s'alimenter...),
- Vocalisation, tremblements...,
- Perte de poids élevée (mais < 20% du poids initial),
- Posture anormale (voûté ou déséquilibré pour soulager une zone douloureuse, démarche anormale, diminution des mouvements, prostration),
- Détection/présence d'une anomalie (plaie, pilo-érection...),

Dans le cas où l'animal présenterait des difficultés pour s'alimenter ou s'abreuver, l'accès à l'aliment et à la boisson lui serait facilité en plaçant ces derniers directement dans la cage. Si l'état général de l'animal ne s'améliorait pas au cours de la journée (les observations s'effectuant le matin) et qu'aucune solution ne pouvait être apportée, ce dernier serait mis à mort. De même, si un animal avait une perte de poids supérieure à 20%, l'expérimentateur mettrait à mort l'animal.

Durant toute la période d'expérimentation, l'état général des animaux sera observé tous les jours, le suivi étant assuré par les zootechniciens certifiés de l'animalerie le week-end. Ainsi, ce projet sera réalisé selon les exigences de la règle des 3-R (remplacement, réduction et raffinement).

De plus, une des procédures de ce projet est classée comme une procédure sévère, ce qui implique qu'à la fin de ce projet une évaluation rétrospective, par le comité d'éthique, sera réalisée.

17831 La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative caractérisée par des troubles cognitifs et psycho-comportementaux entraînant une perte d'autonomie. Avec le vieillissement de la population, cette maladie représente un véritable enjeu scientifique, humain, social et économique. Nous avons mis en évidence à partir des études sur la rétine un nouveau gène cible pour la maladie d'Alzheimer. Il semblerait non seulement être impliqué dans les mécanismes métaboliques à l'origine de la mémoire à long terme mais également jouer un rôle important pour la protéine TAU. Nos recherches portent donc sur une nouvelle signalisation métabolique et redox qui permettrait à terme de développer un traitement de cette maladie incurable. Notre projet utilise la transgénèse combinée à la thérapie génique par analyser chez la souris les effets sur le comportement, la fonction des synapses de l'hippocampe et son métabolisme.

Au total 480 animaux seront nécessaires à ce projet. Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Une signalétique particulière des animaux en expérimentation sera utilisée et les conditions d'hébergement seront adaptées au modèle animal. Le projet sera réalisé en respect du principe décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R » remplacement, réduction et raffinement.

Remplacement: les tests de mémoire nécessaires pour cette étude ne permettent pas de remplacer l'utilisation des animaux par des méthodes in vitro.

Réduction : Le choix d'utiliser des tests statistiques non paramétriques comme Mann-Whitney, Kruskal Wallis, Chi2 nous permettra de réduire au maximum le pool des animaux utilisés pour atteindre l'objectif scientifique fixé dans ce projet.

Raffinement : Toutes les souris ont à dispositions des carrés de cellulose et des bâtons à ronger. Pour veiller au bien être de l'animal l'utilisation d'anesthésie ainsi que des points limites adaptés seront mise en place.

17832 Dans nos sociétés vieillissantes, les problèmes d'attention liés à des conditions pathologiques ou à l'âge prennent une place grandissante. Il devient donc crucial de comprendre les mécanismes de l'attention pour améliorer les diagnostics médicaux et développer de futurs traitements. Les résultats issus de nos travaux auront donc des implications importantes dans le domaine de la santé, pour l'amélioration des conditions de vie humaine.

Nous utiliserons des souris comme modèle animal pour l'étude de l'attention tactile. Nous suivrons les réponses comportementales à des stimuli tactiles dans différents contextes (par exemple, en présence ou en l'absence de différents indices : auditifs/visuels). Les moustaches, également appelées vibrisses, sont des organes sensoriels le plus utilisé chez les rongeurs. Le but de ce projet est de comprendre les mécanismes neuronaux mis en place quand l'animal est confronté à une stimulation tactile (déviation des moustaches).

Afin de contrôler précisément leur comportement et d'étudier l'activité neuronale par imagerie, les souris doivent être attachées à la tête et limitées en eau pendant l'entraînement et les expériences comportementales.

Au préalable, des injections intracérébrales d'un virus exprimant une protéine fluorescente seront effectuées et seront suivies de la pose d'une fenêtre en verre (fenêtre crânienne) permettant la visualisation par fluorescence des neurones au cours des expériences de comportement.

Au total, 1750 souris seront utilisées dans notre projet. Pour le respect de la règle des 3R :

1) Remplacement : La souris est une espèce de choix pour étudier le système nerveux central des Vertébrés qui permet d'obtenir des informations en grande partie transposables chez l'Homme. Ce projet vise à comprendre les mécanismes à la base d'une fonction cognitive complexe : attention tactile. Dès lors, aucun des modèles in vitro ou in silico ne peut être utilisé ici.

2) Réduction : la solidité de nos hypothèses de travail vérifiée par nos études précédentes, la nature innovante des méthodes utilisées (imagerie chronique), ainsi que la qualité de la mise en œuvre des procédures (basée sur une expertise reconnue de l'expérimentateur) permettra de réduire significativement le nombre des animaux.

3) Raffinement : le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long du projet : hébergement sur portoir ventilé, en cages adaptées, enrichissement de l'environnement et points limites adaptés afin d'éliminer ou de réduire toute douleur.

17833 Dans nos sociétés vieillissantes, les problèmes d'attention liés à des conditions pathologiques ou à l'âge prennent une place grandissante. Il devient donc crucial de comprendre les mécanismes de l'attention pour améliorer les diagnostics médicaux et développer de futurs traitements. Les résultats issus de nos travaux auront donc des implications importantes dans le domaine de la santé, pour l'amélioration des conditions de vie humaine.

Nous utiliserons des souris comme modèle animal pour l'étude de l'attention tactile. Nous suivrons les réponses comportementales à des stimuli tactiles dans différents contextes (par exemple, en présence ou en l'absence de différents indices : auditifs/visuels). Les moustaches, également appelées vibrisses, sont des organes sensoriels le plus utilisé chez les rongeurs. Le but de ce projet est de comprendre les mécanismes neuronaux mis en place quand l'animal est confronté à une stimulation tactile (déviation des moustaches).

Afin de contrôler précisément leur comportement et d'étudier l'activité neuronale par imagerie, les souris doivent être attachées à la tête et limitées en eau pendant l'entraînement et les expériences comportementales.

Au préalable, des injections intracérébrales d'un virus exprimant une protéine fluorescente seront effectuées et seront suivies de la pose d'une fenêtre en verre (fenêtre crânienne) permettant la visualisation par fluorescence des neurones au cours des expériences de comportement.

Au total, 1750 souris seront utilisées dans notre projet. Pour le respect de la règle des 3R :

1) Remplacement : La souris est une espèce de choix pour étudier le système nerveux central des Vertébrés qui permet d'obtenir des informations en grande partie transposables chez l'Homme. Ce projet vise à comprendre les mécanismes à la base d'une fonction cognitive complexe : attention tactile. Dès lors, aucun des modèles in vitro ou in silico ne peut être utilisé ici.

2) Réduction : la solidité de nos hypothèses de travail vérifiée par nos études précédentes, la nature innovante des méthodes utilisées (imagerie chronique), ainsi que la qualité de la mise en œuvre des procédures (basée sur une expertise reconnue de l'expérimentateur) permettra de réduire significativement le nombre des animaux.

3) Raffinement : le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long du projet : hébergement sur portoir ventilé, en cages adaptées, enrichissement de l'environnement et points limites adaptés afin d'éliminer ou de réduire toute douleur.

17834 Notre laboratoire est spécialisé dans le domaine de l'immunologie appliquée à l'oncologie et l'infectiologie et nous offrons des prestations à des partenaires académiques ou privés. Le système immunitaire est un système dynamique dont les acteurs évoluent entre différentes localisations dans un organisme par des flux précis. Les microenvironnements de chaque organe sont spécifiques et des populations cellulaires du système immunitaire se spécialisent en fonction de l'organe ou elles sont résidentes ou recrutées. Le microenvironnement tumoral (MET) joue un rôle crucial dans la régulation du potentiel malin et de l'hétérogénéité des tumeurs. Des interactions entre les différentes populations cellulaires rencontrées dans le MET (cellules de l'immunité, fibroblastes, adipocytes, péricytes, cellules endothéliales) sont associées à l'angiogénèse, la croissance, l'immunosuppression et le processus métastatique. Les cellules de l'immunité peuvent être résidentes ou recrutées à partir du compartiment circulatoire dans le MET au cours d'un développement tumoral. L'analyse et la caractérisation par immunophénotypage des cellules présentes dans le MET pendant un processus métastatique ou thérapeutique permettrait de proposer de nouvelles stratégies anti-tumorales. Dans un premier temps, notre projet consiste à évaluer la cinétique d'un marquage in vivo en présence ou non d'un processus inflammatoire. Dans un deuxième temps, nous procéderons à un immunophénotypage par cytométrie de masse des cellules de l'immunité dans un organe, le poumon, au cours d'un processus inflammatoire afin de l'appliquer à l'analyse du MET au cours d'un processus tumoral pour répondre aux demandes de nos partenaires.

Dans le cadre de l'application de la règle des 3R, le modèle animal est irremplaçable car il n'existe pas de modèle ex vivo qui intègre la dynamique de l'ensemble des populations cellulaires de l'immunité et de leurs interactions. Le modèle murin a été choisi car son système immunitaire est largement documenté dans la littérature et est transposable à l'homme. Le principe de réduction a été appliqué et les cohortes d'animaux ont été calculées afin de produire des résultats statistiquement significatifs. Le raffinement est assuré par l'utilisation de procédures sous anesthésie, un hébergement des animaux par groupe de 3 ou 5 afin de conserver l'instinct grégaire et la présence dans les cages d'une maison de carton et de bâtons à grignoter. La nourriture et l'eau seront données ad libitum et les animaux seront surveillés par des zootechniciens. Ce projet nécessitera un total de 90 animaux qui seront utilisés dans 3 procédures après une semaine d'acclimatation à leur nouvel environnement.

17835 De nombreux candidats médicaments développés sont des anticorps monoclonaux présentant une réactivité limitée à l'espèce humaine. Dans ce cas, leur évaluation pré-clinique doit se faire in vitro et in vivo dans des modèles de souris dites "humanisées". L'objectif de ce projet est de proposer l'utilisation d'un nouveau modèle de rongeurs "humanisés": le rat. Ce qui permettra d'effectuer des prélèvements et d'avoir des modèles d'études de la réponse immunitaire humaine qui n'était pas possible à l'heure actuelle. Il s'agit de rat reconstitués avec des cellules hématopoïétiques humaines (originaires de la moëlle ou de sang). In vivo, la réponse des cellules immunitaires humaines peut alors être étudiée en absence ou en présence d'une stimulation antigénique ou d'une greffe de tissu

humain. Ce modèle pourra représenter une alternative solide à l'utilisation de primates en recherche pré-clinique.

Nous souhaitons donc mettre en place et par la suite effectuer l'étude de différents anticorps dans ces modèles de rats reconstitués par des cellules hématopoïétiques humaines ce qui nous permettra d'étudier les mécanismes impliqués dans la réponse immune à la transplantation. Ce modèle permettra l'étude de nouvelles molécules immunomodulatrices, ayant comme finalité la découverte de nouvelles thérapies actives sur le système immunitaire humain.

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

- Remplacer: Des études fonctionnelles in vitro ont été réalisées au préalable sur les différents anticorps ou molécules immunomodulatrices pouvant être utilisées. Mais du fait de l'absence du contexte physiologique et de la complexité du système immunitaire, ces études ne peuvent remplacer les études in vivo.

Il est donc nécessaire de tester l'efficacité immunorégulatrice de ces molécules dans des modèles in vivo proche de l'homme. Une alternative solide à l'utilisation de primates en recherche préclinique pourra être le modèle de rats dits "humanisés".

-Réduire: le nombre d'animaux a été réduit à 180 rats femelles et mâles, nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Le nombre de groupe a été réfléchi de sorte à avoir les contrôles suffisants pour pouvoir conclure quant aux résultats obtenus.

- Raffiner: Un suivi clinique et comportemental des animaux (poils hérissés, dos voûté, agressivité. . .) sera réalisé. De plus, les animaux atteignant une perte de poids de 20% par rapport à leur poids le plus élevé, ceux-ci seront euthanasiés ainsi que les animaux montrant des signes caractéristiques d'un mal être tel qu'un changement de comportement. De plus, afin de réduire l'angoisse, un produit d'enrichissement (igloo en PVC) sera utilisée et placée dans des cages en portoirs ventilées. Durant le protocole, une surveillance quotidienne des animaux sera effectuée pour leur poids, leur comportement et des prélèvements sanguins seront effectués toute les semaines à compter de la semaine 8 suivant l'injection des cellules hématopoïétiques afin de valider la persistance des cellules humaines chez les rats "humanisés". Les animaux contrôles et injectés avec des anticorps seront analysés afin d'obtenir un maximum d'information post-mortem: par immunohistologie pour étudier la migration des cellules injectées et leurs mécanismes d'action.

La validation de molécules dans ce modèle préclinique de rats humanisés pourra être une étape essentielle avant les tests cliniques.

17836 1. La spasticité : un important besoin médical non satisfait

La spasticité est un trouble moteur associé aux lésions du cerveau et de la moelle épinière. Cette conséquence physiologique se caractérise par des contractions involontaires et permanentes des muscles, des postures anormales et des spasmes. Elle handicape lourdement 12 millions de patients dans le monde pour lesquels il n'existe pas de traitement satisfaisant. Chez les patients, le diagnostic fait intervenir des échelles de score et une évaluation électromyographique qui étudie le réflexe myotatique. Leur prise en charge doit être la plus précoce possible. Elle est pluridisciplinaire et fait intervenir : la kinésie thérapie, la pharmacologie et la chirurgie en dernier recours. Malheureusement, aucun de ces traitements ne soulage de façon satisfaisante la spasticité et les médicaments ont d'importants effets secondaires. La spasticité reste donc un important besoin médical non satisfait que nous adressons dans ce projet.

2. Le projet

La spasticité est une pathologie complexe qui implique de nombreux systèmes et pour laquelle les mécanismes sous-jacents ne sont pas complètement élucidés. Il n'existe donc pas de modèle de remplacement. Seule l'expérimentation animale permet de définir l'efficacité et l'innocuité de nouvelles molécules avant les premiers essais cliniques. Ces molécules sont en premier lieu identifiées par criblage moléculaire et cellulaire, avant d'être caractérisées in vitro et ex vivo. Finalement, dans le but de sécuriser les essais chez les patients, ces composés doivent être étudiés

dans un organisme entier afin de déterminer leur efficacité (dose, voie d'administration) et leur toxicité. Cette dernière étape est l'objectif visé par cette demande d'autorisation de projet.

a. Généralités

La spasticité, avant et après traitement pharmacologique, sera étudiée dans un modèle rat de transection complète de la moelle épinière. Ce modèle induit une spasticité stable 5 semaines après lésion. Il est reproductible et prédictif de la pathologie humaine. La spasticité sera quantifiée par électromyographie au travers de ses 2 symptômes majeurs : le Diminution Fréquence Dépendante (DFD) du réflexe de Hoffmann (réflexe-H) et les spasmes. Ce modèle a été validé entre nos mains avec des médicaments de référence comme le Baclofène. Nous utiliserons ces mêmes molécules comme contrôle positif.

b. Livrables

Dans un modèle rat de spasticité induite par transection médullaire complète, nous définirons :

- la cinétique d'établissement de la spasticité au cours du temps par électromyographie (DFD du réflexe-H, spasmes)
- l'efficacité (dose réponse) des molécules thérapeutiques candidates Vs contrôle (véhicule seul) Vs médicaments de référence : baclofène (2 mg/kg, SC ; 18 mg/kg, PO) et/ou (Tizanidine 1 mg/kg, SC ; 12, mg/kg PO)
- la toxicité des molécules thérapeutiques (Functional Observational Battery ; FOB)

c. Nombre d'animaux

Chaque série expérimentale permettra d'étudier l'efficacité d'un composé thérapeutique et comportera au maximum 75 rats répartis en 5 groupes : 15 animaux pour la phase pilote, 36 rats tests, 12 animaux contrôles négatifs, 12 animaux traités avec un médicament de référence. Nous anticipons la réalisation de 2 séries expérimentales par an, soit un total de 750 rats sur 5 ans.

d. Remplacement, Réduction, Raffinement

La spasticité est une pathologie complexe, impliquant de nombreux organes, pour laquelle les mécanismes sous-jacents ne sont pas complètement élucidés. Il n'existe donc pas de modèle de remplacement permettant de modéliser la pathologie, et d'étudier l'efficacité de composés thérapeutiques. Néanmoins, afin de réduire le nombre d'animaux, nous nous assurerons de la validité et de la prédictivité des études in vitro avant de démarrer toute expérimentation, afin d'éviter de tester des composés non pertinents ou potentiellement toxiques. De plus, pour sécuriser les projets, des études pilotes pourront être réalisées (5 groupes de doses, n=3). Elles auront pour objectif d'évaluer la toxicité des composés et de rechercher les doses les plus prometteuses (dose range finding) afin de maximiser nos chances de succès. Finalement, le raffinement de nos procédures inclue :

- la gestion du stress et de l'anxiété: les animaux seront acclimatés (animalerie, nouveaux congénères, environnements de test) pendant 2 semaines, et habitués à la manipulation et à la contention. Ils seront également hébergés à 3 par cage, pour augmenter les interactions sociales, dans un environnement enrichi : coton, Enviro-dri, Cello House, poplar sticks
- la prise en charge précoce de la douleur : un même opérateur observera matin et soir chaque animal. La douleur sera objectivée en fonction de modifications de l'apparence, de la posture et du comportement (Miller, 2011). En parallèle, une échelle de douleur Rat Grimace Scale (Sotoclin, 2011) sera employée. Dès les premiers signes de douleur, les rats seront traités à la buprénorphine (SC, 0.05 mg/kg/8h) pendant 7 jours.
- 2 évaluations cliniques quotidiennes : activité, poids, hydratation, transit, activité vésicale/infections urinaires, cicatrisation
- des soins vétérinaires adaptés : compléments alimentaires, sérum physiologique, antibiotique (amoxicilline, SC, 100 mg/kg), analgésique(buprénorphine, SC, 0.05 mg/kg/8h)
- l'intégration de points limites stricts : une grille précise d'évaluation sera utilisée afin d'anticiper la mise à mort si nécessaire. Dans tous les cas, l'ensemble des animaux seront mis à mort à la fin de l'expérimentation

17837 Les troubles du spectre autistique (TSA) résultent d'anomalies du neurodéveloppement qui apparaissent précocement au cours de la petite enfance et persistent à l'âge adulte. Ils se manifestent par des altérations dans la capacité à établir des interactions sociales et à communiquer, ainsi que par des anomalies comportementales (réticence au changement, répétition de comportements). Avec près d'une naissance sur 100 en Europe, les cas de TSA représentent un handicap lourd non seulement pour l'enfant qui en est atteint mais aussi pour son cercle familial. Alors que la composante génétique est impliquée dans 25% des cas, le rôle des facteurs environnementaux ainsi que leur interaction avec les facteurs génétiques restent peu étudiés. Plusieurs facteurs ont ainsi été incriminés tels que des infections virales ou l'exposition à certains médicaments (acide valproïque (VPA)) au cours de la grossesse. Plus récemment, le rôle de certains polluants environnementaux dans l'émergence des TSA a été souligné. Des résultats récents obtenus chez l'Homme et chez l'animal suggèrent l'existence de modifications subtiles de différents registres comportementaux incluant les habiletés motrices, l'anxiété ainsi que l'attention chez des individus ayant été exposés précocement à des niveaux significatifs de retardateurs de flamme bromés dont l'HexaBromoCycloDoDecane (HBCDD). L'homme est principalement exposé à l'HBCDD via l'alimentation et l'ingestion de poussières domestiques, l'exposition moyenne journalière en France étant estimée à 0,21ng/kg de poids corporel pour un adulte et à plusieurs dizaines voire centaines de ng/kg chez le nouveau-né, le bébé et le jeune enfant. Alors que des effets neurotoxiques de l'exposition à ce polluant sont suspectés, ceux-ci restent à caractériser. C'est pourquoi ce projet se propose d'évaluer les effets neurotoxiques d'une exposition périnatale à l'HBCDD et le rôle que cette exposition pourrait jouer en tant que facteur de susceptibilité dans un modèle expérimental de TSA. Le projet vise donc à développer et à caractériser un modèle de TSA chez le rat par injection de VPA au cours de la gestation, puis à évaluer les effets de l'exposition conjointe à l'HBCDD sur la pharmacocinétique du VPA et l'émergence des troubles neurocomportementaux ainsi induits. Le protocole expérimental, objet de cette saisine, permettra (1) d'évaluer chez la rate gestante la pharmacocinétique du VPA selon deux voies d'administration, (2) d'évaluer si une exposition répétée à l'HBCDD peut modifier cette pharmacocinétique et (3) de déterminer les modalités d'un modèle d'autisme induit par le VPA associé à une co-exposition au polluant. Ce projet d'une durée de 3 ans inclura un total de 32 rats femelles Wistar gestantes. La conception de ce projet (doses, périodes et durées des traitements, calcul du nombre d'animaux nécessaire pour la modélisation) repose sur les résultats d'un projet récemment terminé sur des rates non gestantes. Ce projet a préalablement démontré l'absence de toxicité du VPA et permis d'établir les doses et temps de prélèvements optimaux. Du fait des modifications des facteurs physiologiques contrôlant la distribution des produits dans l'organisme lors de la gestation, ce projet vise à déterminer ces paramètres chez la rate gestante. Les animaux seront ainsi répartis en 4 groupes expérimentaux (n=8/groupe). Deux groupes seront exposés à une solution huileuse d'HBCDD à la dose de 100 ng/kg/jour pendant 12 jours dès le premier jour de gestation, les 2 autres groupes recevront au cours de la même période un volume équivalent de l'huile utilisée comme véhicule. Après 12 jours d'exposition à l'huile ou l'HBCDD, 2 groupes recevront une dose unique de VPA (500 mg/kg) par voie intrapéritonéale alors que les 2 autres seront administrés par voie orale pendant 3 jours (10e, 11e et 12e jour de gestation) à la dose de 500 mg/kg/jour. Des prélèvements sanguins seront réalisés à des temps préétablis durant les 6 heures qui suivent la dernière administration du VPA pour suivre la cinétique des 2 composés chimiques objets de l'étude. Les animaux seront ensuite mis à mort selon les recommandations éthiques, à deux temps différents afin de prélever les organes d'intérêt en vue du dosage des 2 produits dans ces tissus. L'ensemble des données sera intégré pour permettre la construction et la validation d'un modèle pharmacocinétique du VPA dans un contexte de co-exposition à l'HBCDD chez l'animal gestant. Les données cinétiques ainsi produites permettront de modéliser les interactions entre ces 2 composés dans la perspective de développer un modèle de TSA pour étudier dans un futur projet l'implication de l'exposition à l'HBCDD dans le développement de ce trouble. Les rates gestantes seront hébergées dans des portoirs ventilés par cage de 2 animaux. Les cages ont une surface de 1500 cm² et une hauteur 18 cm minimum. L'eau et la nourriture seront disponibles ad libitum. Les cages seront maintenues dans des conditions d'hébergement contrôlées (température 22+/-2°C, humidité 55+/-5%, cycle lumineux 12h/12h, lumière allumée à 19h). Le milieu sera enrichi avec des

feuilles de papier absorbant de manière à éviter le grignotage des matières plastiques des objets habituellement utilisés qui contiennent des substances pouvant interférer avec l'HBCDD. Les animaux seront surveillés et les points limites suivants relevés (diminution de la consommation alimentaire et hydrique, retard de prise de poids corporel, modifications de l'apparence physique externe et du comportement de l'animal). Si l'un de ces points limites vient à apparaître, l'animal sera isolé et surveillé, voire mis à mort selon une méthode réglementaire (injection létale) en cas de persistance de l'état de mal-être de l'animal. Ce travail nécessite le recours à l'animal entier mimant la complexité de l'organisme pour pouvoir modéliser au plan cinétique le devenir de l'HBCDD et du VPA de manière à établir une possible interaction d'ordre pharmacocinétique entre les 2 composés (Remplacement). Le nombre d'animaux prévu pour cette étude est de 38 (32 rates gestantes et 6 mâles reproducteurs). Les 32 rates seront utilisées pour l'expérience proprement dite, nombre estimé juste, nécessaire et suffisant pour garantir la qualité des résultats tout en minimisant le nombre d'animaux qui sera utilisé pour l'expérience (Réduction et Raffinement).

17838 L'ischémie critique des membres (critical limb ischemia - CLI) est la forme la plus avancée de maladie artérielle périphérique (MAP). La CLI est le plus souvent définie comme un syndrome clinique comprenant une douleur ischémique au repos, une ulcération non cicatrisante et une gangrène. C'est une maladie chronique évolutive qui nécessite une prise en charge lourde et prolongée des patients. Les premiers soins sont médicamenteux et tournés vers le traitement des plaies et de la douleur si elle est présente. La guérison des plaies est impossible chez la plupart des patients atteints de CLI qui ont un flux sanguin réduit ; par conséquent, même avec un traitement local agressif des plaies, les patients souffrant d'ischémie grave des membres et d'ulcération chronique qui ne subissent pas ou ne peuvent pas subir de revascularisation sont souvent amputés.

Les populations de CLI sont difficiles à étudier et de nombreux ensembles de données sont incomplets en raison de l'importance des pertes de suivi et des décès dans les études longitudinales, mais il y aurait environ 500 à 1000 nouveaux cas de CLI par million de personnes chaque année.

Le système de reconstruction vasculaire testé dans le présent projet crée une "nouvelle artère" à partir d'une veine.

Chez les patients souffrant d'une ischémie critique affectant le pied, l'option thérapeutique actuellement la plus fréquemment utilisée consiste à créer une fistule entre l'artère et la veine tibiales. Une fois cette fistule créée, une endoprothèse couverte (stent), c'est à dire un tube biocompatible maintenant les vaisseaux ouverts, est déployée à travers la fistule et le long de la veine pour diriger le sang vers le pied. En rétablissant la circulation de sang oxygéné dans le pied ischémique, la douleur est réduite, la cicatrisation des plaies est favorisée, et le nombre d'amputations peut être réduit. Le rôle de ces stents est de maximiser l'écoulement du sang vers le pied en maintenant les valves du mollet ouvertes, tout en empêchant les petites veines de reprendre le flux vers le cœur.

Le présent projet évalue l'intérêt de stents "fenestrés", ceux-ci permettant de faire passer le sang dans la veine, tout en préservant le flux dans l'artère, ce qui n'est pas le cas des stents actuellement utilisés. Ainsi la procédure pourrait être pratiquée sur des patients à un stade moins avancé de la maladie.

Dans cette étude, l'objectif sera donc de tester plusieurs nouveaux concepts de stents chez le porc, et pour chacun d'évaluer : la facilité et la précision de mise en place des stents, le flux à travers les vaisseaux principaux et bifurqués, la viabilité de l'implantation à court terme. Compte tenu de la complexité de l'affection considérée et du caractère intégratif des critères étudiés, cette étude ne peut pas être mimée in vitro (absence de Remplacement possible).

Les premières études étant principalement des essais de faisabilité, avec preuve de concept, il est prudent de commencer avec un nombre très réduit d'animaux (2) pour chaque étude. Le nombre total d'étude à réaliser pour atteindre notre preuve de concept sera lui aussi réduit au maximum, nous n'envisageons pas plus de 5 études, soit un total maximum de 10 animaux.

La phase chirurgicale sera réalisée sur des animaux anesthésiés avec une administration d'antalgique, pour prévenir toute souffrance de l'animal. Au delà du réveil, des analgésiques sont administrés et adaptés à d'éventuelles manifestations de douleur. Un enrichissement du milieu et la distribution de friandises sont destinées à réduire le stress ressenti par les animaux (Raffinement).

17839 D'après l'Institut National du Cancer, on estime à 382 000 le nombre de nouveaux cas de cancers et à 157 400 le nombre de décès en 2018 en France. Ces chiffres font du cancer la première cause de mortalité en France. La survie à 5 ans de personnes atteintes de cancers varie selon la localisation cancéreuse : chez les hommes, ce taux va de 96 % pour le cancer du testicule à 4 % pour le mésothéliome pleural; chez les femmes, il va de 98 % pour celui de la thyroïde à 7 % pour le cancer du pancréas.

L'ensemble de ces données justifie le besoin urgent d'augmenter le répertoire actuel de l'option thérapeutique. Dans ce contexte, notre plateforme propose à ses partenaires de réaliser des tests précliniques chez la souris afin d'évaluer l'efficacité de leurs composés thérapeutiques innovants les plus prometteurs. Pour cela, les modèles que nous utilisons sont basés sur la transplantation de cellules tumorales humaines à des souris immunodéficientes à même de « mimer » la maladie observée en clinique et de prédire la réponse thérapeutique. Il n'existe à l'heure actuelle, aucune autre méthode satisfaisante qui pourrait se substituer à l'expérimentation animale durant cette étape préclinique.

Ce projet est conçu pour respecter au mieux la règle des 3R :

- REMPLACEMENT : notre projet se fera dans la continuité d'études in vitro. Le passage au modèle in vivo est une étape indispensable avant d'envisager un essai thérapeutique chez les patients. Nous avons besoin d'un modèle permettant de reproduire d'un point de vue phénoménologique tout ce qu'implique le développement tumoral. Un organe isolé ou une espèce, autre que les mammifères, ne permettra pas d'évaluer la biodistribution du candidat thérapeutique évalué. Nous choisirons des modèles chez la souris, simples et exhaustivement décrits dans la littérature.

- REDUCTION : du fait notamment et lorsque possible, de la mutualisation de groupes contrôles et de la transplantation bilatérale des cellules tumorales, le nombre d'animaux a été limité au minimum nécessaire pour permettre de fournir des résultats statistiquement significatifs.

- RAFFINEMENT : Afin d'améliorer le bien-être animal au cours de notre étude, les besoins physiologiques des animaux seront respectés (nourriture ad libitum, cages propres, enrichissement, stabulation en groupe). Le suivi du développement tumoral se fera au cours du temps de manière non invasive à l'aide d'un pied à coulisse ou dès que possible par imagerie optique. L'ensemble des procédures de transplantation sera réalisé sous anesthésie associée afin d'éviter toute douleur. L'apparition de signes d'inconfort ou d'éventuelle souffrance nous conduira à choisir l'action appropriée (comme par exemple l'apport d'un analgésique) à mener en fonction d'une grille de score du bien-être.

Les animaux seront hébergés dans des salles dont les paramètres d'ambiance sont contrôlés (température : 20-22°C ; renouvellement d'air : 15 volumes/heure; éclairage artificiel : 12h jour/12h nuit). Afin de respecter leur instinct grégaire, les souris seront stabulées par petits groupes de 3 à 5 dans des cages dont l'environnement est enrichi à l'aide de copeaux de bois compactés et/ou de coton. Les animaux feront l'objet d'une surveillance quotidienne par du personnel compétent afin de détecter précocement toute altération du bien-être animal.

Pour ce projet, qui s'inscrit dans la recherche de nouvelles formes thérapeutiques dans le traitement du cancer, nous avons estimé pouvoir gérer au maximum 2 études de ce type par an durant une période de 5 ans. Le nombre maximal d'animaux utilisés au cours de cette période sera donc de 1110 souris.

17840 Le pancréas joue un rôle clé dans l'homéostasie nutritionnelle. Cet organe exerce plusieurs rôles dont la sécrétion d'insuline par les cellules beta, l'insuline induisant une diminution du taux de sucre sanguin en cas d'apport sucré.

Les diabètes de type 1 et 2 se caractérisent par une perte/diminution du nombre de cellules beta, et donc de la capacité de sécrétion d'insuline, résultant en une hyperglycémie chronique. Sans traitement, cette condition peut avoir de graves conséquences telles que des dommages vasculaires, des risques de cécité, d'amputation, ou même la mort. Les traitements actuels consistent en l'injection d'insuline exogène pour compenser la déficience en cette hormone. Cependant, les facteurs environnementaux tels que l'exercice, le régime alimentaire, la grossesse, ou l'âge, peuvent provoquer de fortes variations dans les niveaux de glucose sanguin, malgré un traitement à l'insuline, et donc éventuellement conduire aux complications présentées précédemment. La transplantation d'îlots représente un substitut au traitement à l'insuline mais la pénurie de donneurs empêche son utilisation généralisée.

Ainsi, d'autres alternatives doivent être développées afin de traiter efficacement les conséquences du diabète. Dans ce but, nous avons récemment découvert que les inhibiteurs de BET (protéines de la famille « motif Extra-Terminal et Bromodomaine » impliquées dans la modulation de l'expression de gènes spécifiques) pourraient moduler le développement des cellules endocrines du pancréas à la fois dans le pancréas fœtal et dans des modèles de cellules bêta humaines. Nos derniers résultats indiquent que les inhibiteurs de BET modulent la masse de cellules β fonctionnelles in vivo. Afin de déterminer si une telle activité peut être traduite chez l'homme, nous utiliserons deux inhibiteurs BET disponibles dans le commerce, JQ1 et iBET-151, que nous testerons dans des souris transplantées avec des îlots humains.

Nous prévoyons d'utiliser 288 souris pour ce projet qui répond aux exigences de la règle des 3 R :

Remplacement : Ce projet tire ses hypothèses de résultats précédemment obtenus avec des méthodes alternatives (organoïdes). Cependant, les effets cellulaires analysés sur le long terme requièrent un système biologique intégré tel qu'un organisme vivant. Ceci ne peut malheureusement pas être modélisé in vitro ou ex vivo.

Réduction : Nous utiliserons un nombre d'animaux aussi faible que possible. Sur la base de notre expérience passée et sur les conseils d'experts, le nombre d'animaux est réduit au minimum nécessaire à l'obtention de résultats significatifs et exploitables et ce, sans répétition des expériences.

Raffinement : Durant toute la procédure, les animaux seront suivis en s'appuyant sur une grille de score permettant d'évaluer et d'objectiver les éventuelles souffrances, et de mettre en œuvre des points limites précoces et adaptés. Des protocoles anesthésique, analgésique et antalgique sont prévus dans ce projet. En amont de la procédure, des dispositions (habituation) seront prises pour minimiser tout stress aux animaux.

17841 Les maladies neurodégénératives comme la maladie de Huntington (MH) sont une préoccupation croissante en santé publique. Malgré d'importants efforts de recherche, il n'existe encore aujourd'hui aucun traitement capable de combattre de façon efficace la progression de ce type de maladies.

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

Plusieurs études ont montré que chez les patients atteints de la maladie d'Huntington le métabolisme cérébral du cholestérol est altéré. L'enzyme CYP46A1, qui dégrade le cholestérol en excès dans les neurones, est déficiente dans le cerveau des patients atteints de la MH, mais aussi dans des modèles murins de la MH. Nous avons déjà la preuve de concept de notre stratégie dans des modèles murins pour la maladie de Huntington : la surexpression de CYP46A1, à l'aide d'un vecteur (de type AAV) dans les régions précocement atteintes par la pathologie chez des souris modèle permet de corriger les anomalies neuropathologiques et comportementales chez la souris modèle.

Le but principal est de tester l'efficacité et trouver la dose efficace minimale d'un AAV exprimant le gène thérapeutique (CYP46A1) dans la région cible du cerveau (striatum) du modèle murin pour la MH afin d'évaluer l'effet du traitement sur la neuropathologie et sur les fonctions motrices. De plus, les niveaux de plusieurs biomarqueurs de la MH, présents au niveau du sang seront analysés. A la fin de l'étude les souris seront euthanasiées.

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

Réduction: Le nombre d'animaux utilisés est optimisé pour obtenir des résultats statistiques. Leur nombre (194) a été restreint au minimum indispensable de façon à obtenir des données nécessaires pour valider l'efficacité d'une stratégie thérapeutique innovante qui peut être considérée comme cible dans plusieurs maladies neurodégénératives. En effet, des travaux précédents ont permis d'établir les doses de vecteur à injecter et les temps d'analyses.

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

17842 L'épilepsie touche plus de 50 millions de personnes dans le monde. Les épilepsies focales sont parmi les plus fréquentes et sévères des épilepsies, et sont souvent liées à une malformation du développement corticale (MCD). Parmi les formes génétiques d'épilepsie focale, les mutations du gène *Depdc5* représentent à l'heure actuelle les mutations les plus fréquentes chez l'homme. Ces mutations de *Depdc5* sont également associées à une dysplasie focale corticale chez l'homme, où le cortex des patients présente une délamination corticale, ainsi que la présence de neurones dysmorphiques. Cette MCD est potentiellement à l'origine de l'épilepsie, mais n'a pas encore été démontré. Il est nécessaire de mieux comprendre l'origine des crises épileptiques suite à une déficience de *Depdc5* afin de pouvoir développer de nouveaux médicaments antiépileptiques.

Les mutations somatiques (présentes dans le cortex épileptique) ont un mosaïcisme compris entre 1 et 10%. Ainsi pour comprendre l'impact de ces mutations somatiques perte de fonction de *Depdc5*, nous nous proposons de générer plusieurs modèles d'inactivation focale pour *Depdc5*. Et ceci à différents stades de développement embryonnaires (à l'aide de la technique d'électroporation *in utero*), ainsi que dans les périodes postnatales et adultes (à l'aide d'injection stéréotaxique virale). Ce travail permettra de savoir si les crises épileptiques ont pour origine un défaut purement développemental et/ou de l'excitabilité, et de corréler le stade auquel *Depdc5* est déplété avec la sévérité du phénotype.

Nos procédures expérimentales incluent l'électroporation *in utero* et l'injection de virus chez le nouveau né et l'adulte, afin de générer les groupes d'étude. Puis, nous caractériserons le phénotype de ces modèles par électroencéphalographie (EEG) vigiles, et l'étude histologique et électrophysiologique du cortex dans le but de proposer un mécanisme d'épileptogénèse. Cela nous permettra ainsi d'envisager un traitement visant ces mécanismes, et de potentiellement le tester sur nos modèles par l'administration par voie orale, IP ou intracérébrale d'agents antiépileptiques.

Nos études nécessitent l'utilisation d'animaux puisque: (1) Les modifications cérébrales conduisant à l'émergence de l'épilepsie ne peuvent pas être étudiées chez l'humain. (2) La culture cellulaire, du fait de sa connectivité réduite, ne reproduit pas certaines propriétés des crises d'épilepsie dans un cerveau entier tels que le site d'initiation et le patron de propagation des crises. (3) La modélisation *in silico* nécessite des données expérimentales encore manquantes. Les souris présentent de nombreux avantages: (1) La possibilité de reproduire l'anomalie génétique humaine grâce aux nouvelles techniques génétiques. (2) Les rongeurs ont un cerveau suffisamment

complexe pour générer des crises d'épilepsie. (3) De nombreux modèles murins d'épilepsie ont été développés permettant d'avoir accès à d'abondantes données. Nous estimons qu'un maximum de 1024 souris seront nécessaires à la réalisation de ce projet. Nos travaux seront réalisés dans l'application de la règle des 3 R (remplacer, réduire, raffiner).

Afin de limiter au maximum l'utilisation des modèles animaux utilisés au cours de ce projet, la culture neuronale sera privilégiée dans certains aspects de nos travaux (remplacer). Nous ferons une planification rigoureuse des expériences en testant préalablement la faisabilité des expériences, en combinant différents protocoles au cours d'une même expérience et en réalisant une exploitation maximale des données à l'aide de l'utilisation appropriée de tests statistiques comme le test de student (réduire). Enfin, un soin particulier sera apporté à la réduction de l'inconfort, de la douleur et du stress des animaux grâce à l'utilisation combinée d'anesthésiques et de analgésiques, mais aussi de conditions d'hébergement adéquates et en milieu enrichi (raffiner).

17843 Le cerveau des mammifères comprend en plus des neurones plusieurs types cellulaires dont le rôle dans les fonctions cérébrales n'est pas totalement connu. De plus des dysfonctionnements de ces cellules sont parfois à l'origine de pathologies cérébrales très handicapantes. Parmi ces cellules on trouve les oligodendrocytes dont le rôle principal consiste à synthétiser et ordonner la gaine de myéline autour des axones des neurones. Cette fonction est déterminante puisqu'elle assure la bonne conduction de l'influx nerveux. Des travaux récents indiquent une participation des oligodendrocytes dans la mémoire. L'hypoxie est une réduction de l'apport en oxygène qui peut impactée le fonctionnement des cellules du cerveau. Elle peut être pathologique lors d'une hypo perfusion cérébrale rencontrée lors d'un accident vasculaire cérébrale (hypoxie aigue) ou de pathologie neurodégénératives (maladies de Parkinson ou d'Alzheimer) de façon chronique. L'effet de l'hypoxie sur les oligodendrocytes n'est pas connu. Notre hypothèse est la suivante, l'hypoxie cérébrale pourrait altérer les fonctions des oligodendrocytes. En utilisant un caisson hypoxique, nous souhaitons contrôler l'hypoxie de façon précise en termes d'intensité (niveau d'oxygène dans l'air respiré par les animaux) et de durée d'exposition. Ce projet veut recueillir des données préliminaires pour déposer un projet de recherche auprès d'organismes d'aide à La recherche. Il s'agit donc d'une étude pilote qui permettra également de conduire une étude rétrospective sur le protocole pour affiner celui-ci si besoin pour le projet final. Voulant comprendre comment l'hypoxie peut moduler les fonctions des oligodendrocytes dans un processus de mémoire, il n'est pas possible de REMPLACER les études sur l'animal entier par des méthodes in vitro. Cette étude de faisabilité nous permettra de déterminer avec précision si le protocole d'hypoxie envisagé est efficace pour moduler la fonction des oligodendrocytes afin de le coupler à des études comportementales et de mesures in vivo de l'activité neuronale. Il nous permettra d'en vérifier la robustesse statistique attendue permettant de REDUIRE au minimum le nombre d'animaux. RAFFINER : ce protocole est testé dans le meilleur environnement qui soit puisqu'il se situe dans un établissement ayant une grande connaissance et une excellente pratique des protocoles d'hypoxie permettant de s'écarter au mieux des points limites potentiels de l'hypoxie induite. Les protocoles ont été raffinés au mieux pour induire une hypoxie modérée (au maximum comparable à la vie en altitude de 5000m) et les protocoles contiennent un suivi quotidien et précis des animaux par la prise régulière de paramètres vitaux avant et après l'exposition à l'hypoxie. La liste des points limites liés au protocole d'hypoxie est parfaitement connue et nous y serons particulièrement attentifs. Le projet comprendra 180 souris maximum pour 1 an et la réalisation de 18 groupes expérimentaux.

17844 L'arthrose (OA) est une maladie dégénérative et inflammatoire qui affecte l'ensemble des articulations. Les Cellules Stromales Mésoenchymateuses (CSM) sont utilisées en clinique pour leurs propriétés immunomodulatrices et anti-inflammatoires. Compte tenu du risque de fuite cellulaire et de mort après injection intra-articulaire (IA), l'encapsulation de CSM dans un hydrogel d'alginate apparaît comme une solution prometteuse pour surmonter ces limites et pour fournir un environnement 3D approprié soutenant l'activité biologique des CSM. Dans une étude précédente, des cellules stromales adipeuses humaines (hASC) ont été encapsulées avec succès dans des

microparticules d'alginate via une méthode de micromoulage. La viabilité et les propriétés anti-inflammatoires des cellules encapsulées ont été démontrées in vitro. Une première étude in vivo a été réalisée en 2019-2020 (APAFIS#19415-2019022308106044 v3) sur 24 lapins blancs néo-zélandais âgés de 15 semaines. Nos résultats montrent que l'injection IA des hASCs, qu'elles soient encapsulées ou non, semble ralentir la progression de l'arthrose dans ce modèle à court terme d'arthrose post-traumatique induite chez le lapin. Aucune différence n'a été mise en évidence en comparant les effets thérapeutiques de cellules encapsulées avec ceux des cellules non encapsulées, ce qui démontre que l'encapsulation dans des microparticules d'alginate n'empêche pas l'activité anti-arthrosique des cellules (données non publiées). Nous souhaitons maintenant déterminer si ces cellules encapsulées persistent dans l'articulation et permettent une atténuation de la progression de l'arthrose par administration IA de CSM dans un modèle à long terme. Pour cela, nous souhaitons induire chez des lapins une arthrose post-traumatique par rupture du ligament croisé crânial du genou droit. Huit semaines plus tard, nous injecterons des cellules libres ou encapsulées en IA chez ces lapins arthrosiques. Le devenir des cellules ainsi que l'impact de l'injection sur l'évolution de l'arthrose seront évalués par imagerie et par histologie 8 et 20 semaines après injection (6 animaux par groupe, 4 conditions et 2 temps de suivi soit $6 \times 4 \times 2 = 48$ lapins au total).

La règle des 3R est appliquée afin de :

- Remplacer: il n'existe pas d'autres méthodes permettant d'éviter ou remplacer l'utilisation des animaux pour l'approche thérapeutique abordée dans ce projet ;

- Réduire : sur la base des données bibliographiques et les tests statistiques prévus, un nombre minimum d'animaux sera inclus sans pour autant entraver l'objectivité scientifique du projet ($n = 6$ par groupe),

- Raffiner : les manipulations se dérouleront dans le strict respect du bien-être des animaux. L'hébergement est assuré dans des cages individuelles conformément à la réglementation en vigueur. Le modèle chirurgical est maîtrisé et réalisé par des chirurgiens qualifiés. Des traitements analgésiques adaptés seront mis en place et ajustés au niveau de douleur identifiée individuellement sur chaque lapin. Toute maladie concomitante apparaissant pendant l'étude fera l'objet de soins et traitements adaptés. L'échec aux traitements conventionnels et l'impact de la maladie sur les résultats de l'étude seront évalués comme point limite. Les animaux ont accès librement aux granulés spéciaux pour lapins et à l'eau de boisson (ad libitum). L'enrichissement du milieu se fait par des jouets et des blocs de foin compacté et une tablette surélevée permettant aux lapins de se placer au-dessus ou en dessous.

- Les animaux seront surveillés quotidiennement. Les points limites ont été définis a priori : infection du site opératoire résistant à l'antiseptie locale et à l'antibiothérapie, douleur ne rétrocedant pas au traitement analgésique de secours, maladie respiratoire ne rétrocedant pas à un traitement antibiotique (Souffrance durable «dommages irrémediables »).

17845 Le parasite *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) infecte tous les animaux à sang chaud, incluant l'homme et la souris, et est responsable de la toxoplasmose. Chez l'Homme, la toxoplasmose est une maladie opportuniste qui peut se manifester par une encéphalite chez les sujets immunodéprimés ou des malformations chez le fœtus en cas de transmission materno-fœtale.

Après ingestion d'aliments souillés par des parasites (sous forme de kystes), la prolifération du parasite au cours de l'infection aigue est normalement asymptomatique ; elle peut éventuellement causer un syndrome grippal et causer des malformations foetales. La dissémination vers le cerveau et la conversion en une phase 'dormante' (kystes) correspond à l'établissement de la phase chronique, potentiellement responsable de l'encéphalite toxoplasmique (ET). Dans les 2 phases, les réponses immunitaires sont primordiales mais elles ne suffisent pas à éliminer le parasite de l'organisme et celui-ci peut persister dans le cerveau. A ce jour, il n'existe pas de vaccin commercialisé contre *T. gondii* chez l'homme. Les seules stratégies à la disposition du personnel médical reposent sur le diagnostic et le suivi des patients immunodéprimés et des femmes

enceintes, conduisant le cas échéant en une prise en charge thérapeutique par un traitement médicamenteux et éventuellement une interruption médicale de grossesse.

Dans le cycle de vie du parasite, la souris est un hôte intermédiaire naturel, chez qui la physiopathologie de la toxoplasmose aiguë et chronique est très similaire à celle de l'Homme. Pour ces 2 raisons, la souris constitue le meilleur modèle d'étude pour ce projet.

A l'aide de divers modèles de souris plus ou moins susceptibles au développement de l'inflammation du système nerveux central, nos travaux visent à mieux comprendre les interactions de *T. gondii* avec le système immunitaire, en particulier les lymphocytes T CD8. Nos expériences sont nécessaires pour mettre à jour de nouvelles stratégies thérapeutiques efficaces contre ce parasite très répandu mais aussi plus généralement dans le cadre d'infection avec des pathogènes intracellulaires (virus, bactéries).

Pour optimiser l'utilisation et la protection des animaux au cours de l'expérimentation dans notre laboratoire, nous répondons à la règle des 3R dans ses différents aspects :

Pour l'ensemble du projet, il est prévu d'utiliser 4098 animaux sur une période de 5 ans.

La règle des 3R sera appliquée dans le cadre de ce projet :

1-Remplacement : le recours à l'expérimentation animale dans le cadre de cette étude se fait après de nombreuses études *in vitro* dans des modèles cellulaires. Le principe de remplacement n'est pas applicable à ce projet car les études *in vitro* ne reproduiraient pas l'ensemble des voies impliquées dans des modèles physiologiques intégrés et par conséquent ne permettent pas l'obtention de résultats scientifiques exploitables et pertinents de la pathologie humaine.

2-Réduction : les expériences sont organisées de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux. Nous avons également pu valider certaines approches expérimentales *in vitro* permettant d'optimiser l'utilisation des animaux. Les résultats actuels ont permis de valider que des lots de 5 souris selon les paramètres à évaluer permettent d'acquies des données fiables.

3-Raffinement : Le bien-être de l'animal est un facteur de variabilité expérimentale. Nous prenons ceci en compte grâce au suivi rapproché quotidien des animaux qui évaluera leur état général (prise de nourriture, toilettage, mouvements), l'aide à l'alimentation en cas de besoin, l'enrichissement de leur environnement et le respect de l'aspect social du groupe (pas d'isolement ni de changement de cage). L'expérimentation sera arrêtée en cas de dégradation trop importante de la santé d'un animal selon les points limites d'arrêt de la procédure définis en accord avec le comité local de suivi du bien-être animal (SBEA) pour limiter la douleur, la souffrance ou l'angoisse de l'animal.

Les signes cliniques attendus de la procédure (sévère) sont :

- En phase aiguë (J7-15) : perte de poids et mobilité réduite. Les animaux seront euthanasiés si la perte de poids dépasse 20% du poids initial et la mobilité est fortement réduite pendant >24h. Il sera nécessaire de respecter un délai de 24h car le développement d'une réponse immunitaire permet dans bon nombre de cas une amélioration de l'état général et la transition vers la phase chronique moins symptomatique.

- En phase chronique (>J15) : ataxie / syndrome vestibulaire. Les animaux seront euthanasiés en cas de présence de l'un de ces signes.

Si immédiatement après ou le lendemain d'un gavage ou d'une injection ip ou iv, un animal cesse de s'alimenter et devient prostré, il sera euthanasié.

La procédure ne prévoit pas l'utilisation d'analgésiques ou anti-inflammatoires, car ils risquent d'interférer avec les processus inflammatoires au cours de notre expérimentation.

17846 L'asthme allergique est une inflammation chronique des voies respiratoires caractérisée par une difficulté respiratoire et une production excessive de mucus liée à l'inhalation d'allergènes. Une personne sur 4 souffre d'asthme dont 80% sont d'origine allergique. Les allergènes de l'environnement sont plus fréquemment en cause que les allergènes alimentaires. En France, l'asthme toutes causes confondues, touche environ 6% de la population et est à l'origine de 1000 décès par an.

Le but de ce projet est de tester l'efficacité de candidats médicaments et de vérifier son innocuité dans le modèle de l'asthme allergique chez la souris induit par les acariens (HDM: House Dust Mite), OVA (ovalbumine), papaïne (protéase à cystéine fragilisant la barrière épithéliale) et les pollens (BP :Birch Pollen) dans le cadre d'une monothérapie ou d'une combinaison thérapeutique. Il existe actuellement des traitements permettant uniquement de réduire l'intensité de l'inflammation induite par la présence d'un allergène dans l'organisme, cependant ces traitements possèdent d'importants effets secondaires comme l'augmentation du risque d'infection, l'hypertension artérielle et le développement du diabète. Il est donc nécessaire de continuer de tester des candidats médicaments. Dans ces modèles d'inflammation pulmonaire, les animaux vont développer une maladie respiratoire mimant les symptômes similaires à ceux observés chez les patients asthmatiques. Dans les modèles expérimentaux chez l'animal, l'asthme allergique se caractérise par un afflux de cellules inflammatoires dans les poumons, principalement des éosinophiles et lymphocytes et dans les cas sévères, des neutrophiles (cellules de la famille des globules blanc). Ce projet s'inscrit dans la continuité d'un projet qui a déjà fait l'objet d'une évaluation pour le modèle d'asthme induit par HDM, OVA, papaïne et BP.

Les souris vont recevoir à des temps précis des allergènes respiratoires et vont développer une insuffisance respiratoire spécifique (hyperréactivité bronchique) de la pathologie, liée à un afflux de cellules dans les tissus pulmonaires et une production excessive de mucus. L'analyse de l'hyperréactivité bronchique (résistance et compliance) sera réalisée sur des animaux profondément anesthésiés juste avant la mise à mort des animaux, puis différents paramètres inflammatoires, immunologiques et histologiques dans les poumons seront étudiés post-mortem. La durée des expérimentations va dépendre de l'allergène administré. L'étude va durer 17 jours s'il s'agit de l'allergène HDM, 25 jours pour les allergènes OVA ou BP et 1 pour l'allergène papaïne, dont les protocoles sont détaillés dans la procédure du projet.

Le but du projet correspond à la phase préclinique dans le développement de médicaments à visée thérapeutique. Cette étape permettra l'étude de l'action de composés pharmacologiques in vivo chez le rongeur. Les molécules testées pourront être administrées en préventif (1h à 15 jours avant induction de la maladie) ou en curatif (1h à 14jours après induction de la maladie) par voie orale, intranasale, intratrachéale, intrapéritonéale, sous-cutanée ou intraveineuse.

Selon notre expertise, l'asthme allergique provoqué par HDM, OVA, BP ou papaïne n'engendre pas douleur visible chez l'animal.

L'animal utilisé est la souris C57BL/6 ou BALB/c. L'administration des allergènes à l'animal se fait par voie sous-cutanée ou intrapéritonéale sans anesthésie ou intranasale ou intratrachéale sous anesthésie gazeuse à l'isoflurane (2.5 à 3%) pour minimiser les situations douloureuses et stressantes. Le choix de la voie d'administration va dépendre de ce que l'on veut obtenir, une intranasale permettra une analyse des voies hautes de l'organisme (cas des rhinites allergiques), une intratrachéale permettra de toucher les voies bronchiques et alvéolaires (cas de l'asthme allergique) et une sous-cutanée et une intrapéritonéale permettront de mimer un asthme allergique suite à une réaction provoquée par un allergène aéroporté qui touche d'abord la peau (eczéma et autres chez l'enfant) et qui pourrait plus tard induire l'asthme allergique. De plus chaque voie d'administration va permettre de cibler l'étude sur certaines voies d'activation (les cellules de Langerhans pour une sous-cutanée et les macrophages pour une intrapéritonéale par exemple).

Une surveillance quotidienne des animaux est effectuée pendant la période d'acclimatation et d'expérimentation. Les animaux seront hébergés par 5 maximum dans des cages de 530 cm² à fond plein sur portoir ventilé (selon les normes d'hébergement de l'annexe II de l'arrêté relatif à l'agrément des EU). Les animaux seront mis à mort selon la réglementation en vigueur.

Le projet représente un ensemble d'études types. Le nombre d'études réalisées durant la période de validité de l'autorisation va dépendre des résultats obtenus et du nombre de molécules à tester. Le projet pourra comporter jusqu'à 25 études comprenant 90 animaux, soit 2250 animaux maximum sur 5 ans.

A ce jour, l'animal de laboratoire reste le seul recours fiable et pertinent permettant d'étudier l'efficacité et vérifier l'innocuité de candidat médicament. Ce projet sera réalisé en respectant les principes fondamentaux de l'expérimentation animale :

Remplacement : le modèle animal est fondamental dans notre cas, puisque l'étude de l'efficacité de candidats médicaments ne peut se faire que sur un organisme vivant entier.

Raffinement : les animaux sont observés quotidiennement pour respecter leur bien-être et éviter au maximum la douleur et le stress au moment de l'expérimentation. Des points limites adaptés sont mis en place et appliqués pour limiter la souffrance de l'animal comme l'utilisation d'anesthésique pour mesurer l'hyperactivité bronchique.

Réduction : le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement pertinents et reproductibles, évitant ainsi de refaire plusieurs fois les mêmes expérimentations.

17847 La broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO), aussi appelée « bronchite du fumeur », est une maladie respiratoire chronique, le plus souvent liée au tabagisme. En France, la BPCO concerne 4 millions de personnes et elle est la 3^{ème} cause de mortalité au niveau mondial. Cette maladie se caractérise notamment par une fibrose bronchique et péri-bronchique, associée à un déclin irréversible de la fonction respiratoire. L'évolution chronique de la BPCO est aggravée par des épisodes d'exacerbations, qui participent au remodelage bronchique. Les mécanismes du remodelage sont mal compris et ce processus n'est pas ciblé par les thérapeutiques actuelles. Nous nous intéressons à CXCR4 et CXCL12, des molécules impliquées dans l'attraction des cellules inflammatoires vers les tissus cibles. Le but de notre projet est d'évaluer le rôle de l'axe CXCR4-CXCL12 dans le remodelage des voies aériennes dans un modèle de souris BPCO soumis à des exacerbations. Nous cherchons à comprendre le mécanisme à l'origine du recrutement dans le poumon de cellules inflammatoires, et notamment des cellules particulières appelées « fibrocytes », et le rôle de ces cellules dans le remodelage des tissus. Nous espérons que la réalisation de ce projet permettra d'offrir de nouvelles perspectives thérapeutiques pour le traitement de la BPCO. Pour ce faire, 432 souris seront utilisées sur fond génétique sauvage (procédures n°1 et 2). De plus, afin de déterminer plus précisément le rôle de l'axe CXCR4-CXCL12, 672 souris transgéniques seront utilisées (procédures n°3 et 4). La caractérisation de la susceptibilité à la fibrillation atriale sera décrite dans la procédure n°5. Afin de respecter la règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer), les mesures mises en place sont les suivantes :

1) Réduire : se souciant de réduire le nombre des animaux en expérimentation, nous avons calculé le nombre de souris minimal par groupe pour obtenir des résultats significatifs, et nous réaliserons de multiples études *ex vivo* sur différents organes et selon différentes techniques.

2) Raffiner : pour diminuer la souffrance et l'anxiété des animaux, des dispositifs sont prévus (anesthésie pour les intubations et les prélèvements, analgésie locale pour les prélèvements, raffinement des conditions d'hébergement, vérification par le comité sur le bien-être des animaux) et nous avons soigneusement décrit des points limites en relation avec notre protocole (critères de perte de poids, comportement anormal ou difficulté respiratoire).

3) Remplacer : il n'existe pas de modèle *in vitro* actuellement permettant d'étudier la pathophysiologie de la BPCO, maladie complexe touchant plusieurs composants (tels que le muscle lisse bronchique, l'épithélium et les cellules inflammatoires) et mettant en jeu plusieurs organes (moelle osseuse, compartiment vasculaire et poumon). Grâce à un modèle de souris BPCO, nous pouvons envisager une meilleure compréhension des phénomènes.

17848 L'obésité et le diabète de type 2 représentent un enjeu majeur pour la santé publique des pays industrialisés comme celle des pays dits en voie de développement.

Parmi ceux-ci, les complications hépatiques dites non alcooliques (Non Alcoholic Steato-Hepatitis, NASH) font l'objet d'investigations importantes du fait de l'absence de thérapies efficaces pour les traiter. Cette pathologie prédispose également au développement de l'hépatocarcinome (ou HCC).

Des modèles précliniques prédictifs de la NASH sont indispensables au développement de nouvelles thérapies, mais il devient aussi indispensable de développer en parallèle des modèles de HCC pour envisager de nouvelles pistes thérapeutiques pour cette pathologie, en lien avec la NASH. De tels modèles doivent aussi permettre de tester si des thérapies anti-NASH peuvent prévenir l'HCC. Avec cet objectif, ce projet compte utiliser 1000 souris afin de pouvoir tester différentes molécules thérapeutiques et avoir une approche plus réaliste de l'impact de ces molécules sur la santé humaine. Durant toutes les procédures d'expérimentations animales (induction de la maladie + traitements), le principe des 3R est appliqué :

- Réduire : le nombre minimal de souris nécessaire à l'obtention d'un résultat statistiquement significatif sera utilisé. Sur la base des publications scientifiques, un écart-type d'environ 25% a été estimé pour la plupart des expériences réalisées. Lorsque plusieurs groupes de traitement sont étudiés, il sera utilisé un test statistique de type ANOVA Dunnett à 1 ou 2 voies avec post-test Bonferroni. Avec un nombre final d'animaux égal à 10 par groupe de traitement, une différence de +/- 30% est théoriquement détectable avec une probabilité de 80% à $p < 0,05$. De plus, la standardisation des conditions d'hébergement (enrichissement, nombre d'animaux par cage notamment) permet de diminuer la variabilité sur nos résultats.

- Remplacement : différents modèles in vitro, telles que des lignées cellulaires disponibles visent à réduire l'appel à l'animal à chaque nouveau test. La sélection des différentes molécules peut être réalisée préalablement in vitro. Cependant, il est nécessaire dans ce contexte d'avoir l'intégralité des interactions in vivo.

- Raffinement : les procédures décrites dans ce projet sont choisies et réalisées de manière éthique afin de réduire ou supprimer la douleur des animaux. Tous les animaux sont hébergés dans des cages aux dimensions adaptées à la quantité d'animaux hébergés, ainsi qu'à la présence d'enrichissement en accord avec la législation européenne. Les personnes responsables du traitement et du suivi des animaux sont formées et habilitées afin d'éviter le stress. Les animaux sont suivis quotidiennement et pesés à minima une fois par semaine afin d'identifier au plus tôt un état clinique anormal. Les problématiques relevées lors des observations cliniques des animaux sont répertoriées (tels que perte de poids, défaut de toilettage, agressivité, immobilité, etc.) et revues systématiquement par les membres de la structure chargée de bien-être des animaux (SBEA). Le vétérinaire est consulté pour la mise en place des actions correctives et améliorations. Lorsqu'il s'avère nécessaire, une procédure en relation avec l'état clinique (détaillée plus bas) est mise en œuvre afin de diminuer la souffrance des animaux. Si l'allègement de la souffrance n'est pas observé, l'animal sera sacrifié en utilisant des procédures appropriées selon la réglementation européenne.

17849 Chaque année, plus de 4 500 nouveaux cas de cancers de l'ovaire sont diagnostiqués en France. La chirurgie est le traitement de première intention du cancer de l'ovaire, hormis pour certaines formes évoluées. Lorsque la maladie est très avancée, la chimiothérapie est généralement combinée à la chirurgie. Avec plus de 3 000 décès par an, le cancer de l'ovaire est la 4ème cause de décès par cancer en France chez la femme. En raison notamment du diagnostic souvent tardif, le pronostic reste sombre avec un taux de survie globale à 5 ans de 43% et à 10 ans de 31% (INCA 2015). C'est pourquoi, des stratégies thérapeutiques doivent donc être développées pour améliorer le résultat clinique. Pour ce type d'étude, puisqu'il est impossible d'obtenir des conclusions fiables in vitro nous ne pouvons actuellement nous passer des expérimentations conduites sur des animaux pouvant simuler les principales propriétés biologiques des cancers de l'ovaire avancés humains.

Ces données justifient le besoin urgent d'augmenter le répertoire actuel de l'option thérapeutique, notamment dans les cas de cancers ovariens métastatique. Dans ce contexte, notre plateforme propose à ses partenaires de réaliser des tests précliniques chez la souris afin d'évaluer l'efficacité de leurs composés thérapeutiques innovants les plus prometteurs. Pour cela, les modèles que nous utilisons sont basés sur la transplantation de cellules tumorales humaines à des souris immunodéficientes à même de « mimer » la maladie observée en clinique et de prédire la réponse

thérapeutique. Il n'existe à l'heure actuelle, aucune autre méthode satisfaisante qui pourrait se substituer à l'expérimentation animale durant cette étape préclinique.

Ces essais précliniques seront réalisés à l'aide de modèles de xénogreffes de lignées cellulaires ou de tumeur primaires chez la souris que nous avons précédemment développés à partir de tumeurs de patientes atteintes de cancer de l'ovaire. Les animaux seront hébergés dans des salles dont les paramètres d'ambiance sont contrôlés (température : 20-22°C ; renouvellement d'air : 15 volumes/heure ; éclairage artificiel : 12h jour/12h nuit). Afin de respecter leur instinct grégaire, les souris seront stabulées par petits groupes de 3 à 5 dans des cages dont l'environnement est enrichi à l'aide de copeaux de bois compactés et/ou de coton. Les animaux feront l'objet d'une surveillance quotidienne par du personnel compétent afin de détecter précocement les points limites de souffrance. Les dispositions prises pour l'application de la règle des 3R seront les suivantes :

- Remplacer : notre projet se fera dans la continuité d'une étude in vitro. Le passage au modèle in vivo est une étape indispensable avant d'envisager un essai thérapeutique chez les patientes.

- Réduire : A l'aide d'un calcul d'effectif, le nombre d'animaux a été limité au minimum nécessaire pour permettre de fournir des résultats statistiquement significatifs.

- Raffiner : Afin d'améliorer le bien-être animal au cours de notre étude, les besoins physiologiques des animaux seront respectés (nourriture ad libitum, cages propres, enrichissement, stabulation en groupe). Le suivi du développement tumoral se fera par des mesures cinétiques utilisant des procédés non invasifs : la mesure du volume tumoral à l'aide d'un pied à coulisse et/ou l'imagerie par bioluminescence. L'ensemble des procédures de transplantation et d'imagerie seront réalisées sous anesthésie associée afin d'éviter toute douleur. L'apparition de signes d'inconfort ou d'éventuelle souffrance nous conduira à choisir l'action appropriée à mener en fonction d'une grille de score du bien-être.

Pour ce projet, qui s'inscrit dans la recherche de nouvelles formes thérapeutiques dans le traitement des cancers gynécologiques (cancer du col, de l'endomètre et de l'ovaire), nous avons estimé pouvoir gérer au maximum 5 études de ce type par an pendant 5 ans, le nombre maximal d'animaux utilisés au cours de cette période sera donc de 2775 souris.

17850 Les maladies de surcharge lysosomale (MSL) constituent un groupe hétérogène d'environ 70 maladies caractérisées par un dysfonctionnement du lysosome. Ces maladies sont individuellement rares mais touchent globalement plus d'un cas pour 4000 naissances. La maladie de Sanfilippo (MPSIIIB), une maladie des MSL, est caractérisée par une accumulation des Oligosaccharides d'Héparane Sulfate (HSO) dans les tissus y compris dans le système nerveux central (SNC). Cette accumulation progressive induit une série de conséquences pathologiques incluant une neurodégénérescence, une neuro-inflammation et un stress oxydant. La neuro-inflammation et le stress oxydant très précoces sont en grande partie à l'origine des premiers symptômes de la pathologie.

Il a été montré, dans des modèles murins de MPSIII, que l'utilisation d'anti-inflammatoires tels que l'aspirine ou la prednisolone permettait de réduire la neuro-inflammation, améliorer les symptômes et entraîner une normalisation de certains marqueurs de la neuropathologie. Les limites de l'utilisation de ce type de molécules sont en grande partie dues à des doses d'efficacité excessives et à un mauvais passage de la barrière hématoencéphalique (BHE). Par conséquent, il est important de développer de nouvelles approches thérapeutiques anti-inflammatoires.

De ce fait, notre objectif est d'étudier l'efficacité thérapeutique d'une macromolécule de synthèse ciblant spécifiquement la microglie sur laquelle elle est en capacité de reprogrammer un phénotype anti-inflammatoire. Nous proposons dans ce projet de tester l'activité anti-inflammatoire et antioxydante de cette macromolécule sur le modèle murin MPSIIIB. Afin d'optimiser la macromolécule spécifique, il convient d'évaluer sa dose optimale d'utilisation, sa fréquence d'administration et l'âge. Le modèle MPSIIIB-/- est un modèle knock-out mimant bien la pathologie humaine, bien référencé dans la littérature. De nombreux laboratoires l'ont utilisé pour étudier la physiopathologie de ce syndrome ainsi que certaines options thérapeutiques. C'est pourquoi le recours à l'utilisation de souris est indispensable à notre étude. Pour l'ensemble du projet il est

prévu d'utiliser au maximum 440 animaux en deux phases sur 5 ans. Une première phase de détermination Dose/fréquence de la molécule soit 80 souris et une phase d'évaluation thérapeutique de 360 souris et tout ceci en appliquant la règle des 3R et selon la directive européenne 2010/63/UE comme suit :

Remplacement : Les animaux sont utilisés après des analyses réalisées *in vitro* afin de confirmer des résultats démontrés et des hypothèses formulées à partir des travaux réalisés sur cellules. A ce stade de l'expérimentation, l'utilisation de l'animal est inévitable. Actuellement aucun modèle *in vitro* ne permet de mimer le phénomène étudié dans son ensemble et dans sa complexité. Les études sont systématiquement optimisées (doses molécules, durée) d'après la littérature ou les observations réalisées au laboratoire. De plus, les traitements sont administrés de la façon la moins invasive possible (par priorité : alimentation ou boisson/injection IP/ injection IV).

Réduction : L'utilisation de l'animal est réduite au maximum et les effectifs des cohortes sont limités par l'outil statistique. Dans cette optique, nous utiliserons des groupes de 10 souris par expérience et nous répéterons les expériences 3 fois afin de rendre nos résultats exploitables. Pour chaque expérience, le maximum d'échantillons autorisés réglementairement seront prélevés sur l'animal afin d'éviter d'avoir à reproduire l'expérience par manque de tissus. Chaque fois que cela sera possible, nous analyserons un maximum de paramètres cellulaires et moléculaires sur les mêmes individus afin de limiter le nombre d'expériences *in vivo*.

Raffinement : Le bien-être des animaux sera suivi tout au long de nos expériences et fera l'objet de procédures strictes. Les souris seront toujours hébergées en groupes dans des cages avec une surface réglementaire, avec un libre accès à l'eau et la nourriture. Un suivi des animaux a été mis en place en accord avec le comité de suivi du bien-être animal de notre établissement pour limiter la douleur, la souffrance ou l'angoisse de l'animal. Les animaux sont hébergés dans des conditions définies par la directive européenne 2010/63/UE et auront à disposition des igloos, des bâtons à ronger et cotons pour la nidification. Les animaux sont suivis quotidiennement, permettant la détection précoce d'anomalies éventuelles. Un animal sera euthanasié s'il présente une prostration continue, une déshydratation ou une perte de poids supérieure à 20%. Des périodes d'acclimations à l'hébergement comme à la manipulation permettront de limiter l'angoisse des animaux. La douleur liée à l'expérimentation sera limitée par l'utilisation systématique d'analgésiques. En outre, les responsables du projet ont été formés à l'utilisation des animaux à des fins scientifiques et garantissent de la formation et l'encadrement des autres expérimentateurs impliqués dans les procédures expérimentales.

17851 La myéline est un élément essentiel de la conduction nerveuse et sa destruction aboutit à long terme à des troubles neurologiques graves chez les patients atteints de la sclérose en plaques (SEP). Une des caractéristiques intéressantes de la SEP est que parallèlement au développement de la maladie un processus de réparation endogène, nommé la remyélinisation, s'enclenche. Alors que l'inflammation est l'une des causes principales de la perte de myéline, la présence des cellules immunitaires et la production de molécules chimio-attractantes est un élément indispensable à la mise en place de la remyélinisation. Nous proposons d'associer plusieurs domaines de recherche : la génétique, l'immunologie et la neurobiologie pour établir de quelle manière le processus immunitaire peut favoriser la remyélinisation endogène. Cette approche innovante et pluridisciplinaire vise à identifier de nouvelles cibles potentielles permettant de moduler l'inflammation de manière à favoriser la réparation ; ouvrant ainsi la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Nous utiliserons des souris Nude car, de par leur système immunitaire déficient, on ne risque pas de rejet de greffe de cellules humaines.

Lors de l'élaboration du protocole expérimental, afin de réduire le nombre d'animaux à utiliser, nous avons choisi un modèle de remyélinisation murin dont la chronologie du processus de réparation est bien définie. Ainsi nous avons pu réduire à 2 temps après la lésion, le temps de sacrifice pour évaluer l'effet des lymphocytes sur la réparation. De plus, nous avons évalué par tests statistiques

le nombre minimum d'animaux à greffer pour chaque patient et pour les témoins (20 souris par cas avec 5 souris pour l'étude immunohistochimique et 5 pour la microscopie électronique).

Nous utiliserons donc 1000 souris pour cette étude se répartissant sur 5 sous-groupes de patients au profil génétique différent et un groupe de donneurs sains.

La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée sur le terrain : 1) remplacement : les études in vitro et sur animaux invertébrés ne permettent pas l'étude de processus biologiques complexes comme la réparation des lésions de la myéline. Le rongeur est donc l'une des espèces les plus appropriées pour ce type d'étude. 2) réduction : le nombre d'animaux utilisés est réduit au strict minimum nécessaire afin de générer des données statistiques significatives; 3) raffinement : les procédures prennent en compte des temps de récupération et des nombres d'essais visant à réduire le stress et la fatigue des animaux. Afin de réduire la douleur, un analgésique sera injecté juste avant et 6 heures et 24 heures après chaque chirurgie. L'observation des souris se fera pendant 4 jours après la dernière opération pour surveiller si des signes de douleurs ou de stress apparaissent.

17852 La population actuelle est de plus en plus confrontée à des phénomènes traumatiques pouvant entraîner un trouble de stress post-traumatique (TSPT). Des structures cérébrales telles que l'hippocampe et l'amygdale jouent un rôle clef dans la mise en place de la mémoire émotionnelle (ME) dans le TSPT. Chez le rongeur, nous pouvons étudier la ME grâce à un conditionnement aversif associatif de type Pavlovien. Dans ce conditionnement de peur, un stimulus conditionnel (un son ou une lumière) est associé à un stimulus inconditionné généralement sous forme de choc électrique. La région basolatérale de l'amygdale constitue le site de convergence des afférences sensorielles traitant les stimuli conditionnés et inconditionnés. Elle est le siège de phénomènes de plasticité synaptique permettant l'acquisition de l'apprentissage de la peur conditionnée. Certains neurones de l'amygdale peuvent utiliser plusieurs neurotransmetteurs pour communiquer (glutamate, acétylcholine, GABA...) compliquant la compréhension des réseaux. Ainsi la transmission glutamatergique est très particulière au sein de l'amygdale et lorsqu'elle est perturbée, pourrait entraîner des modifications de la mise en place et de la maintenance des mémoires émotionnelles conduisant à l'émergence de mémoires traumatiques. De plus, la mise en place de ces mémoires dépend fortement de la qualité du sommeil. Des recherches actuelles tendent à montrer qu'une perturbation du sommeil paradoxal suivant ces événements traumatiques pourrait soutenir les problèmes de consolidation de ces mémoires.

Le but de notre recherche est de comprendre comment cette dérégulation de la transmission glutamatergique au sein de l'amygdale peut aboutir à la mise en place de mémoires traumatiques, ce qui nous permettra par la suite de pallier ce déficit et rétablir des mémoires émotionnelles non pathologiques.

Au total, 600 souris adultes seront utilisées dans ce projet.

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

17853 Le bon fonctionnement du cerveau repose sur l'interaction des différentes cellules du cerveau. Peu de choses sont connues sur les processus physiologiques qui sous-tendent ces interactions. L'objectif de cette proposition de recherche est de mieux comprendre la communication entre les cellules nerveuses, les neurones, et les oligodendrocytes, un type de cellules gliales. Les oligodendrocytes sont des cellules gliales que l'on ne trouve que chez les vertébrés et qui forment

des extensions cellulaires qui forment la gaine de myéline autour des axones. Par conséquent, le cerveau des vertébrés pourrait devenir plus complexe, avec des comportements complexes et des interactions sociales et des temps de réaction rapides. Récemment, des données indiquent que l'activité électrique des neurones est impliquée dans la formation de la myéline, mais la nature des signaux sous-jacents est mal comprise. Notre objectif est d'étudier plusieurs signaux de communication qui ont été identifiés dans des études antérieures et qui jouent un rôle dans le développement et le maintien des interactions entre neurones et oligodendrocytes.

Nous mettrons en œuvre des approches expérimentales pour sonder la physiologie des cellules gliales par des expériences d'imagerie. À l'aide de sondes optiques, les voies cellulaires peuvent être étudiées en mesurant les changements d'intensité lumineuse. Nous allons manipuler génétiquement les cellules du cerveau pour produire ces sondes optiques, puis surveiller l'intensité lumineuse des sondes ex vivo. La manipulation génétique sera effectuée à l'aide d'un virus qui sera appliqué localement au cerveau lors d'une chirurgie stéréotaxique peu invasive ou par l'élevage de souris génétiquement modifiées créées précédemment. Avec ces expériences, nous voulons faire progresser notre compréhension fondamentale de la signalisation entre les neurones et les oligodendrocytes. Nos connaissances nouvellement créées peuvent ensuite être appliquées pour comprendre les altérations de la physiologie des oligodendrocytes dans les maladies démyélinisantes. À cette fin, nous mettrons en œuvre un modèle représentant la perte globale d'oligodendrocytes et de myéline. Nous donnerons de la cuprizone pendant environ 5 semaines par le biais du régime alimentaire, ce qui entraînera à terme une perte d'oligodendrocytes. L'interaction étroite entre les neurones et les oligodendrocytes est spécifique aux vertébrés et ne peut être reproduite dans un modèle in vitro. Pour la durée de ce projet de 5 ans, nous utiliserons un total de 1590 souris (320 par an approximativement) pour répondre à nos questions de recherche.

Nous avons mis en place des stratégies pour respecter les 3R afin de minimiser le nombre et l'inconfort des animaux et suivre la directive européenne 2010/63/EU sur l'utilisation des animaux pour les expériences.

REMPACER: Comprendre comment les oligodendrocytes et les neurones interagissent et comment la fonction des oligodendrocytes affecte la physiologie des neurones est un processus cellulaire morphologique complexe il n'existe à ce jour aucun système in vitro capable de reproduire l'organisation cellulaire entre des oligodendrocytes et des neurones, et il ne nous est pas possible de remplacer les études sur l'animal entier par des méthodes in vitro.

RAFFINEMENT: L'utilisation de différentes souris génétiquement modifiées nous permettra d'identifier plus facilement les oligodendrocytes ou les neurones dans notre cadre expérimental et nous permettra de limiter la manipulation génétique aux oligodendrocytes ou aux neurones est un raffinement de notre approche. L'utilisation des meilleurs protocoles disponibles pendant l'intervention chirurgicale, y compris des anesthésiques appropriés, des conditions chirurgicales aseptiques et des soins postopératoires avec analgésiques et suivis pendant les autres expériences propose de limiter la souffrance des animaux.

RÉDUIRE: Notre perfectionnement expérimental nous permettra d'aborder les questions expérimentales avec les meilleures expériences possibles et d'utiliser le même animal pour différentes analyses expérimentales (par exemple, électrophysiologie et histologie). Pour chacune de ces expériences, le nombre d'animaux sera réduit à son minimum tout en permettant néanmoins des tests statistiques robustes et pour avoir le nombre de contrôles internes suffisant et la production de souris sera optimisée par la mise en place de programmes d'élevage répondant au plus près à la demande, qui est actualisée tous les 3 mois.

17854 Notre laboratoire s'intéresse à la production de foie gras tout en respectant le bien-être animal.

L'objectif de ce projet est d'aboutir à un engraissement du foie, sans passer par l'étape de gavage, actuellement incontournable.

Depuis 2009 différents essais ont été réalisés chez l'oie afin de stimuler l'appétit des animaux et ainsi, reproduire la surconsommation observée à l'état naturel durant la période pré-migratoire leur permettant de constituer les réserves énergétiques nécessaires aux longs vols. Ces travaux ont

permis de montrer que la distribution de maïs sec à volonté pendant 12 semaines, après une phase de restriction alimentaire (mais assurant les besoins alimentaires) associée à une réduction de la durée du jour, permettait l'expression d'un comportement « hyperphagique » transitoire chez l'oie, associé à un engraissement spontané (mais très variable) du foie.

D'autre part, nous avons récemment montré chez les canards qu'une augmentation de la température d'incubation des œufs (donc au cours du développement embryonnaire) permettait d'augmenter l'engraissement du foie induit par gavage.

Notre objectif est maintenant de combiner une hausse de température pendant le développement embryonnaire et l'engraissement spontané chez les oies, afin de produire un engraissement naturel du foie chez cette espèce en supprimant l'étape de gavage, afin de préserver le bien-être des animaux. Nous espérons également réduire la variabilité de réponse.

Pour cela, nous testerons 3 conditions différentes d'incubation des œufs, puis les trois groupes seront élevés de manière à provoquer un engraissement spontané par une surconsommation volontaire de maïs. Cette surconsommation sera obtenue après une période de rationnement de 8 semaines (mais permettant de couvrir les besoins, passant progressivement de 300g/j/animal à 180g/jour/animal) suivie d'une période de « relâchement » avec un accès à volonté aux mangeoires mettant à disposition du maïs en grain durant 10 à 12 semaines au total.

L'effectif maximal sera de 630 oies mâles et femelles pour permettre des mesures de poids de foie à la fin du rationnement et après 10 et 12 semaines de relâchement ainsi que des études moléculaires à la naissance afin de mettre en évidence un impact à court terme du changement de température.

Trois objectifs sont visés au cours de cette expérimentation :

- 1) Mesurer l'impact d'une modification de température pendant le développement sur le métabolisme de l'oie.
- 2) Evaluer la possibilité de réduire le temps de « relâchement » à 10 semaines dans un protocole d'engraissement spontané
- 3) Evaluer l'existence d'un effet sexe (de la programmation thermique et de l'engraissement spontané)

Réduction : le nombre d'animaux prélevés aux différents stades des deux expériences est réduit à son minimum pour espérer avoir des conclusions significatives. Les deux sexes sont conservés.

Remplacement : Compte tenu de l'objectif zootechnique, les animaux ne peuvent pas être remplacés par des modèles in vitro.

Raffinement : Les oies feront l'objet d'une surveillance quotidienne. Toute manifestation de troubles comportementaux persistants entraînera le retrait de l'animal de l'expérimentation. Des chainettes seront mises à disposition dans les salles d'élevage afin de stimuler un comportement de jeu et diminuer les comportements agressifs entre les individus (piquage, arrachage de plume...).

Les animaux pesant moins de 2Kg seront d'abord élevés dans des loges offrant une surface de 0,4m² par animal (l'arrêté du 01/02/13 fixant à 0,33m² la surface minimale), et auront accès à une terrasse extérieure couverte de 6m² par loge. Lorsque les animaux dépasseront les 2Kg, les loges contiendront un maximum de 35 animaux, assurant une surface de 0. 51m² par animal (l'arrêté du 01/02/13 fixant à 0. 50m² la surface minimale).

17855 Le sepsis est une affection médicale sérieuse caractérisée par des réponses inflammatoires systémiques dérégulées en réponse à une infection, conduisant à un dysfonctionnement d'organes, concomitantes d'une phase d'immunodépression responsable d'une susceptibilité accrue au développement d'infections secondaires. Malgré une prise en charge précoce des patients (antibiotiques à large spectre, réanimation hémodynamique, etc.), le sepsis reste associé à un taux de mortalité important dans les unités de soins intensifs (20-40% des patients septiques 28 jours après le sepsis et 50-70% dans les mois suivants) essentiellement dû à l'incapacité du système immunitaire du patient immunodéprimé à répondre contre de nouvelles infections. Rétablir l'homéostasie du système immunitaire du patient septique représente donc un enjeu capital.

Le modèle animal est actuellement le seul modèle permettant d'étudier le système immunitaire et reproduisant la complexité de la dynamique du sepsis qui englobe à la fois des mécanismes hémodynamiques, biochimiques et immunologiques.

Différents modèles animaux ont été décrits pour étudier ce syndrome dont la dynamique reste encore complexe. Un modèle murin est particulièrement décrit pour reproduire le plus fidèlement possible les mécanismes biologiques observés chez l'Homme, décrits ci-dessus. Il s'agit du modèle CLP (Caecal Ligation and Puncture), basé sur la ligature et la perforation du cæcum sans obstruer l'intestin des animaux. Ce modèle combine la nécrose tissulaire et le sepsis polymicrobien mimant fidèlement les ruptures d'appendice et les diverticulites perforées rencontrées chez l'Homme. De plus, il s'agit du seul modèle dans lequel coexistent les deux phases clés du sepsis : la phase inflammatoire et la phase d'immunodépression.

De précédents travaux ont montré que le modèle murin CLP induisait des paramètres caractéristiques de l'immunodépression du système immunitaire adaptatif et inné tels que ceux observés chez le patient septique. Les cellules de la réponse immunitaire innée et adaptative ont des rôles différents, mais complémentaires, dans l'instauration de la réponse immunitaire. En effet, à la suite d'une infection, la réponse innée représente la première ligne de défense de l'organisme et précède donc la réponse adaptative. Restaurer le système immunitaire inné chez l'animal ou le patient septique représente donc un intérêt médical majeur.

L'objectif de cette étude est d'évaluer la capacité de produits thérapeutiques à restaurer la réponse immunitaire innée de l'animal immunodéprimé suite à un épisode septique.

Cette étude s'inscrit dans un projet de recherche global visant à développer de nouveaux traitements de l'immunodépression induite par le sepsis ciblant à la fois les cellules de la réponse immunitaire innée et adaptative. Ceci permettrait aux patients de restaurer leur système immunitaire et ainsi prévenir les infections secondaires pouvant leur être fatales.

Règle des 3R: Pour atteindre les objectifs de ce projet, il n'existe pas de méthode alternative reproduisant l'immunodépression à la suite d'un sepsis n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptible d'apporter le même niveau d'information. Le nombre d'animaux utilisés a été calculé comme étant nécessaire et suffisant pour pouvoir analyser statistiquement les résultats en tenant compte des études précédentes. Des groupes de souris contrôles serviront de contrôle de chirurgie et le système immunitaire des souris septiques sera comparé à celui de ces souris contrôles non-septiques.

Un suivi d'éléments physiologiques et comportementaux des animaux aura lieu deux fois par jour et tout au long de la procédure afin d'évaluer le bien-être animal et d'intervenir de manière rapide et appropriée en cas de nécessité. Des points limites adaptés au modèle CLP ont été définis et affinés grâce aux études précédentes (ex : température corporelle). Les analgésiques appropriés seront utilisés tout au long de la procédure. La température à l'intérieur des cages sera réchauffée grâce à une armoire chauffante ou des matelas chauffants jusqu'à 3 jours après chirurgie. Des aliments secs, humidifiés et de l'eau gélifiée seront déposés à différents endroits de la cage pour faciliter l'alimentation des souris.

Le nombre de souris nécessaires pour ces expériences est évalué à 432 maximum. Cependant, dès qu'une expérience permettra d'obtenir les résultats escomptés, le projet prendra fin, afin de ne pas utiliser l'intégralité des animaux.

17856 Le sepsis est une affection médicale sérieuse caractérisée par des réponses inflammatoires systémiques dérégulées en réponse à une infection, conduisant à un dysfonctionnement d'organes, concomitantes d'une phase d'immunodépression responsable d'une susceptibilité accrue au développement d'infections secondaires. Malgré une prise en charge précoce des patients (antibiotiques à large spectre, réanimation hémodynamique, etc.), le sepsis reste associé à un taux de mortalité important dans les unités de soins intensifs (20-40% des patients septiques 28 jours après le sepsis et 50-70% dans les mois suivants) essentiellement dû à l'incapacité du système immunitaire du patient immunodéprimé à répondre contre de nouvelles infections. Rétablir l'homéostasie du système immunitaire du patient septique représente donc un enjeu capital.

Le modèle animal est actuellement le seul modèle permettant d'étudier le système immunitaire et reproduisant la complexité de la dynamique du sepsis qui englobe à la fois des mécanismes hémodynamiques, biochimiques et immunologiques.

Différents modèles animaux ont été décrits pour étudier ce syndrome dont la dynamique reste encore complexe. Un modèle murin est particulièrement décrit pour reproduire le plus fidèlement possible les mécanismes biologiques observés chez l'Homme, décrits ci-dessus. Il s'agit du modèle CLP (Caecal Ligation and Puncture), basé sur la ligature et la perforation du cæcum sans obstruer l'intestin des animaux. Ce modèle combine la nécrose tissulaire et le sepsis polymicrobien mimant fidèlement les ruptures d'appendice et les diverticulites perforées rencontrées chez l'Homme. De plus, il s'agit du seul modèle dans lequel coexistent les deux phases clés du sepsis : la phase inflammatoire et la phase d'immunodépression.

De précédents travaux ont montré que le modèle murin CLP induisait des paramètres caractéristiques de l'immunodépression du système immunitaire adaptatif et inné tels que ceux observés chez le patient septique. Les cellules de la réponse immunitaire innée et adaptative ont des rôles différents, mais complémentaires, dans l'instauration de la réponse immunitaire. En effet, à la suite d'une infection, la réponse innée représente la première ligne de défense de l'organisme et précède donc la réponse adaptative. Restaurer le système immunitaire inné et adaptatif représente donc un intérêt médical majeur chez le patient septique immunodéprimé.

L'objectif de cette étude est d'évaluer la capacité de produits thérapeutiques à restaurer la réponse immunitaire innée et adaptative de l'animal immunodéprimé à la suite d'un épisode septique.

Cette étude s'inscrit dans un projet de recherche global visant à développer de nouveaux traitements de l'immunodépression induite par le sepsis ciblant à la fois les cellules de la réponse immunitaire innée et adaptative. Ceci permettrait aux patients de restaurer leur système immunitaire et ainsi prévenir les infections secondaires pouvant leur être fatales.

Règle des 3R: Pour atteindre les objectifs de ce projet, il n'existe pas de méthode alternative reproduisant l'immunodépression à la suite d'un sepsis n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptible d'apporter le même niveau d'information. Le nombre d'animaux utilisés a été calculé comme étant nécessaire et suffisant pour pouvoir analyser statistiquement les résultats en tenant compte des études précédentes. Des groupes de souris témoins serviront de contrôle de chirurgie et le système immunitaire des souris septiques sera comparé à celui de ces souris contrôles non-septiques et à des souris septiques traitées par les candidats.

Un suivi d'éléments physiologiques et comportementaux des animaux aura lieu deux fois par jour jusqu'au 7^e jour puis une fois par jour jusqu'à la fin de la procédure afin d'évaluer le bien-être animal et d'intervenir de manière rapide et appropriée en cas de nécessité. Des points limites adaptés au modèle CLP ont été définis et affinés grâce aux études précédentes (ex : température corporelle). Les analgésiques appropriés seront utilisés tout au long de la procédure. L'intérieur des cages sera réchauffé grâce à une armoire chauffante ou à l'aide de matelas chauffants placés en dessous des cages jusqu'au moins 3 jours après chirurgie. Des aliments secs, humidifiés et de l'eau gélifiée seront déposés à différents endroits de la cage pour faciliter l'alimentation des souris.

Le nombre de souris nécessaires pour ces expériences est évalué à 435 maximum. Cependant, dès qu'une expérience permettra d'obtenir les résultats escomptés dans chacune des procédures, le projet prendra fin, afin de ne pas utiliser l'intégralité des animaux.

17857 L'hépatite est une maladie du foie, qui lorsqu'elle devient chronique favorise le développement de la cirrhose et du cancer du foie. Il est donc important de travailler pour comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires de cette maladie pour envisager de nouveaux traitements. L'équipe travaille sur ce problème et en particulier sur la régulation et le rôle de cytokines qui sont des molécules de dialogue importantes entre les cellules et le système de défense de l'organisme. Nous avons obtenu des résultats sur plusieurs cytokines à partir de l'étude d'échantillons humains dans un premier temps et au moyen de plusieurs modèles expérimentaux d'hépatite murine dans un 2^e temps. Ces résultats indiquent

- un rôle protecteur de la cytokine nommée IL-33 dans le développement et le contrôle de l'hépatite

- un rôle de la molécule intracellulaire nommée RIPK1 dans la sensibilité des hépatocytes à la mort dans différents types d'hépatite impliquant le facteur de mort cellulaire dénommé TNF.

Pour améliorer notre connaissance des mécanismes moléculaires impliqués dans la mort des hépatocytes qui donne l'hépatite et comprendre comment différentes cytokines peuvent être protectrices, il faut mener des études in vitro au moyen de cultures primaires d'hépatocytes murins. Ces cellules nous permettront d'étudier (i) les facteurs d'induction de la mort cellulaire des hépatocytes, (ii) les mécanismes moléculaires survenant lors de la mort de ces cellules, (iii) les voies moléculaires contrôlant la balance survie/mort des hépatocytes (iv) des molécules chimiques pouvant présenter un intérêt thérapeutique par une action protectrice de la mort des hépatocytes. L'intérêt d'exploiter des cultures primaires d'hépatocytes murins est notoire car nous disposons des animaux déficients pour différents gènes d'intérêt pour notre recherche, tels que la cytokine nommée IL-33, son récepteur ou des gènes clés impliqués dans la balance mort cellulaire/survie. Ceci renforce la nécessité de développer nos études sur le modèle souris plutôt que d'autres espèces ou même humain.

Dans ce but nous envisageons d'avoir recours à 200 animaux. L'ensemble de la procédure sera réalisé dans l'esprit des 3R. Tout d'abord, il s'agit ici d'une procédure d'étude du foie remplaçant le traitement des animaux par l'étude en culture du comportement des hépatocytes, sachant que les lignées stables de cellules hépatocytaires existantes sont des cellules immortelles et donc inutilisables pour l'objet de notre étude ce qui affecte la mort/survie des hépatocytes. L'obtention d'un grand nombre d'hépatocytes à partir d'un animal permet un grand nombre de test et réduit le nombre d'animaux qui seraient requis pour de tels expérimentation in vivo, et le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est réduit à la mise en place des expériences absolument requises en prenant soin de programmer/regrouper les tests de façon à utiliser la totalité des cellules produites. En terme de raffinement, la procédure a été travaillée pour limiter le stress des animaux (traitement dans un salle dédiée et contention par un chercheur expérimenté), et pour empêcher la douleur par l'administration de sédatif et d'antidouleur et qu'il n'y aura pas de réveil.

17858 Les petits ruminants (brebis et chèvres) jouent un rôle majeur dans les sociétés rurales des pays méditerranéens avec des impacts sur l'économie, l'environnement, et sur le maintien des populations rurales. Les systèmes d'élevage de petits ruminants sont généralement très bien adaptés aux conditions locales mais sont mis à l'épreuve aujourd'hui par le changement climatique. Le projet proposé ici, qui est focalisé sur les chèvres, fait partie d'un projet international qui a pour but de mettre en place des outils d'aide à la décision pour les éleveurs afin de leur permettre d'adapter leur système d'élevage aux nouvelles conditions. Pour construire de tels outils nous avons besoin de mieux comprendre la capacité d'adaptation des chèvres et les facteurs favorisant cette adaptation.

Nous utiliserons des tests avec changements de l'alimentation pour quantifier la capacité d'adaptation des chèvres. Ces tests consistent à remplacer l'aliment normal par de la paille pendant deux jours, ce qui représente une perturbation de courte durée pour un ruminant, espèce qui est adaptée à des aléas d'alimentation au pâturage. Ces tests seront réalisés sur des animaux adultes en lactation qui seront suivis avant, pendant, et après chaque test (17 jours de mesure au total par test) avec des mesures de comportement, d'ingestion, de performance et de métabolisme via des échantillons de lait (non-invasif), des prises de sang et l'utilisation de capteurs non-invasifs comme des accéléromètres pour enregistrer les mouvements des chèvres.

La capacité d'adaptation des animaux est un caractère complexe qui intègre de multiples mécanismes physiologiques. De fait, il n'existe pas de méthode pour l'évaluer sans avoir recours aux animaux. Pour mieux comprendre cette capacité d'adaptation, et ensuite pouvoir la prédire, nous proposons d'évaluer la variabilité de cette capacité d'adaptation, entre chèvres adultes ayant différents profils de croissance. Ainsi les chèvres seront issues d'accouplements utilisant des boucs identifiés comme produisant soit des filles avec une durée de vie plus longue que la moyenne, soit des filles avec une durée de vie plus courte que la moyenne observée dans la population en élevage sur le terrain. Pour comprendre l'effet des aléas climatiques pendant la croissance de ces animaux, chaque groupe génétique sera alimenté à volonté pendant la croissance avec, soit une ration

légèrement supplémentée par rapport aux recommandations, soit la même ration non supplémentée. Ces quatre groupes de chèvres seront suivis depuis leur naissance jusqu'à leur deuxième lactation. Ces chèvres seront hébergées en groupes dans des parcs conformes à la réglementation. A part les périodes de tests où les chèvres seront hébergées sur caillebotis, les chèvres seront logées sur paille.

Pour avoir suffisamment d'animaux en deuxième lactation, permettant d'effectuer les tests statistiques nécessaires au projet tout en respectant la règle des 3Rs (20 chèvres par combinaison de groupe génétique et alimentation en croissance), il est nécessaire de prendre en compte une diminution du nombre d'animaux initial avec le temps liée au fait que la réussite à chaque mise à la reproduction n'est pas de 100%. Ainsi, les quatre groupes de chèvres seront constitués initialement à partir de 75 chevrettes par an au sevrage, soit 300 animaux au total sur quatre périodes de mises bas. Afin de respecter la règle de raffinement des 3R, l'état général des animaux sera contrôlé plusieurs fois par jour et il sera en particulier vérifié que tous les animaux s'alimentent correctement. Nous avons mis au point un dispositif expérimental performant de mesure d'ingestion sur caillebotis où le confort des animaux a été particulièrement pris en compte car c'est un aspect crucial pour la fiabilité des données de capacité d'adaptation. Tous les animaux retourneront dans l'élevage à la fin des procédures.

17859 Le calcium est un messager cellulaire d'une grande importance et qui est impliqué dans de nombreux processus physiologiques. Notre travail concerne les mécanismes de régulation du calcium et leur importance en hémostase et dans la relation entre les vaisseaux sanguins et les cellules du sang.

Nous avons observé que l'absence d'une protéine participant au stockage du calcium se traduisait par une diminution des effets distincts participants à la réaction inflammatoire et semblent indiquer que la régulation de cette protéine puisse diminuer la réaction inflammatoire ce qui pourrait avoir un bénéfice en santé humaine. En particulier, nous avons observé que l'activation des cellules endothéliales qui tapissent la paroi des vaisseaux sanguins dans des modèle d'inflammation semblait moins importante en l'absence de cette protéines. Cela se traduisait par une diminution du nombre de globule blancs qui entrent en contact avec les cellules endothéliales et une réduction de leur adhésion. De plus nous avons pu observer que ceci n'était pas lié à l'activité de plaquettes sanguines. Cependant, comme cette protéine est aussi exprimée dans les cellules endothéliales et dans les globules blancs, nous ne savons pas si cette réduction d'activation de la réponse inflammatoire est liée à l'absence de la protéine dans les cellules endothéliales, dans les globules blanc ou dans les deux types cellulaires. Pour déterminer l'importance de l'expression de notre protéine dans chaque types cellulaires dans la réponse inflammatoire, nous proposons de réaliser des expériences de transfert de moëlle afin d'obtenir des animaux ayant des cellules circulantes (plaquettes sanguine et globules blancs) sauvages circulant dans des vaisseaux tapissés par des cellules endothéliales n'exprimant pas la protéines d'intérêt et de faire l'expérience contraire.

Dans cet objectif, nous avons obtenu auprès de la société Jackson des souris dont toutes les cellules (sauf les globules rouges et les poils) expriment la protéine fluorescente verte. Ainsi en transférant la moëlle de ces animaux dans des souris sauvages ou déficiente pour notre protéine d'intérêt préalablement traitée par chimiothérapie pour éliminer les cellules souches de la moëlle, la présence de cellules circulante exprimant la protéine fluorescente verte permettra de garantir la qualité du transfert de moëlle et nous pourrons distinguer les cellules provenant dans souris donneuses de celles provenant des souris receveuses. Les animaux ainsi produits seront alors utiliser dans un modèle d'inflammation que nous avons précédemment réalisé.

Afin de répondre à la règle des 3 Rs,

1) remplacement: Le recours à des animaux est nécessaire pour ce projet car l'existence d'animaux déficients pour la protéine SERCA3 permet d'évaluer le rôle de cette protéine dans la réponse inflammatoire et la fonction endothéliale, in vivo. De plus, l'utilisation de modèle in vitro est problématique car plusieurs études ont montré que l'expression des protéines SERCA3 dans les cellules endothéliales disparaissait rapidement après deux passages en culture cellulaire. La caractérisation du rôle de SERCA3 ne peut donc se faire avec des lignées cellulaires (il serait très

difficile d'exprimer l'ensemble des différentes SERCA3 de façon à maintenir l'équilibre observé dans les cellules primaires). Il sera donc nécessaire d'utiliser des cellules endothéliales primaires aux premiers passages pour réaliser nos expériences in vitro.

2) Réduire : le nombre d'animaux nécessaire à l'ensemble de l'étude a été défini pour chaque procédure de façon à avoir une réponse statistiquement analysable tout en limitant l'importance par la réalisation de plusieurs procédures en parallèle quand cela est possible.

3) Raffiner : les animaux sont élevés dans un hébergement agréé, respectant au maximum le bien-être des animaux avec un enrichissement du milieu (morceaux de bois à ronger, filaments de papier kraft pour la nidification), la souffrance sera limitée par le respect des méthodes anesthésiques et analgésique. L'ensemble des expériences seront effectuées par une personne habilitée à expérimenter sur animaux.

Le nombre total de souris prévu est de 100.

17860 Le domaine d'expertise de notre unité de service est centré sur la caractérisation et l'étude fonctionnelle des populations du système immunitaire murin en conditions normales et inflammatoires. En tant que prestataire de services, nous réalisons ces études pour des laboratoires partenaires publics ou privés.

L'objectif principal du protocole décrit dans cette demande est l'évaluation de la réponse immunitaire en réponse à l'induction d'une inflammation temporaire dans le péritoine de souris contrôles et d'animaux génétiquement modifiés.

Ce projet est mis en œuvre dans le cadre général de la validation de modèles animaux génétiquement modifiés pour des études précliniques in vivo. Il vise donc à évaluer de façon qualitative et quantitative la capacité d'un modèle murin à répondre à une inflammation.

A chaque lignée caractérisée pour ce projet, nous aurons trois lots de souris pour chacun des génotypes testés : contrôle (CTRL) ou génétiquement modifié (MUT). Les trois lots seront définis comme suit :

- Lot « Non Inflammé D0 » : 5 souris CTRL et 5 souris MUT non injectées
- Lot « Inflammé D+1 » : 5 souris CTRL et 5 souris MUT analysées 24H après inflammation
- Lot « Inflammé D+4 » : 5 souris CTRL et 5 souris MUT analysées 96H (4 jours) après inflammation.

Les inflammations seront réalisées de façon rétrograde (à D-4 et D-1) pour une analyse simultanée des souris inflammées et non inflammées le même jour, correspondant au « D0 ».

Pour ce type de projet, nous avons travaillé sur tous les paramètres de l'analyse pour standardiser notre étude et définir de manière précise le nombre minimal d'animaux nécessaires à l'obtention de résultats statistiquement significatifs. Nous prévoyons pour ce projet 5 lignées à caractériser par an et 30 animaux par expérience. Nous utiliserons donc un maximum de 750 animaux pour ce protocole pour les 5 années que couvre notre demande.

L'injection de composés inflammatoires dans le péritoine de souris induit un phénotype modéré chez la souris. Tout au long de la procédure expérimentale, nous mettrons en place et respecterons la règle des 3Rs.

Concernant le principe de « Remplacement », dans ce modèle il n'est pas envisageable d'utiliser une méthode alternative et/ou substitutive. En effet, nous devons nous placer à l'échelle de l'organisme entier pour caractériser l'état inflammatoire des animaux.

Concernant le principe de « Réduction », les méthodes de standardisation développées au sein de notre laboratoire nous permettent de réduire le nombre d'animaux tout en ayant des résultats statistiquement significatifs. Cette standardisation est caractérisée par l'utilisation d'automates et d'instruments de mesure calibrés ainsi que d'outils d'analyse automatisés limitant les variations liées aux manipulateurs. En se basant sur ces procédures standardisées, le bio-informaticien de notre service a ainsi déterminé un calcul de puissance nous permettant de définir le minimum de souris nécessaires pour caractériser les différentes populations d'intérêt pour chaque mutation étudiée et chacune des conditions testées.

Enfin, pour ce qui est du principe de « Raffinement », les souris seront hébergées par groupe de 5 au maximum, l'aliment et l'eau seront distribués ad libitum et les cages seront systématiquement enrichies par l'ajout de deux éléments :

- une maison en carton ou « Safe Hut » pour leur procurer un abri,
- un bâtonnet de papier ou « Enrichment Diamond Twists », que les souris pourront grignoter afin de se confectionner un nid.

Un temps d'adaptation d'une semaine sera également respecté entre la réception des animaux et le début du protocole expérimental. Les souris seront observées quotidiennement par le personnel de zootechnie formé et qualifié et des points limites seront préalablement établis.

17861 La maladie à coronavirus 2019 (Covid-19) est une maladie infectieuse émergente, provoquée par la contraction du coronavirus SARS-CoV-2, apparue à Wuhan le 17 novembre 2019 (Chine centrale), avant de se propager dans le monde. La maladie se caractérise par une série de symptômes bénins dans la plupart des cas mais peut mener à une détresse respiratoire aiguë dans les cas sévères conduisant aux décès des personnes.

L'Organisation Mondiale de la Santé indique qu'il n'y a pas de traitement spécifique disponible contre la maladie. Les recherches se sont intensifiées afin de trouver un vaccin et un traitement antiviral efficace pour lutter contre les nouvelles vagues à venir. En effet, de nombreux essais cliniques ont été enregistrés dans les différents sites de registre d'essais cliniques internationaux et nationaux. Cependant, l'émergence de nouveaux vaccins conduisant à des effets secondaires non négligeables ainsi que l'absence de recul sur la durée de leur efficacité poussent à une réflexion plus aboutie sur la recherche de traitements antiviraux alternatifs. Ces potentiels traitements devront être testés dans un modèle animal validé. La souris n'exprimant pas naturellement la cible moléculaire du virus (ACE2), elle doit être génétiquement modifiée mais son accès est encore difficile et son système immunitaire reste très différent de l'Homme. D'autres espèces montrent une susceptibilité naturelle au virus comme le hamster, mais leur système immunitaire et pulmonaire différent de l'Homme ne les rend pas toujours appropriées.

Depuis le début de l'épidémie, de nombreux travaux d'équipes scientifique à travers le monde, y compris la nôtre, ont pu confirmer le consensus : les différents modèles d'infection à SARS-CoV-2 chez les singes de l'ancien monde (Macaque cynomolgus, Macaque rhesus et Singe grivet) sont sensiblement égaux à différents niveaux (réplication virale, tableau clinique modéré). Les avantages proposés par ces modèles singes sont la proximité de leur système immunitaire et la similarité de leur physiologie et anatomie respiratoire avec celui de l'Homme, l'homologie de leur protéine ACE2, et la disponibilité des outils d'investigation biologiques tirés de la clinique humaine (anticorps pour cytométrie ou analyses de cytokines).

Dans le présent projet, le singe sera utilisé pour tester un traitement (thérapeutique ou prophylactique) suite à une infection par le virus SARS-CoV-2 (administré par voie intranasale et intratrachéale). Ces thérapies pourront être administrée par voix classique (injection sous-cutanée, intra-musculaire par exemple) ou plus spécifique: soit par nébulisation sous anesthésie avec un dispositif à flux d'air (projection d'une suspension à l'état de fines gouttelettes permettant un meilleur ciblage des zones anatomiques concernées en délivrant une plus grande quantité de médicament et favorisant l'action locale du médicament tout en réduisant les effets secondaires systémiques), soit par pulvérisation intranasale et/ou intratrachéale sous anesthésie également. Ces deux méthodes ont été validées et perfectionnées par nos équipes dans le cadre d'études précédentes, dans un contexte infectieux ou non.

Un groupe d'animaux sera suivis entre une et quatre semaines selon le protocole et le nombre de groupes expérimentaux préalablement définis. Les animaux bénéficieront d'une période d'acclimatation à leur environnement durant laquelle des prétests seront effectués afin d'obtenir des données basales (statut clinique des animaux, statut biochimique et hématologique) et un enregistreur autonome de température sera implantés pour suivre de manière plus précise et continu la température corporelle. En effet, lors d'un précédent projet, des pics de température post-infection ont été observés la nuit, en dehors des heures de manipulation des animaux. Le traitement

anti-SARS-CoV-2 sera testé de manière prophylactique ou thérapeutique, c'est-à-dire que les animaux recevront le traitement durant les jours précédant ou suivant l'infection. La fréquence du traitement sera préalablement discutée et définie. Suite à l'infection, l'évolution sera surveillée quotidiennement par écouvillonnage des voies aériennes supérieures (cavité nasale et gorge). En effet, basé sur une précédente expérience lors du développement d'un modèle d'infection, il a été montré que les variations de la charge virale étaient fluctuantes d'un jour à l'autre et nécessitait une collection d'échantillons rapprochée). Des lavages bronchoalvéolaires à raison de trois fois par semaine maximum (afin de réduire les anesthésies) seront effectués ainsi que des analyses sanguines. Tous ces prélèvements permettront de suivre la charge virale au cours du temps, l'état clinique des animaux suite à l'administration du traitement ainsi que le dosage de la molécule administrée. Les animaux seront mis à mort en fin d'étude afin d'identifier de possibles lésions histologiques des poumons et de doser la quantité de virus dans divers organes.

Remplacement : Pour valider l'efficacité de nouvelles thérapies, il est nécessaire d'avoir dans un modèle proche de l'Homme, en plus de modèles *in vitro*. Les modèles animaux sont essentiels pour comprendre la pathogenèse des virus et pour évaluer des nouvelles thérapies. Les modèles de singes, sont considérés comme des modèles de référence pour le développement de thérapies anti-infectieuses : proximité physiologique et immunitaire avec l'homme et d'anatomie des voies respiratoires (posture verticale par opposition aux modèles rongeurs ou porcins) permettant de tester fidèlement l'efficacité des thérapies anti-infectieuses.

Raffinement : Les animaux seront suivis quotidiennement afin de détecter tout signe clinique anormal (douleur, détresse ou stress) : pesée plus fréquente (3 fois par semaine), suivi de la température quotidienne au thermomètre pour suivre en direct l'évolution. Des mesures préventives et correctives sont également définies en fonction de l'apparition de signe de stress ou de douleur. Des points limites sont définis pour sortir l'animal de l'étude si des effets attendus ou inattendus apparaissent. Dans ce cas, le vétérinaire sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés. Les manipulations des animaux seront réalisées exclusivement par du personnel formé et compétent. De plus, les animaux seront hébergés par groupes sociaux et par sexe, et bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la structure du bien-être animal, notamment la mise à disposition et le renouvellement hebdomadaire de jouets dans les hébergements (kong, ballon, tube PVC...), ainsi que la distribution de friandises. De même, le personnel veillera à garder une interaction quotidienne avec chaque animal afin de diminuer le stress qui pourrait être engendré par les manipulations.

Réduction : Il est prévu d'utiliser 60 singes (mâles et/ou femelles) par an, soit 300 animaux sur 5 ans. Au vu de l'ampleur de l'épidémie et les demandes conséquentes de tests de thérapies antivirales contre le SARS-CoV-2, ce nombre semble nécessaire pour pouvoir y répondre. Ce nombre a été réduit au minimum et pourra être réduit selon les différentes sollicitations de la part des laboratoires de recherche pour tester de nouvelles pistes thérapeutiques. Les animaux utilisés proviendront d'un élevage agréé et l'ensemble du projet sera mené en accord avec la réglementation européenne et nationale.

17862 La polykystose rénale autosomique dominante (PKRAD) est une maladie génétique affectant une personne sur 500. Cette affection est responsable de 10% des cas « d'insuffisance rénale terminale » qui nécessitent le recours à la dialyse ou à la transplantation rénale, deux procédures lourdes et coûteuses. La PKRAD est caractérisée par le développement progressif de multiples kystes dans les reins entraînant la destruction progressive du tissu rénal. Actuellement aucun traitement ne permet de bloquer la formation des kystes. Il s'agit d'un mécanisme complexe faisant intervenir différents types cellulaires ainsi qu'un remodelage de l'architecture rénale qui ne peut être reproduit *in vitro*. Il est donc nécessaire d'avoir recours à des modèles animaux principalement murins car la souris est le seul animal pour lequel nous disposons actuellement de modèle de PKRAD impliquant les mêmes gènes que la pathologie humaine.

On ne connaît pas actuellement les mécanismes à l'origine de la formation des kystes mais on sait que le cil primaire est indispensable à ce processus.

Le cil est une extension microscopique de la cellule. Il peut être mobile (ou motile) tel le flagelle du spermatozoïde ou immobile, on l'appelle alors cil primaire. Dans le rein, le cil primaire, situé à la surface des cellules rénales capte des signaux mécaniques et chimiques induits par le flux urinaire et les transmet à la cellule. L'ablation du cil primaire permet de prévenir la formation des kystes rénaux chez les souris présentant une polykystose rénale, cependant les mécanismes contrôlés par le cil à l'origine de la formation des kystes ne sont pas connus.

La formation des kystes est un processus habituellement très progressif mais il a été montré récemment, que l'interruption du flux urinaire induit par une obstruction de l'arbre urinaire entraînait le développement de kystes rénaux en moins de 4 jours dans un modèle murin.

La rapidité de développement des kystes observée dans ce modèle permet pour la première fois d'envisager l'étude des mécanismes initiant leur formation.

L'étude proposée ici a pour but de comprendre les processus de la formation des kystes afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques susceptibles d'empêcher le développement de la maladie chez les patients.

Le nombre maximum d'animaux utilisés pour cette recherche est de 406 souris sur 3 ans.

L'ensemble de ce projet fera appel à 3 procédures : l'induction d'une polykystose rénale dans des souris génétiquement modifiées pour identifier le rôle du cil primaire dans la kystogénèse ; une obstruction urinaire et une observation par méthode d'imagerie, dite « intra-vitale », permettant de visualiser directement les modifications de l'architecture du rein.

Pour réduire le nombre d'animaux, nous avons estimé la taille des échantillons permettant une analyse statistique efficace. Afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux souris, la chirurgie et l'imagerie intravitale seront réalisées sous anesthésie générale, surveillée régulièrement afin de garantir une sédation optimale, et des antalgiques sont prévus en post-opératoire. Des études antérieures ont permis de montrer que, sur la période étudiée (moins de 4 jours) les souris ne présentaient pas de perte de poids ni de signes suggérant une souffrance. Des points-limites ont par ailleurs été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire. L'analyse des mécanismes à l'origine des modifications de comportement des cellules rénales observées au cours de cette étude se fera à l'aide de modèles *in vitro* afin de limiter le recours à l'expérimentation animale.

En permettant de mieux comprendre le lien existant entre cil primaire et formation des kystes, ce projet devrait déboucher sur de nouvelles approches thérapeutiques dédiées aux patients atteints de polykystose rénale.

17863 Chaque année, en France, près d'un millier d'enfants naissent avec une surdité dont 75% sont d'origine génétique. Plus globalement, les troubles de l'oreille interne (équilibre, acouphènes, presbycusie) affecte une large portion de la population. Ceci a bien évidemment de graves conséquences sur l'apprentissage du langage, le développement cognitif et l'adaptation sociale. Si grâce à la recherche, des avancées spectaculaires ont été réalisées dans la compréhension des mécanismes et des facteurs génétiques responsables des troubles auditifs, les bases moléculaires de nombreuses surdités n'ont pas encore été identifiées, ainsi que certains syndromes associés. L'identification de ces gènes permettrait de réaliser des diagnostics moléculaires et de donner un conseil génétique aux familles concernées.

C'est le cas d'une mutation génétique retrouvée dans des familles dont les individus présentent de graves malformations cérébrales qui s'accompagnent d'une perte auditive, mais dont on ne connaît pas les bases moléculaires, cellulaires ou fonctionnelles de la pathologie qui semble syndromique. Pour étudier la dégénérescence auditive liée à cette mutation génétique, l'étude chez l'animal est indispensable.

Dans ce projet, nous souhaitons élever des souris génétiquement modifiées afin de caractériser leur déficit auditif, d'un point de vue structurel et fonctionnel. Ces animaux seront mis en reproduction et maintenus sur 5 ans.

Règle des 3R.

Remplacer : Ce projet s'intègre dans un projet plus global combinant différents travaux de recherche complémentaires allant de l'étude biochimique ou bio moléculaire au comportement. Beaucoup d'études in-vitro ou ex-vivo sont donc effectuées en amont de l'utilisation de lignées d'animaux pour limiter au maximum leur utilisation.

Raffiner : Pour supprimer l'angoisse ou la détresse des animaux au cours de la procédure, les animaux sont élevés en cage collective enrichie. Une inspection systématique et quotidienne du phénotype des premiers nouveaux nés homozygotes sera mise en place pour détecter tout phénotype dommageable : poche de lait bien remplie, développement moteur normal, croissance normale est réalisé par le zootechnicien. Toute anomalie sera répertoriée dans un fichier via l'outil informatique de gestion des lignées par le zootechnicien qui en informe directement l'expérimentateur. Des critères d'arrêt de procédure suffisamment précoces ont été mis en place pour anticiper toute douleur des animaux.

Réduire : Pour limiter au maximum le nombre d'animaux, un minimum de 3 trio de souris (1 males et 2 femelles par cage) seront utilisés pour produire la génération de souris désirée. Nous avons estimé le nombre total d'animaux nécessaire à la création, l'extention et le maintien sur 5 ans d'une seule lignée de souris transgénique est de 409 souris.

17864 L'accident vasculaire cérébral (AVC) constitue la première cause de handicap acquis chez l'adulte, la deuxième cause de démence et la troisième cause de mortalité : c'est donc un enjeu majeur de santé publique. Dans 85% des cas, l'AVC est d'origine ischémique, c'est-à-dire qu'il provient d'une occlusion artérielle aiguë. L'ischémie cérébrale s'associe à une réaction inflammatoire qui contribue aux dommages cérébraux de manière significative. Le suivi par imagerie in-vivo de cette réaction inflammatoire permettrait de mieux comprendre sa dynamique spatio-temporelle et d'évaluer de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à moduler cette réaction. Pour cela, nous proposons de développer une approche en imagerie in-vivo multimodale basée sur l'administration d'un agent de contraste qui cible spécifiquement la réaction inflammatoire chez le petit rongeur présentant un AVC ischémique. Les modalités d'imagerie seront les mêmes que celles qui peuvent être utilisées chez l'homme : imagerie par résonance magnétique (IRM), scanner X (tomodensitométrie TDM d'absorption, de contraste de phase ou de k-edge) et tomographie par émission de positons (TEP). L'objectif est de générer un signal spécifique dans les régions du cerveau présentant une forte réaction inflammatoire, ce qui ouvrirait la voie à un suivi non-invasif de l'inflammation dans l'ensemble du cerveau, à des fins de diagnostic et de suivi de traitement. Le but à plus long terme est de transférer ces méthodes chez l'Homme, pour une meilleure prise en charge des patients présentant un AVC.

L'avantage de l'imagerie in-vivo est qu'elle permet des études sur l'animal vivant plutôt que d'avoir à sacrifier les animaux à intervalles donnés pour faire la même observation. Chaque animal est son propre contrôle, ce qui permet d'augmenter la puissance statistique des résultats tout en limitant le nombre d'animaux (Réduction) une fois la technique d'imagerie validée. L'imagerie est réalisée sous anesthésie. L'introduction d'agents de contraste est un outil important car ils permettent de faire ressortir le phénomène cellulaire ou moléculaire d'intérêt (inflammatoire). Quand cela est possible, les agents de contraste sont d'abord testés dans un modèle d'ischémie cérébrale in-vitro (culture cellulaire de macrophages ou de cellules endothéliales cérébrales soumises à une privation temporaire en glucose et en oxygène) (Remplacement). En bref, les mesures suivantes visent à réduire le nombre d'animaux et à raffiner les protocoles :

- La taille des effectifs est calculée a priori, en fonction de l'effet attendu ;
- Les expérimentations sont réalisées en aveugle et en randomisant les produits administrés (agents de contraste et/ou agents thérapeutiques) comme dans les essais cliniques ;
- Les paramètres physiologiques appropriés (poids, température, capnie, respiration...) sont mesurés tout au long du protocole ;
- Pour les essais thérapeutiques, deux critères d'évaluations seront appréciés : la réponse neurofonctionnelle et la taille de la lésion. Les biomarqueurs d'imagerie sont inclus pour évaluer 1) si la cible thérapeutique est bien exprimée (diagnostic) et 2) si la cible thérapeutique est bien

modifiée par le traitement (suivi de traitement). Le développement de ces biomarqueurs d'imagerie constitue le cœur de ce projet de recherche.

L'objectif de ces développements de méthodologie d'imagerie in-vivo est triple :

- 1) Mieux comprendre la physiopathologie de l'AVC ;
- 2) Mieux évaluer de nouveaux traitements anti-inflammatoires au stade préclinique, afin de sélectionner les meilleurs candidats pour les essais cliniques ;
- 3) Pouvoir proposer, dans quelques années, des agents de contraste utilisables chez l'homme et dont l'imagerie sera un apport pour le diagnostic, la compréhension physiopathologique et l'évaluation thérapeutique de l'AVC.

Environ 48 rongeurs (rats et souris) pendant 3 ans seront utilisés dans ce projet.

17865 Le vieux paradigme de l'apprentissage en chirurgie « see one, do one, teach one » créé par W. Halsted en 1890 n'est plus d'application, pour des raisons évidentes de protection des patients. La formation est maintenant évaluée en termes de compétences, théoriques et pratiques, et non plus en termes d'années de formation. Par ailleurs, un praticien va être confronté au cours de sa carrière à un nombre significatif de modifications des procédures, techniques et technologies chirurgicales, qui nécessitent une nouvelle démarche d'acquisition et d'actualisation des compétences.

La chirurgie mini-invasive (CMI) guidée par l'image est un exemple parfait d'une é(ré)volution de la chirurgie qui a nécessité une refonte complète des méthodes d'acquisition des compétences pratiques.

En effet, réaliser une opération « à ventre ouvert » nécessite des compétences tout à fait différentes de celles nécessaires pour la même opération réalisée à « ventre fermé » ou au travers de toutes petites incisions, avec des instruments différents et sous contrôle visuel assuré par des images vidéos digitales (chirurgie guidée par l'image).

Les bénéfices pour le patient de cette nouvelle chirurgie ont été étudiés et confirmés de manière extensive dans pratiquement toutes les spécialités pratiquant la chirurgie sous une forme ou l'autre. L'acquisition des compétences pratiques doit intégrer toutes les contraintes liées à la chirurgie guidée par l'image, compétences manuelles, c'est à dire la capacité de manipuler correctement les nouveaux instruments et technologies, et compétences de procédure, c'est à dire la capacité à réaliser correctement les différentes étapes d'une opération chirurgicale définie, dans ce nouvel environnement.

Différentes méthodes d'acquisition de ces compétences ont été développées et validées. Elles sont basées sur la simulation, puisqu'il n'est pas envisageable de les utiliser sur le patient. La simulation est réelle lorsqu'elle utilise soit des boîtes d'entraînement dans lesquelles sont placées des objets ou des organes, soit des cadavres, des pièces anatomiques, ou des modèles vivants. La simulation est virtuelle lorsqu'elle utilise des simulateurs de tâches ou d'opérations générées par ordinateur. Ces méthodes sont sélectionnées en fonction des compétences qui doivent être acquises. Une boîte d'entraînement est parfaite pour apprendre à manipuler un instrument ou réaliser des tâches de base, mais ne permet pas une acquisition des compétences sur une procédure chirurgicale.

L'objectif de ce projet est de développer un programme d'acquisition, de développement et d'actualisation des compétences pratiques sur modèle vivant dans le cadre d'un programme institutionnel de formations, comprenant théorie et pratique, en chirurgie mini-invasive guidée par l'image

Ce programme nécessitera 8205 porcs sur une période de 5 ans pour former jusqu'à 6610 chirurgiens, dans le respect de la règle des 3R :

Remplacement :

Les formations en chirurgie mini-invasive guidée par l'image comprennent des sessions théoriques et des sessions pratiques qui incluent la présentation et la discussion interactive d'opérations retransmises en direct et de cas cliniques, et des entraînements pratiques sur des modèles dont la

nature diffère selon les objectifs éducatifs poursuivis et la complexité des gestes et techniques à enseigner.

Afin de remplacer l'utilisation d'animaux vivants, l'acquisition des compétences manuelles sont réalisées principalement sur des simulateurs de type boîtes ou mannequins d'entraînement dans lesquels sont déposés des objets ou des organes qui sont manipulés par les instruments spécifiques de chirurgie mini-invasive sous contrôle visuel par vidéo, et des simulateurs de réalité virtuelle. Cela permet de développer la gestuelle de base, la coordination yeux-mains et l'orientation spatiale. Les compétences de «procédure» pour certaines opérations sont acquises sur cadavre.

Mais ces modèles ont des limitations et pour les programmes d'enseignement les plus avancés, seul le modèle animal permet de reproduire l'environnement, les contraintes, les risques et les résultats des procédures chirurgicales avancées. Le porc est alors retenu du fait de ses caractéristiques physiologiques et anatomiques très proches de l'être humain.

Réduction:

L'utilisation des simulateurs alternatifs permet l'acquisition des compétences manuelles de base et de réduire au maximum la simulation sur modèles vivants.

1 animal permet en moyenne de former 1 à 2 stagiaires à plusieurs procédures chirurgicales.

Chaque cours peut accueillir entre 34 et 40 stagiaires, à raison d'une trentaine de formation par an, toutes spécialités confondues. Nous estimons à 1641 le nombre de porcs nécessaires par année. Sont inclus dans cet effectif un petit nombre d'animaux qui seront utilisés pour valider de nouvelles procédures et adapter la formation à l'évolution de l'état de l'art médical et des technologies.

Tous les moyens sont en effet mis en œuvre pour réduire le nombre d'animaux, à savoir recherche et développement de modèles alternatifs, réalisations de plusieurs procédures par animal sur un même temps opératoire, mutualisation des sujets entre stagiaires, collecte d'organes pour modélisation et formation ex vivo.

Raffinement :

Avant les sessions pratiques réalisées dans un environnement chirurgical strict, les animaux sont hébergés en groupe social dans un environnement contrôlé en température et hygrométrie, avec lumière progressive et musique. Ils reçoivent une alimentation adaptée à leurs besoins, de l'eau à volonté, des jouets et dispositifs qui favorisent leurs comportements naturels comme l'exploration, le fouissage et le mâchouillage (balles, objets type Kong, aliments dispersés au sol. . .).

Toutes les interventions sont réalisées sous anesthésie générale profonde avec traitement de la douleur. Des points limites ont été établis pour ne pas engendrer de souffrance animale durant les procédures.

Une équipe qualifiée composée de zootechniciens et médecins assure au quotidien l'entretien, la surveillance et les soins des animaux. La structure en charge du bien-être animal accompagne la mise en œuvre des expériences. Avec le vétérinaire désigné, elle conseille les responsables de cours dans l'amélioration de leurs pratiques en faveur du bien-être des animaux et de l'application des 3R.

17866 La septicémie, principale cause d'admission dans les unités de soins intensifs, est caractérisée par une réponse inflammatoire généralisée résultant d'une infection non contrôlée. Chez les patients atteints de cette pathologie, la survie est d'autant plus réduite que la production endogène de cortisol, aux propriétés anti-inflammatoires reconnues, est altérée. L'administration de corticoïdes a donc été envisagée comme traitement adjuvant. Dans cette démarche, les premières études à des doses supraphysiologiques se sont révélées négatives. Mais des résultats plus encourageants ont émergé à des doses plus faibles. Des essais randomisés ont, en particulier, révélé une amélioration de la probabilité de survie à 28 jours. Des questions restent cependant en suspens, quant à la catégorie de patients à traiter, le type de corticoïdes à utiliser ou encore à quel moment et à quelle dose les administrer. Une étude clinique récente combinant hydrocortisone+fludrocortisone a montré un effet bénéfique sans restrictions particulières. Cependant, les mécanismes moléculaires mis en jeu restent inconnus. Dans ce projet, nous souhaitons explorer les voies de signalisations

impactées pouvant expliquer ces effets bénéfiques. Pour cela, nous serons amenés à employer deux modèles de sepsis internationalement reconnus, le modèle par péritonite (CLP) et le modèle par administration de lipopolysaccharide (LPS). Les souris seront réparties en 16 groupes (Contrôle, Contrôle-corticoïde seul ou combinaison des deux, LPS, LPS-corticoïde seul ou combinaison des deux, sham, sham-corticoïde seul ou combinaison des deux, CLP, CLP-corticoïde seul ou combinaison des deux). L'utilisation d'animaux, dans cette étude, est dictée par la complexité de cette pathologie touchant plusieurs organes simultanément. L'effet ne peut donc être considéré qu'à l'échelle d'un organisme. De plus, il existe une bonne corrélation entre les données obtenues chez les souris (en cas de synergie des résultats du modèle LPS et du modèle CLP) et l'homme au cours du sepsis (remplacement). Pour limiter le nombre d'animaux, nous nous sommes appuyés sur les travaux antérieurs réalisés au sein du laboratoire, sur une analyse bibliographique poussée de cette pathologie et une optimisation des prélèvements sanguins et des prélèvements tissulaires (cœur, foie, reins, poumons, surrénales, muscles squelettiques) effectués après euthanasie sur chaque animal. Nous nous sommes également limités à l'utilisation d'une dose pour chaque corticoïde employé (réduction). Une attention particulière sera portée au bien-être animal à travers un suivi régulier des souris et ce afin de déceler tout excès de douleur, ce qui introduirait un biais dans nos recherches. Ce suivi a été planifié selon les critères définis dans le document ci-après et reconnu au niveau international (raffinement). Au total, nous serons amenés à utiliser 640 souris pour cette étude qui durera 5 ans.

17867 Objectif du projet: Évaluer l'activité anti-inflammatoire et/ou immuno-régulatrice de molécules après administration par voie topique ou systémique chez le rongeur et/ou chez le mini porc.

Avantages: Chez l'Homme, de nombreux sensibilisants (nickel, médicaments, aliments, colorants, solvant, etc) induisent des allergies de contact qui sont un problème majeur de santé publique ; ainsi les données obtenues lors de ces procédures contribueront au profilage et à la sélection de molécules à utiliser chez l'Homme pour le traitement de désordres cutanés présentant un état inflammatoire aigu ou chronique; tels que l'érythème solaire, l'acné, la rosacée, le psoriasis, la dermatite atopique.

Dommages escomptés: Des produits sensibilisants (molécules chimique ; médicaments...) sont utilisés pour induire un état inflammatoire de la peau. Ces lésions inflammatoires peuvent entraîner un niveau d'inconfort (par exemple: érythème ; œdème ; démangeaisons, sensation de chaleur au niveau de la peau). Cet inconfort sera maîtrisé par le choix des doses du stimulus utilisé et par le recours à un produit analgésique si en adéquation avec le but de l'étude ou par un arrêt du traitement. Dans le cas où ces effets seraient importants des points limites stricts seront appliqués.

Chez le rongeur, le port d'une collerette est recommandé pour l'application topique d'un produit (ceci afin d'éviter l'ingestion après léchage de la zone traitée). Cette collerette peut limiter l'accès à la nourriture et à l'eau de boisson ; le cas échéant, de la nourriture humidifiée serait mise directement dans la cage afin de limiter une éventuelle perte de poids. Une surveillance quotidienne sera également faite dans ce cas-là.

Méthodes alternatives (principe de remplacement): Il n'existe aucune méthode in vitro validée scientifiquement ou test réglementaire in vitro reconnu qui offrirait une alternative à l'expérimentation animale pour répondre aux questions complexes de la régulation de la réaction inflammatoire et de la réponse immunitaire adressées dans ce projet.

Nombre et type d'animaux; conditions d'hébergement et de soins (principe de réduction et principe de raffinement):

-Choix des espèces:

Les espèces rats et souris seront utilisées en raison de l'abondance de littérature sur le système immunitaire de ces modèles; de l'existence d'outils d'analyses ex vivo spécifiques de ces espèces comme par exemple des anticorps pour la localisation des protéines ou des amorces pour l'analyse de l'expression des gènes;

L'espèce mini porc est choisie pour la grande similarité morphologique de la peau avec celle de l'Homme.

-Nombre d'animaux

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet a été réduit à son minimum sans compromettre les objectifs du projet. Selon les méthodes d'analyses utilisées et compte-tenu des variations interindividuelles anticipées, un maximum de 10 animaux par groupe expérimental sera utilisé pour permettre une analyse statistique robuste des résultats générés. Dans la mesure du possible, le micro-échantillonnage sera utilisé de manière à pouvoir prélever plusieurs fois les animaux et réduire ainsi le nombre d'animaux par temps de prélèvement.

Rongeurs : jusqu'à 10 animaux par groupe expérimental seront utilisés pour permettre une analyse statistique robuste des résultats. Il est estimé à 100, le nombre de molécules (différentes ou doses) testées par an par espèce (rat ou souris); soit un total 5000 rats et 5000 souris sur 5 ans. Sur cette même période 6% animaux surnuméraires seront nécessaires pour anticiper le remplacement d'un animal en cas de mauvais état de santé ou de problème survenant au cours de l'étude.

Soit un total sur 5 ans de 10600 rongeurs (5300 rats et 5300 souris).

Miniporcs : Jusqu'à 20 molécules (différentes ou doses) peuvent être évaluées par miniporc. Il est estimé à 1000, le nombre de molécules ou doses pouvant être testées par an.

Soit un total de 250 miniporcs pour 5 ans.

En prenant en compte toutes les espèces, un maximum de 10850 animaux pourront être utilisés à la réalisation de ce projet.

-Conditions d'hébergement et de soins:

Le suivi des animaux sera assuré quotidiennement et des points limites spécifiques ont été établis afin d'anticiper toute dégradation de l'état de santé général des animaux et, le cas échéant, d'appliquer des protocoles d'analgésie adapté.

La stratégie d'enrichissement est régulièrement revue et mise à jour.

Les rongeurs sont hébergés collectivement lors de la réception et de la période d'acclimatation. En début d'étude, ils seront hébergés individuellement pour éviter les risques de bagarres pouvant entraîner des lésions cutanées, et le léchage entre individu des produits lorsqu'ils sont appliqués directement sur la peau. Cependant ils garderont un contact visuel et olfactif entre eux.

Si l'animal devait porter un dispositif de protection (collerette ; gilet de protection...), une période d'adaptation d'au moins 5 jours sera mise en place avant le début de l'étude et une attention particulière sera apportée sur l'état de santé général de l'animal, en particulier sur le poids. Ces animaux seront mis en cage individuelle permettant un contact visuel, auditif et olfactif

L'hébergement est enrichi par des techniques adaptées aux besoins spécifiques et individuels des animaux leur permettant de reproduire au mieux leur comportement naturel (ex : maisonnette ou ouate dans la cage).

Les mini porcs sont hébergés individuellement dans des boxes adaptés au poids de l'animal (minimum de 2m²) sur litière permettant un contact visuel, auditif et olfactif. Un enrichissement du milieu adapté pour leur permettre de s'occuper et d'exprimer les comportements spécifiques de l'espèce sera mis en place.

17868 La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie neuromusculaire fatale liée au chromosome X affectant les garçons avec une incidence à la naissance de 1/5000. Cette pathologie est causée par des mutations dans le gène de la dystrophine indispensable aux fibres musculaires. Dans le muscle déficient en dystrophine, les fibres musculaires dégénèrent et sont remplacées par du tissu gras. Les enfants affectés sont généralement diagnostiqués entre 2 et 5 ans avec un retard du développement conduisant progressivement à une dégénérescence musculaire, une perte de l'ambulation entre 6 et 13 ans et des complications cardio-respiratoires conduisant au décès prématuré vers 30 ans.

Il n'existe à ce jour aucun traitement efficace pour cette maladie. La thérapie génique consiste à insérer, dans les cellules du malade, une version fonctionnelle du gène muté responsable de la maladie. L'apport de ce gène s'opère à l'aide de vecteurs adéno-associé recombinant (rAAV) dont la capacité d'encapsulation est limitée (5kb). Le gène de la dystrophine (11kb) étant trop grand, une

version tronquée et partiellement fonctionnelle est utilisée. Après plusieurs décennies d'optimisation, la thérapie génique visant à transférer un micro-gène de dystrophine (μ DYS) est récemment entrée en essais cliniques. Cependant, une réaction immunitaire contre la μ DYS limitant l'efficacité de la stratégie a été détectée chez des patients DMD après traitement. Une approche thérapeutique alternative consiste à augmenter l'utrophine, un homologue structural et fonctionnel de la dystrophine naturellement exprimé. L'importante taille du gène de l'utrophine (10kb) requiert également l'utilisation d'une version tronquée (μ UTR) pour être délivrée par rAAV. Des études ont démontré que, chez des souris Duchenne mdx nouveaux nés et immunologiquement immatures, la μ DYS et la μ UTR sont équivalents pour endiguer la pathologie. Cependant, dans un contexte dystrophique immunologiquement mature tel que la souris mdx adulte et le chien déficient en dystrophine, la μ UTR n'engendre aucune réponse immunitaire contrairement à la μ DYS. Le système immunitaire des patients DMD étant capable de différencier une protéine du « non soi » (telle que la μ DYS) d'une protéine du « soi » (telle que l'UTR), il est indispensable de prendre en compte cet aspect. En raison de la réponse immunitaire contre la μ DYS et de l'absence de réaction avec la μ UTR, des bénéfices supérieurs ont été rapportés à dose équivalente avec la μ UTR.

L'utilisation d'animaux est indispensable pour déterminer l'efficacité d'une thérapie génique pour DMD car les modèles cellulaires de la maladie ne permettent pas d'étudier les défauts liés à la fonction du muscle (perte de force non mesurable sur des modèles cellulaires, pas de remplacement possible). A l'opposé, le modèle murin mdx reproduit avec une plus grande fidélité certains aspects cellulaires et symptômes de la maladie (faiblesse musculaire, défauts histologiques).

Contrairement à la μ DYS, la μ UTR n'a jamais été optimisée. Seule une version basique et non optimisée a été au préalable testée. Notre projet de recherche vise donc à raffiner cette approche afin de proposer une thérapie génique pour DMD à l'efficacité supérieure et au profil immunologique favorable. Quatre nouvelles μ UTR optimisées seront définies et étudiées en parallèle d'une μ DYS actuellement engagée en clinique. L'efficacité relative des différentes constructions sera tout d'abord testée sur des cellules de patients DMD. Toute construction inefficace pour produire la micro-protéine attendue sera écartée. Similairement aux travaux d'optimisation réalisés avec la μ DYS et basées sur des études histologiques, moléculaires et fonctionnelles, la μ UTR la plus efficace sera sélectionnée suite à un traitement de 10 semaines chez la souris mdx juvéniles immunologiquement immature. Cette première étude nous permettra de comparer le potentiel de chaque construction et de sélectionner, dans un laps de temps relativement court, la μ UTR au plus fort potentiel afin de poursuivre son optimisation. Dans une seconde procédure, la construction sélectionnée sera évaluée à plus long terme chez la souris mdx adulte immunocompétente. Cette dernière étude est absolument nécessaire afin d'étudier la μ UTR sélectionnée dans un contexte immunologique plus proche de celui des patients DMD. Ce plan d'étude permet de réduire drastiquement le nombre d'animaux utilisés et d'économiser 35 souris tout en réduisant significativement le nombre de souris impliquées dans une procédure à plus long terme. Les procédures expérimentales potentiellement douloureuses (test fonctionnel ex vivo) seront effectuées avec un analgésique morphinique fort permettant de soulager les douleurs intenses. Un important bénéfice thérapeutique est attendu, comme le suggèrent des études précédemment réalisées avec une version basique de la μ UTR dans différents modèles murins et canins de DMD. Le nombre de souris nécessaire a été estimé à 7 souris par groupe par une étude statistique prédictive. Les souris seront élevées et reproduites dans notre établissement utilisateur. Notre projet durera 5 ans et nécessitera l'utilisation totale de 98 souris.

17869 Les gliomes sont des tumeurs cérébrales très invasives, et qui sont actuellement incurables : les cellules tumorales envahissent les tissus sains environnants et provoquent une récurrence quasi systématique, même après l'utilisation de traitements (chirurgie, chimiothérapie et radiothérapie). Comprendre et caractériser l'invasivité des gliomes est donc primordial, pour guider le traitement (chirurgie, radiothérapie), et prédire dans quelles zones la récurrence est susceptible d'avoir lieu.

Pour ce faire, il est essentiel de caractériser les tissus tumoraux et sains ainsi que leur interaction, car l'invasivité est le fruit d'interactions des cellules tumorales avec leur environnement. Il a en effet été montré qu'elles le modifient de façon à faciliter leur invasion. Elles rendent le milieu plus acide,

ce qui détruit certaines cellules comme les neurones. Elles émettent également des facteurs déclenchant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Dans ce projet, nous souhaitons suivre en parallèle l'évolution de la tumeur et de ses interactions avec son microenvironnement (réseau vasculaire, cellules environnantes (neurones, astrocytes, etc). Nous étudierons également l'effet de la radiothérapie sur la croissance tumorale et sur les interactions de la tumeur avec son environnement.

Les données mesurées sur les animaux seront utilisées comme base pour le développement d'un modèle mathématique d'invasion tumorale et d'effet de la radiothérapie. A long terme, ce modèle servira de base pour un modèle applicable à l'homme.

Remplacement : Les interactions entre les cellules tumorales et les tissus cérébraux sains autour de la tumeur (notamment les vaisseaux sanguins) sont au cœur de notre projet, il nous est indispensable de développer des modèles animaux et le recours à des méthodes alternatives n'est donc pas envisageable.

Réduction : Pour la réalisation de ce projet, 191 souris seront nécessaires. Les souris seront sacrifiées à des temps différents après implantation de cellules cancéreuses avant et après le début de l'angiogenèse (formation de nouveaux vaisseaux sanguins) pour 1) l'analyse optique et 2) la reconstruction des images cérébrales en 3D en post-mortem. Le nombre d'animaux a été statistiquement défini pour permettre l'obtention de résultats fiables avec le moins d'animaux possible.

Raffinement : En accord avec les recommandations internationales dans le domaine de la cancérologie, les conditions d'hébergement des animaux seront optimisées pour limiter leur stress, avec par exemple, l'ajout d'éléments de raffinement comme du coton dans les cages. Les animaux seront observés quotidiennement pour détecter d'éventuels signes de détresse ou de mal-être et des mesures adéquates seront prises pour arrêter immédiatement leur souffrance.

17870 Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) sont une cause majeure de dépendance et de mortalité chez l'homme. Si la majorité des décès est directement liée à la sévérité de l'atteinte cérébrale, les complications cardiaques représentent la seconde cause de décès après un AVC. Cependant, les mécanismes expliquant ces complications cardiaques secondaires à l'AVC sont mal connus. L'objectif principal de ce travail est de mieux comprendre ces liens reliant le cerveau exposé à une souffrance ischémique et le retentissement cardiaque secondaire.

Le modèle d'ischémie cérébrale chez le rongeur est largement utilisé en recherche préclinique afin de tester des traitements protecteurs capables de limiter les dommages cérébraux et par conséquent limiter les troubles cognitifs et moteurs.

Le premier objectif de la présente étude est d'étudier le retentissement cardiaque d'un AVC expérimental chez le rat, à l'aide d'une échocardiographie à différents temps de reperfusion.

Le deuxième objectif de l'étude est de fournir une vision globale et intégrée des modifications métaboliques cardiaques survenant après un AVC expérimental, en utilisant la méthode de spectrométrie de masse.

Cette étude devrait permettre d'identifier des marqueurs précoces d'atteinte cardiaque au cours des AVC ischémiques et d'améliorer la compréhension de la physiopathologie à l'origine des complications cardiaques au décours d'un AVC ischémique.

Cette étude doit nécessairement être réalisée sur des animaux vivants puisqu'il s'agit d'étudier des interactivités inter-organes au décours d'une ischémie cérébrale. L'espèce utilisée sera le rat, chez qui le modèle d'AVC par ischémie cérébrale est bien maîtrisé. Il est préféré au même modèle réalisé chez la souris car il permet de limiter le nombre d'animaux utilisés en raison d'une quantité plus importante de matériel biologique disponible (pour les études métaboliques et la plus grande facilité d'étude en échocardiographie).

Les animaux seront anesthésiés et opérés par des personnes compétentes et qualifiées pour occlure de façon transitoire une artère irriguant le cerveau. Les rats feront l'objet d'une

échocardiographie avant le sacrifice. Celle-ci sera réalisée par des personnes ayant une grande expérience de l'échocardiographie chez le rongeur.

L'accès au tissu cardiaque humain n'étant pas envisageable nous étudierons deux groupes expérimentaux, différenciant les rats du groupe AVC et ceux du groupe Sham. Au total, 190 animaux (rats Sprague-Dawley) seront étudiés. Parmi ce nombre, nous recueillerons les tissus ventriculaires cardiaques et les plasmas de 17 rats (groupe Sham) et 21 rats (groupe AVC) pour chaque temps de reperfusion (2h, 24h, 48h, J3 et J7) dans les conditions optimales pour minimiser les biais liés à la variabilité des conditions expérimentales.

Un certain nombre de mesures seront prises afin de limiter au maximum la souffrance et la douleur de l'animal tout au long de la procédure. Les rats recevront des doses d'anesthésiques et d'analgésiques adaptées tout au long de l'étude afin de limiter au maximum la douleur. Après la chirurgie les animaux sont gardés sous surveillance dans une cage sur tapis chauffant avec enrichissement, eau et nourriture gélifiées en plus de l'alimentation habituelle.

L'ischémie cérébrale peut entraîner des déficits neurologiques pouvant impliquer une diminution des capacités locomotrices de l'animal. C'est pourquoi les animaux feront l'objet d'un suivi renforcé après l'opération en s'appuyant sur une fiche d'observation permettant de mettre en évidence un éventuel point limite.

Dans le respect de la règle des 3R, nous REDUIRONS le nombre d'animaux à maximum 21 rats par groupe. Ce nombre est basé sur notre expérience. C'est le nombre minimal qui permet d'assurer la robustesse des résultats pour évaluer au mieux les retentissements métaboliques à la suite d'une ischémie cérébrale, sans qu'il soit excessif en terme d'animaux à inclure. Seules les expériences indispensables seront réalisées et il n'y aura pas de répétition inutile d'expérience.

Nous RAFFINERONS cette étude par un hébergement des animaux selon la réglementation en vigueur avec un enrichissement du milieu. Les animaux sont élevés avec une attention particulière (passage d'animalier minimum 2 fois/jour). Les manipulations sont réduites au minimum afin de limiter le stress des animaux. La souffrance de l'animal sera réduite au maximum ou supprimée par l'utilisation d'anesthésique (Pentobarbital sodique 60mg/Kg) avant la chirurgie et d'analgésique (Buprénorphine 0.05mg/Kg) aux doses appropriées avant la chirurgie, une deuxième injection de Buprénorphine (0.05mg/Kg) est réalisée 6h après le réveil puis une troisième injection 14h après la seconde injection.

Le REMPLACEMENT d'animaux ne sera pas possible dans cette étude, car il n'existe pas aujourd'hui de méthode alternative ni de modélisation possible pour observer les atteintes cardiaques au décours d'une ischémie cérébrale.

17871 Le vieillissement est un phénomène physiologique inéluctable auquel tous les organismes vivants sont confrontés. D'un point de vue sociétal, le vieillissement constitue cependant un défi majeur pour les systèmes de santé. En effet le vieillissement est classiquement associé à une augmentation des diverses pathologies chroniques (maladies neurodégénératives, cardiovasculaires, ostéoporose, diabète de type 2, stéatose hépatique, etc.) et à une augmentation des dépenses de santé. Ce vieillissement est également associé à une augmentation de l'obésité. Le vieillissement et l'obésité pourraient présenter des effets additifs voire synergiques quant à l'apparition des pathologies chroniques. En parallèle, il est bien documenté dans la littérature que le vieillissement et l'obésité sont fortement corrélés à une diminution de la teneur plasmatique en 25-hydroxyvitamine D (25(OH)D), le marqueur principal du statut en vitamine D au niveau plasmatique. Dans ce projet, nous cherchons à mettre en évidence l'effet du vieillissement, associé ou non à l'obésité, dans le but ultime d'identifier et mieux comprendre les phénomènes physiologiques associées au vieillissement et notamment le rôle de la VD dans ce processus. La finalité de ce projet est de fournir des données originales permettant à terme d'optimiser la prise en charge de la population afin d'en assurer un vieillissement optimal.

Nous étudierons l'effet du vieillissement associé ou non à un régime obésogène induit par l'alimentation (régime apportant 45% de l'énergie sous forme de lipides) chez des souris C57Bl6 mâles âgés de 2, 12 et 18 mois. La durée du régime sera de 16 semaines pour ce projet. Au total,

60 souris réparties en 6 groupes expérimentaux (n = 10/groupe) seront nécessaires pour mener à bien cette étude. Le développement du vieillissement associé à l'obésité et ses conséquences métaboliques sera caractérisé avec différentes méthodes. Le développement du vieillissement associé à l'obésité et ses conséquences métaboliques sera caractérisé via l'analyse du poids, du comportement alimentaire, des dépenses énergétiques, des fonctions locomotrices, de la fonction rénale et du suivi de marqueur (glucose/lactate/insuline) dans le plasma. A l'issue des études, les animaux seront mis à mort par dislocation cervicale sous anesthésie générale pour prélèvement d'organes dans l'optique de caractériser les effets biologiques dans différents tissus.

Ce projet prendra en compte la règle des 3 Rs :

- Remplacement : il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode de substitution in vitro pour étudier l'impact du vieillissement et de l'obésité et sur le métabolisme énergétique et le métabolisme de la vitamine D. La souris est un modèle de choix car elle présente des mécanismes physiologiques proches de ceux qui sont observés chez l'Homme.

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

- Raffinement : les méthodes utilisées sont en majorité non invasives. Les animaux seront hébergés en individuel, et l'environnement sera enrichi par la présence d'un igloo en plastique et de matériel de nidification (bandelettes de papier kraft). Une crème anesthésique sera appliquée localement avant incision et prélèvement de sang à la queue. Les animaux seront manipulés régulièrement pour les habituer à notre contact et ainsi limiter leur stress.

17872 Nos études préliminaires montrent que la concentration plasmatique d'une protéine présente dans le sang appelée chémérine est après gavage positivement corrélée à l'accumulation de graisse dans le foie chez le canard mulard. Sa concentration avant gavage est de l'ordre de 500 ng/ml pour atteindre environ 1500 ng/ml après gavage. Chez l'homme, la chémérine dans le sang contrôle le métabolisme lipidique et est associée à la maladie du foie gras. L'objectif du projet, est de déterminer à partir de quel stade la chémérine plasmatique devient un biomarqueur fiable de la capacité à l'accumulation de graisse dans le foie chez le canard mulard. A cette fin, une prise de sang sera effectuée à l'arrière de la tête (sinus occipital) pour quantifier la concentration en chémérine dans le plasma à différents stades avant gavage dès le plus jeune âge (10j, 30j, 56j et 70j d'âge) en début et fin de gavage (J84 et J96) et après arrêt du gavage (J106, J116, J126 et J136) sur tous les animaux. Enfin, à chaque stade de prélèvement plasmatique, des prélèvements post-mortem de foie sur quelques animaux permettront de quantifier la protéine dans le foie et comprendre son mode d'action cellulaire. Pour répondre à cet objectif 150 canards mâles de race Mulard seront utilisés et tous euthanasiés à la fin pour la pesée du foie et la commercialisation des carcasses. Les résultats acquis devraient permettre de sélectionner le plus tôt possible les animaux qui feront un foie de poids commercialisable et donc de ne pas gaver des animaux inutilement. La règle des 3 R sera respectée : Réduction : le nombre d'animaux mis en élevage et utilisé (n=150) prend en compte les besoins expérimentaux déterminés après étude préliminaire et analyse statistique. Remplacement : compte tenu de l'objectif du projet, le modèle animal ne peut être substitué par un modèle d'étude in vitro ou in silico. Raffinement : Pour la période d'élevage, à leur arrivée, les canetons d'un jour seront placés sur litière de copeaux au sein d'un bâtiment préchauffé à 28 °C 48h avant leur arrivée (30 m²). A partir de 21 jours, ils auront accès à un parcours extérieur herbeux (100 m²), pourront battre des ailes et se tremper la tête dans l'abreuvoir. Pour le gavage, à l'âge de 8 semaines, afin de préparer leur jabot au gavage, les animaux suivent un rationnement horaire consistant à limiter la durée d'accès aux mangeoires à 1h par jour pour accepter naturellement des quantités ingérées plus importantes. Ceci est une pratique d'élevage utilisée en élevage de canards à gaver. Les animaux sont nourris avec des aliments commerciaux répondant à leurs besoins nutritionnels et ont accès aux abreuvoirs librement. Au moment du gavage, les animaux par 4 sont placés dans des cages collectives de 80 cm (longueur), 65 cm (profondeur), 60 cm de hauteur. En terme d'enrichissement, les animaux en cage ont accès à des chainettes métalliques suspendues. A la fin du gavage J96, les animaux restant retourneront dans le bâtiment de 30m² avec un accès au parcours. Durant l'élevage, pendant et après le gavage, les animaliers

assurent les soins et la surveillance quotidiennement (vérification de l'ambiance, propreté de la litière, état des animaux...). Dès qu'un écart est constaté, ils réajustent apportant les soins et signalent toute observation négative.

17873 Le choc septique est le stade le plus grave d'une infection. Il constitue un motif fréquent d'admission en réanimation et est responsable chaque année de nombreux décès (40%) malgré une prise en charge optimale.

Le choc septique est caractérisé par une inflammation généralisée (systémique) majeure et une altération de la fonction des organes vitaux, conduisant au décès. Le choc septique va également être responsable d'une dérégulation de la glycémie (taux de sucre dans le sang), responsable d'une surmortalité des patients. Cette dérégulation est liée notamment à une résistance à l'insuline.

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

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

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

Raffiner : Afin de limiter l'angoisse, l'inconfort, le stress et la douleur associés, les expériences sont raffinées :

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

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

17874 Le choc septique est stade le plus grave d'une infection. Il constitue un motif fréquent d'admission en réanimation (environ 70 000 par an en France) et il est responsable chaque année de nombreux décès du fait d'une mortalité importante (de l'ordre de 40% chez les patients en choc septique) malgré une prise en charge optimale. Les raisons pour lesquelles une bactérie peut être responsable d'une infection contrôlée ou d'un choc septique fatal ne sont pas encore complètement comprises. Une recherche scientifique est donc nécessaire pour mieux comprendre la physiopathologie du choc septique, afin de trouver de nouveaux marqueurs diagnostiques et de nouveaux traitements.

Cependant, de plus en plus de travaux s'intéressent aux complications faisant suites à un choc septique. En effet, de nombreuses études observationnelles ont montré un taux de mortalité plus important, chez les personnes qui survivent à un épisode de choc septique. Parmi les causes responsables de ce surcroît de mortalité chez ces patients, des travaux récents mettent en évidence plusieurs facteurs potentiellement impliquée : -une augmentation ses événements cardiovasculaires (infarctus du myocarde, accidents vasculaires cérébraux) dans l'année suivant un épisode septique sévère, probablement du fait d'une dysfonction endothéliale induite.

-une augmentation des épisodes infectieux via des dysfonctions immunitaires complexes et soutenues dans le temps, touchant à la fois le système immunitaire inné et adaptatif, faisant suite à un choc septique.

Notre projet vise donc à mieux comprendre les mécanismes biologiques à l'origine de ces dysfonction endothéliales et leucocytaires.

L'un des mécanismes biologiques connu pour altérer de manière durable les fonctions endothéliales et leucocytaire est la sénescence induite.

En effet, la recherche sur les maladies cardio-vasculaire a révélé l'existence de cellules sénescents dans les muscles lisses et l'endothélium des vaisseaux des patients atteints d'athérosclérose. Il serait donc possible que la sénescence endothéliale contribue à l'installation ou à la progression des maladies cardio-vasculaires.

De même, l'immunosénescence consistant en une altération fonctionnelle de l'immunité innée et surtout de l'immunité adaptative pourrait être majorée après un choc septique.

L'objectif est in fine d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour des traitements plus efficaces et plus précoces.

Notre projet sera réalisé à l'aide d'un modèle de souris en choc septique, d'origine polymicrobienne, par péritonite.

La règle des 3 R : réduire, raffiner, remplacer constituant le fondement de la démarche éthique appliquée à l'expérimentation animale sera scrupuleusement respectée.

Réduire : Les nombres d'animaux utilisés lors des expériences seront réduits au minimum nécessaire, avec la contrainte d'obtenir des données statistiquement significatives (t-test, one way ou two-way ANOVA selon les expériences). Le maximum de tissus sera prélevé sur un même animal.

Raffiner : Afin de limiter l'angoisse, l'inconfort, le stress et la douleur associés, les expériences sont raffinées :

- toutes les expériences seront réalisées sur des animaux anesthésiés
- les animaux sont alors replacés dans leur cage d'origine avec des congénères qui ont subi la même opération. Un gel nutritif est présent dans la cage ainsi que la nourriture standard déposée au fond pour faciliter la prise de nutriments et l'hydratation, ainsi que du coton cardé pour permettre aux animaux de se maintenir au chaud.
- des traitements antalgiques seront administrés
- les conditions d'hébergement des animaux seront adaptées à leur état
- les expériences sur animaux vigiles auront une durée limitée dans le temps
- en fin d'expérience, le sang sera prélevé à l'aorte des animaux anesthésiés, qui seront ensuite mis à mort et différents tissus seront prélevés.

Remplacer : Le remplacement du modèle animal par un autre modèle n'est pas possible car les effets d'un choc septique sur l'ensemble de l'organisme sont des processus complexes issus des interactions multi-tissulaires chez l'être vivant.

Cependant, l'identification préalable des mécanismes moléculaires probablement impliqués ont sont en cours d'étude à l'aide de méthode alternative (modèle de cultures cellulaires stimulées par une endotoxine).

L'ensemble de ces expériences nécessitera au maximum 220 souris.

17875 Le choc septique est stade le plus grave d'une infection. Il constitue un motif fréquent d'admission en réanimation (environ 70 000 par an en France) et il est responsable chaque année de nombreux décès du fait d'une mortalité importante (de l'ordre de 40% chez les patients en choc septique) malgré une prise en charge optimale. Les raisons pour lesquelles une bactérie peut être responsable d'une infection contrôlée ou d'un choc septique fatal ne sont pas encore complètement comprises. Une recherche scientifique est donc nécessaire pour mieux comprendre la

physiopathologie du choc septique, afin de trouver de nouveaux marqueurs diagnostiques et de nouveaux traitements.

Cependant, de plus en plus de travaux s'intéressent aux complications faisant suites à un choc septique. En effet, de nombreuses études observationnelles ont montré un taux de mortalité plus important, chez les personnes qui survivent à un épisode de choc septique.

Parmi les causes responsables de ce surcroît de mortalité chez ces patients, des travaux récents mettent en évidence plusieurs facteurs potentiellement impliquée :

-une augmentation ses événements cardiovasculaires (infarctus du myocarde, accidents vasculaires cérébraux) dans l'année suivant un épisode septique sévère, probablement du fait d'une dysfonction endothéliale induite.

-une augmentation des épisodes infectieux via des dysfonctions immunitaires complexes et soutenues dans le temps, touchant à la fois le système immunitaire inné et adaptatif, faisant suite à un choc septique.

Notre projet vise donc à mieux comprendre les mécanismes biologiques à l'origine de ces dysfonction endothéliales et leucocytaires. L'un des mécanismes biologiques connu pour altérer de manière durable les fonctions endothéliales et leucocytaire est la sénescence induite. En effet, la recherche sur les maladies cardio-vasculaire a révélé l'existence de cellules sénescents dans les muscles lisses et l'endothélium des vaisseaux des patients atteints d'athérosclérose. Il serait donc possible que la sénescence endothéliale contribue à l'installation ou à la progression des maladies cardio-vasculaires.

De même, l'immunosénescence consistant en une altération fonctionnelle de l'immunité innée et surtout de l'immunité adaptative pourrait être majorée après un choc septique.

L'objectif est in fine d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour des traitements plus efficaces et plus précoces.

Notre projet sera réalisé à l'aide d'un modèle de rat en choc septique, d'origine polymicrobienne, par péritonite.

La règle des 3 R : réduire, raffiner, remplacer constituant le fondement de la démarche éthique appliquée à l'expérimentation animale sera scrupuleusement respectée.

Réduire : Les nombres d'animaux utilisés lors des expériences seront réduits au minimum nécessaire, avec la contrainte d'obtenir des données statistiquement significatives (t-test, one way ou two-way ANOVA selon les expériences). Le maximum de tissus sera prélevé sur un même animal.

Raffiner : Afin de limiter l'angoisse, l'inconfort, le stress et la douleur associés, les expériences sont raffinées :

- les animaux sont alors replacés dans leur cage d'origine avec des congénères qui ont subi la même opération. Un gel nutritif est présent dans la cage ainsi que la nourriture standard déposée au fond pour faciliter la prise de nutriments et l'hydratation, ainsi que du coton cardé pour permettre aux animaux de se maintenir au chaud.

- des traitements antalgiques seront administrés

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

Remplacer : Le remplacement du modèle animal par un autre modèle n'est pas possible car les effets d'un choc septique sur l'ensemble de l'organisme sont des processus complexes issus des interactions multi-tissulaires chez l'être vivant.

Cependant, l'identification préalable des mécanismes moléculaires probablement impliqués ont sont en cours d'étude à l'aide de méthode alternative (modèle de cultures cellulaires stimulées par une endotoxine).

L'ensemble de ces expériences nécessitera au maximum 106 rats.

17876 La maladie de Parkinson (MP) représente un problème majeur de santé publique qui affecte principalement le sujet âgé. C'est une maladie à évolution lente, irréversible et à ce jour incurable.

Son étiologie précise reste inconnue, mais inexorablement associée à une mort exacerbée des neurones d'une région du cerveau impliquée dans le contrôle des mouvements. Plusieurs hypothèses concernant les mécanismes moléculaires responsables de la dégénérescence des neurones ont été émises, notamment, l'accumulation de protéines agrégées due à un dysfonctionnement d'une des machineries responsables de leur dégradation. Nous étudions au laboratoire le rôle de plusieurs protéines responsables de formes héréditaires de la MP dans l'origine de dérèglements associée à l'accumulation délétère des protéines agrégées dans la MP. Notamment, nous avons mis en évidence l'existence d'une cascade moléculaire impliquant trois protéines clés responsables des formes génétiques de la MP, la parkine (PRKN), la glucocérébrosidase (GBA) et l'alpha-synucléine (SNCA) dans les origines de ces dysfonctionnements in vitro. Cependant, si nos nombreux résultats obtenus par des approches de biologie cellulaire étaient un préalable nécessaire à l'identification et caractérisation des cascades moléculaires associées à ces dysfonctionnements, ceux-ci nécessitent une validation dans des modèles intégrés chez l'animal.

Mon projet de recherche vise donc à valider l'implication de la cascade de signalisation parkine-GBA-SNCA chez la souris dans des conditions normales et de traitement au MPTP (1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine).

Les procédures d'expérimentation chez l'animal proposés ici visent à 1) déterminer si le blocage pharmacologique de la GBA par le CBE (conduitirol beta-epoxide, injection intrapéritonéale) impacte la régulation la SNCA et la machinerie de dégradation protéique par la PRKN en conditions normales et de traitement au MPTP et 2) déterminer si le blocage pharmacologique de la nitrosylation e la PRKN par le NIL (N6-(1-Iminoethyl)-L-lysine hydrochloride, injection intrapéritonéale) impacte sa capacité de réguler la GBA et la SNCA.

Ce projet permettra de mieux comprendre les mécanismes pathologiques responsables de la maladie de Parkinson et par conséquent le développement des thérapies plus efficaces chez l'homme.

Ce projet échelonné sur 5 ans utilisera 624 souris majoritairement élevées dans notre animalerie. Les procédures décrites ci-dessous ont été conceptualisées dans le respect éthique de la règle des 3R (remplacement, réduction et raffinement) et basés sur de nombreuses publications dont les protocoles d'expérimentation animale ont été validés par des comités d'éthique nationaux et internationaux.

Remplacement : le sujet du projet concerne une cascade de signalisation que nous avons d'abord validée in vitro, mais que nécessite une validation chez la souris afin d'aboutir à des nouvelles pistes thérapeutiques chez l'homme.

Réduction : L'effectif pour chaque groupe a été réduit au maximum en tenant compte de la variabilité biologique et déterminé à l'aide du programme statistique G*Power. Ce type de calcul de puissance permet de limiter au maximum le nombre d'animaux utilisé tout en garantissant la pertinence et la qualité d'analyse des résultats.

Raffinement : Les actes associés aux procédures 1 et 2 n'engendrent pas la douleur ou l'angoisse des animaux et donc ne nécessitent pas la mise en place des mesures de raffinement particulières. Toutefois, nous allons réaliser un suivi journalier des animaux et si des altérations morphologiques et/ou comportementales sont observées les animaux seront euthanasiés par des méthodes adaptées. Enfin, nous assurerons le bien-être des animaux tout au long de l'expérimentation en limitant leur angoisse grâce au suivi des conditions d'hébergement, habituation des animaux aux expérimentateurs et d'utilisation de cages le proposant un environnement riche selon les préconisations de notre comité SBEA (Structure de Bien-Etre Animal).

17877 Ce projet s'inscrit dans le cadre d'essais précliniques destinés à évaluer le profil toxicologique de molécules auquel l'homme pourrait être exposé. Plus spécifiquement, ce projet a pour objectif de valider de nouveaux biomarqueurs de toxicité sériques, urinaires ou tissulaires et ainsi de les utiliser dans les études de toxicologie pour mieux sélectionner de nouveaux principes actifs. Cette procédure présente un bénéfice certain puisque l'utilisation de ces animaux permettra de valider

certaines marqueurs de toxicité (enzymatiques, protéiques, nucléiques, etc. .) qui pourront être étudiés dans les futures études de toxicité et ainsi raffiner nos designs d'études ou d'exclure rapidement les composés présentant un profil défavorable et d'éviter de les tester inutilement chez l'animal. Ainsi l'objectif de réduire l'utilisation des animaux lors du développement des molécules serait possible.

Les rats utilisés dans ce projet seront maintenus en acclimatation puis traités par des produits de référence à des doses ne présentant aucune toxicité excessive. A l'issue de périodes de traitement définies, des prises de sang et/ou des prélèvements d'urines et/ou une procédure chirurgicale (pour permettre le prélèvement de certains organes cibles) seront réalisés. Pour le prélèvement d'organes, les animaux seront euthanasiés après une profonde anesthésie générale suivant les procédures appliquées sur le site.

Au total, ce projet prévoit 500 rats sur 5 ans, soit 100 rats par an. Cet effectif a été défini sur la base du nombre de composés à tester dans les essais de validation et du nombre d'animaux nécessaires pour réaliser l'ensemble des validations. Afin de réduire le nombre d'animaux, dans la mesure du possible, plusieurs organes seront collectés sur les mêmes animaux et plusieurs types de biomarqueurs seront évalués.

Les procédures (surveillance clinique, anesthésie, autopsie) seront effectuées par du personnel qualifié et expérimenté. Des points limites appropriés et validés par le comité d'éthique et la SBEA ont été mis en place dans chaque procédure.

17878 Le projet présenté concerne deux procédures différentes de classe légère. La première vise à étudier l'effet d'un potentiel adjuvant aux antipsychotiques sur un test comportemental largement utilisé dans le cadre de la schizophrénie. Cette maladie psychiatrique grave touche 1% de la population et les traitements actuels ne sont hélas pas satisfaisants car ils ne prennent pas en charge l'ensemble des symptômes de la maladie. Il est donc essentiel d'améliorer ces traitements. Le prepulse inhibition, phénomène neurologique durant lequel un pré-stimulus plus faible inhibe la réaction à un stimulus fort, a l'avantage de pouvoir être testé aussi bien chez l'homme que chez l'animal. Les patients schizophrènes, ainsi que les modèles animaux reconnus de schizophrénie présentent des déficits de cette inhibition (Powell et al. , 2009, Behav Brain Res). Dans le cadre d'une étude plus large portant sur un potentiel traitement adjuvant aux antipsychotiques classiques (antagoniste des récepteurs 5HT₆ de la sérotonine), nous souhaiterions étudier les effets d'une molécule sélective de ces récepteurs dans le prepulse inhibition.

Dans cette étude, la molécule pharmacologique (SB-271046) sera administrée à différentes doses et nous observerons ses effets sur le prepulse inhibition sur 40 souris soumises ou non à une administration préalable d'amphétamine (qui induit un déficit dans ce test). L'étude de propriétés antipsychotiques sollicite des mécanismes cérébraux complexes et intégrés ne bénéficiant pas de modèles in vitro ou in silico satisfaisants.

La procédure utilisée comprendra donc des animaux qui seront soumis soit à une administration aiguë de SB-271046 ou de sérum physiologique, soit à une administration aiguë d'amphétamine à faible dose précédée d'une administration de SB-271046 ou de sérum physiologique. Cette procédure nous permettra de savoir si le SB-271046 est capable de contrer les effets de l'amphétamine. L'utilisation de 3 doses de SB-271046 permettra de définir la plus faible dose active qui sera utilisée pour la suite du projet.

La deuxième expérimentation, qui sera réalisée 15 jours plus tard, permettra de réutiliser les 40 animaux dans une autre procédure. Elle consistera à valider un nouveau dispositif d'acuité visuelle acquis récemment au laboratoire. L'acuité visuelle sera indirectement mesurée, via la réponse optomotrice induite par la vision de bandes verticales en mouvement. La moitié des animaux sera considérée comme témoins et l'autre moitié recevra une injection de methscopolamine, connue pour induire des déficits d'acuité visuelle. Cette validation de protocole s'inscrit dans un projet à long terme de vérification de l'acuité visuelle des animaux avant de les soumettre à des tests comportementaux utilisant principalement la modalité visuelle.

Les animaux seront maintenus dans des conditions d'hébergement stables, contrôlées, et avec un enrichissement du milieu (ajout d'un igloo en papier mâché et des lamelles fines de papier « kraft ») de manière à assurer leur bien-être. Durant toute la durée des expérimentations, les animaux seront surveillés quotidiennement par un personnel qualifié et formé, et seront pesés de manière hebdomadaire. La détection d'un animal en état de souffrance ou de mal-être induira son exclusion du protocole. Les animaux seront fréquemment manipulés avant le début des expérimentations permettant ainsi d'habituer les animaux aux manipulateurs et de diminuer leur stress. Ces attentions particulières accordées aux animaux et l'adaptation des procédures permettent de répondre au mieux au point « Raffiner » de la règle des 3R.

Les animaux seront exposés à plusieurs reprises au test de prepulse inhibition, et une unique fois au test de mesure de l'acuité visuelle. Cette réutilisation des animaux permet de répondre au mieux au point « Réduire » de la règle des 3R. Nous allons de ce fait utiliser seulement 40 souris pour réaliser les deux protocoles. Nous ne pourrions pas répondre au point « Remplacer » de la règle des 3R, car il n'y a aucune alternative *in vitro*. Ainsi, ce projet prend en compte le bien-être animal, les pratiques éthiques et répond à la règle des 3R.

17879 Deux espèces de tortues marines, la Tortue verte *Chelonia mydas* et la Tortue imbriquée *Eretmochelys imbricata*, fréquentent les eaux côtières réunionnaises, notamment pour s'y alimenter. Si les programmes d'étude menés depuis une quinzaine d'années ont mis en évidence un accroissement notable des populations ainsi qu'un attachement spatial marqué et des temps de résidence significatifs des juvéniles, les effectifs restent faibles et les connaissances encore partielles. C'est le cas en particulier de la structure des populations, de sa stabilité et de l'utilisation de l'habitat disponible sur la côte réunionnaise.

Les lacunes sont également totales en matière d'évaluation du stress des individus induit par l'écosystème que ces espèces utilisent et les pressions anthropiques qui les affectent. Le présent projet se propose, à travers des analyses génétiques et d'évaluation du stress individuel mesurés sur des tortues verte et imbriquée (N=30 pour la tortue verte, et N= 10 pour l'imbriquée), (1) d'étudier la stabilité de la diversité génétique des populations de tortues marines de La Réunion, (2) d'estimer l'utilisation des habitats d'alimentation et de développer des indicateurs du stress des individus.

Les procédures expérimentales prévues suivent les recommandations du groupe de spécialistes des tortues marines (MTSG) de l'UICN (Union Internationale pour la Conservation de la Nature) et de la SSC (Species Survival Commission) en termes de standards de collecte et de manipulations des animaux. Une attention particulière sera portée au bien-être des animaux pendant toute la durée de l'application de ces procédures. Elles seront encadrées par des personnels qualifiés et identifiés préalablement aux actions de terrain.

Si des captures/remise à l'eau dans leur milieu naturel d'espèces menacées comme les tortues marines est potentiellement dommageable pour l'espèce, c'est justement ce caractère « menacé » qui justifie l'acquisition de connaissance par des prélèvements. Car sans connaissance sur la structure génétique de grands migrants comme les tortues marines, et l'impact que peut provoquer la qualité de l'environnement qu'elles utilisent (différents écosystèmes coralliens de La Réunion) durant une phase clé de leur cycle de vie, nous ne serons pas en capacité de proposer des mesures de conservation à fine échelle à la fois cohérentes et efficaces pour ces espèces.

Enfin, afin d'optimiser le protocole, nous avons suivi la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner) :

- Remplacer : il est impossible dans le cadre de ce protocole ciblant ces 2 espèces de tortues marines sauvages de les remplacer par des individus en élevage ou une autre espèce, l'intérêt du projet étant justement d'étudier la structure génétique et les éléments liés au stress (et donc à l'utilisation de l'habitat) d'individus sauvages dans leur milieu naturel. Enfin, bien que des modélisations de dérive passive des nouveau-nés basés sur des modèles de courantologie existent, ils ne permettent pas de mettre en évidence les caractéristiques philopatrices des individus et apportent des réponses limitées, ne permettant pas le remplacement.

- Réduire : le nombre d'individus testés dans les différents lots et procédures est minimal compte tenu de la nécessité d'avoir des significativités statistiques. En se basant sur la connaissance de la diversité génétique aux marqueurs considérés, il a été démontré qu'un lot de 30 individus était nécessaire. Dans le cas des tortues vertes de La Réunion, nous avons effectivement ciblé 30 individus car la grande majorité des autres études sur cette espèce que nous exploiterons dans le cadre des analyses fournissent des résultats pour une trentaine d'individus. Nous avons enfin décidé de nous limiter à 10 individus pour l'imbriquée car peu de données génétiques sont actuellement disponibles pour cette espèce dans le sud-ouest de l'océan Indien et que cette espèce est peu abondante à La Réunion (elle ne représente qu'un tiers de la population de tortues marines recensée autour de l'île) ; nous avons donc privilégié un nombre réduit afin de les perturber au minimum tout en acquérant des premières informations fondamentales sur leur diversité génétique et leur niveau de stress. »

- Raffiner : Tout a été mis en place dans le cadre des procédures pour leur bien-être et limiter la souffrance et le stress des animaux durant les différentes phases de la manipulation; et ce par la mise en place de procédures de capture adaptées (à la main, en bouteille, ciblage d'individus calmes et conciliants sans poursuite), de maintien à bord optimales (ombre, linge humide, yeux cachés...) et d'anesthésie si nécessaire lors des prélèvements

17880 L'insuffisance cardiaque représente un enjeu majeur de santé publique. Les mécanismes conduisant à l'affaiblissement du cœur par la dégradation de sa paroi sont très complexes et insuffisamment compris, ce qui limite l'efficacité des traitements employés pour les combattre.

Notre objectif est d'étudier un régulateur de dégradation des tissus, qui est produit dans le cœur, mais dont le rôle reste à éclaircir. Ce régulateur a déjà été montré avoir un rôle dans de nombreuses maladies (maladies vasculaires, cancer), et nous souhaitons mesurer son effet dans le développement de l'insuffisance cardiaque à l'aide d'un modèle reproduisant cette pathologie chez la souris. Ce modèle sera généré et son développement sera comparé chez des souris qui produisent ce régulateur et chez des souris qui n'en produisent pas après modification génétique. L'absence de Serpine2 chez les souris n'a pas d'incidence sur leur qualité de vie en condition normale, mais elle pourrait avoir une conséquence lors du développement de la maladie. L'insuffisance cardiaque sera induite grâce à une intervention chirurgicale menée chez des souris adultes. L'évolution de l'insuffisance cardiaque (paramètres physiologiques de fonctionnement du cœur) chez ces animaux sera suivie par échographie pendant les 4 semaines du développement de la pathologie, car celle-ci est silencieuse et ne donne lieu à aucun symptôme mesurable visible. Les cœurs seront ensuite étudiés après euthanasie des animaux par des techniques d'histologie. Dans ce protocole, les souris produisant la serpine2 seront comparées à celles n'en produisant pas après modification génétique. Au total ce projet utilisera 240 souris : 120 mâles et 120 femelles sur une durée de 5 ans, car l'insuffisance cardiaque touche aussi bien les hommes que les femmes. Différents groupes seront constitués afin de tester différents degrés de sévérité de la maladie, en comparaison à des souris contrôles subissant une chirurgie factice. Dans ce projet, la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner) sera respectée. Des expériences seront menées in vitro sur des cellules cardiaques en culture afin de remplacer autant que possible l'utilisation de ces animaux. Cependant, la complexité des mécanismes à l'origine de l'insuffisance cardiaque requiert l'utilisation d'un organisme complet. Nous réduisons au maximum le nombre de souris utilisées, tout en nous assurant que les études réalisées nous permettent d'effectuer les analyses statistiques nécessaires. Nous raffinerons l'environnement des animaux par enrichissement de leur milieu de vie. La chirurgie sera pratiquée sous anesthésie et analgésie avec un suivi post-opératoire. Les animaux seront surveillés quotidiennement et les critères de traitement pour soulager l'animal et/ou les critères d'arrêt définis seront appliqués afin d'éviter toute souffrance. Tous les animaux seront euthanasiés en fin de procédure.

Ce projet nous permettra de déterminer si la Serpine2 pourrait être une cible thérapeutique dans le traitement de l'insuffisance cardiaque. Les progrès réalisés actuellement en terme de thérapie génique permettent d'envisager le développement de nouveaux traitements prometteurs, nos résultats pourraient ainsi offrir de nouvelles perspectives dans la lutte contre cette pathologie.

17881 Le Diplôme d'Université "formation aux techniques per-opératoire du système nerveux central et périphérique" a pour objectif de former des chirurgiens spécialisés du rachis, orthopédistes, neurochirurgiens, médecins et infirmiers de blocs opératoires concernés au suivi des influx nerveux lors d'une chirurgie du rachis. En effet, lors d'une opération du rachis, il est indispensable de vérifier si l'intervention engendre des lésions motrices ou sensitives chez le patient. Pour cela, les chirurgiens utilisent une surveillance d'électrophysiologie qui consiste à implanter des électrodes de stimulation et de réception au niveau du cuir chevelu et des membres inférieurs et supérieurs. Un courant électrique adapté est délivré pour ensuite interpréter les réponses. Ce dispositif électrophysiologique permet un contrôle en temps réel du système nerveux avec la possibilité d'adapter le geste chirurgical pour éviter toute complication neurologique irréversible chez le patient. Afin de se former à cette technique, les chirurgiens ont d'abord suivis des cours théoriques et l'observation des techniques au bloc opératoire. Cependant, pour s'entraîner aux techniques et observer les réponses de conduction électriques de la moelle épinière et des nerfs périphériques provoqué par les gestes réalisés, il est nécessaire de reproduire cette chirurgie en conditions réelles sur un organisme vivant entier. Pour cela, nous utilisons des porcelets d'environ 40kg (3/4mois) provenant d'un élevage accrédité à l'expérimentation animale. Les gestes effectués sur ces animaux sont conformément la règle des 3R

: Réduire, Remplacer et Raffiner.

En effet, comme mentionné précédemment le recours à l'animal est justifié dans la mesure où il est nécessaire d'avoir un organisme vivant pour reproduire la chirurgie et observer les réponses nerveuses en conditions réelles. Le choix du modèle porcin est due au fait que celui-ci est physiologiquement le plus transposable chez l'humain. Les porcelets sont tranquilisés pour limiter l'angoisse lié au transfert de l'animalerie au bloc opératoire. Ensuite, ils sont anesthésiés dans les mêmes conditions que l'humain avec une couverture anesthésique et analgésique chimique adaptée et contrôlée en per-opératoire. Ceci, dans le but de réduire au maximum la souffrance et douleur de l'animal. En effet, du personnel qualifié suit la profondeur de l'anesthésie et la qualité de l'analgésie durant toute l'intervention. A la fin de la chirurgie, l'animal n'est pas réveillé, il est euthanasié par surdosage d'anesthésique provoquant un arrêt respiratoire suivi d'un arrêt cardiaque ; sans douleur pour l'animal. Le nombre total d'animaux utilisés prévu pour ce Diplôme d'Université est de 20 pour 5 ans (1 porcelet pour 5 chirurgiens). Ceci a été calculé de sorte à réduire au maximum l'effectif tout en ayant un confort de travail lors des travaux pratiques. Ce nombre sera revu à la baisse et uniquement à la baisse en fonction du nombre de chirurgiens inscrits à cette formation.

17882 Les fistules digestives sont des pathologies digestives mutilantes définies par une communication anormale entre deux viscères (fistule interne) ou un viscère et la peau (fistule externe). Les principales causes de fistules digestives sont la maladie de Crohn (MC) et la chirurgie digestive.

Les fistules ano-périnéales (FAP) représentent plus de la moitié des fistules digestives dans la MC et sont responsables d'une altération marquée de la qualité de vie.

Malgré l'évolution des thérapeutiques, leur prise en charge demeure complexe, et s'associe à une morbidité marquée.

Il existe une forte attente quant au développement de nouvelles thérapeutiques pour la prise en charge de ces fistules.

Des premiers résultats ont montré l'intérêt des vésicules extra-cellulaires (VEs) dans la prise en charge mini-invasive et régénérative des fistules digestive.

L'objectif de notre travail est d'évaluer un nouveau traitement innovant des fistules ano-périnéale en injectant directement à travers l'orifice externe des vésicules extra-cellulaires.

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

1) Remplacer :

Le modèle rat vivant est le modèle permettant une transposition la plus proche et simple des fistules digestives ano-

périnéales.

A ce jour, le modèle animal vivant ne peut être remplacé, car il n'existe pas de modèle ex vivo permettant de reproduire la dynamique des très nombreux mécanismes physiopathologiques mis en jeu dans la cicatrisation des FAP.

2) Réduire :

Après des essais préalables sur simulateur, une première phase est prévue avec 40 rats pour évaluer cette technique.

Au besoin et seulement en fonction des résultats, un deuxième groupe de 40 rats est envisagé après modification de la technique.

Le nombre total de rats nécessaires à la réalisation de ce projet est donc de 80 au maximum pour une durée de 4 ans.

3) Raffiner :

Pour éviter toute souffrance animale, les procédures seront réalisées sous anesthésie générale et analgésie.

Lors du suivi, une grille précise d'évaluation des points limites sera utilisée afin d'anticiper toute souffrance animale excessive.

Les rats seront évalués au minimum tous les deux jours pendant toute la durée de la phase expérimentale.

Dans le cas où le traitement serait à l'origine de douleurs visibles non soulagées par les antalgiques, de détresse ou de difficulté d'alimentation importante, le traitement sera interrompu et, si nécessaire, la mise à mort de l'animal sera anticipée.

Il s'agit de la première étude qui évalue l'impact du traitement par VEs dans la cicatrisation des fistules ano-périnéale.

Cette étude animale justifiera l'application humaine par la suite.

17883 La mise en œuvre de ce protocole vise la compréhension et l'identification de l'anatomie et de la fonction des circuits neuronaux impliqués dans la peur chez la souris. Les objectifs principaux de ce protocole sont triples : premièrement, l'utilisation de modèles comportementaux permettant l'étude de la peur (innée ou conditionnée) chez le rongeur vigile ; deuxièmement, l'identification et la manipulation des structures cérébrales et circuits neuronaux permettant l'expression et/ou l'inhibition des réponses comportementales de peur ; et troisièmement la caractérisation anatomique de ces circuits. Ces trois objectifs seront atteints grâce à l'utilisation de diverses technologies de pointes que sont l'implantation de divers matériels intracérébraux : (1) injections virales intracérébrales pour création de modèles contrôlés par optogénétique, (2) implantation d'optrodes pour activation ou inhibition optogénétique et enregistrements électrophysiologiques et (3) implantation de lentilles pour imagerie intra-vitale. L'utilisation d'un modèle comportemental chez le rongeur permettant l'étude des structures cérébrales et circuits neuronaux impliqués dans les réponses de peur nous permettra à terme le développement de nouvelles cibles thérapeutiques pour des pathologies telles que l'anxiété ou le syndrome de stress post-traumatique.

Justification de la règle des 3R.

Remplacer : ce protocole nécessite l'utilisation d'animaux. En effet, l'identification des structures cérébrales et des circuits neuronaux impliqués au cours de la peur nécessite l'utilisation d'un cerveau intact chez l'animal vigile. Des méthodes in vivo telles que la culture cellulaire ou bien les coupes de cerveau ne contiennent pas les connections neurones qui sont le sujet de nos travaux. Il n'existe donc pas de méthodes alternatives.

Réduire : le nombre d'animaux a été calculé par l'estimation de la variance observée avec ce type de données permettant d'atteindre une signification statistique. Ce nombre est de 15 souris par groupe mais par expérience 8 animaux par groupe sont suffisants et seront utilisés, soit un total de 2112 animaux pour la réalisation de ce protocole.

Raffiner : Afin de réduire au minimum la souffrance des animaux, nous appliquons systématiquement un traitement antalgique avant et trois jours suivant les actes chirurgicaux qui sont réalisées sous anesthésie gazeuse. L'évaluation du poids de l'animal est effectuée de façon journalière à partir du moment où il est isolé en cage individuelle et rentre dans la phase expérimentale. Ces mesures ont lieu lors de la manipulation journalière des animaux en même temps que la vérification de l'état général de l'animal. Ces mesures sont consignées dans un cahier d'expérience prévu à cet effet. Pour identifier les dommages et contraintes subis par l'animal, nous avons définis des points limites au nombre de 5. Ces cinq aspects évalués au cours de nos expériences nous aident à déterminer un point final à l'expérimentation. Chaque critère est évalué de 0 à 3 et si un critère obtient le score maximal, ceci induit un arrêt immédiat de l'expérience.

17884 Les anticancéreux, tels que l'ifosfamide (IFO) ou le cyclophosphamide (CPM), sont des drogues qui agissent en ciblant directement l'ADN des cellules tumorales pour conduire à leur mort. Ils appartiennent à la familles des oxazaphosphorines.

Ils sont indiqués dans de nombreux traitements contre différents types de tumeurs (sarcomes, lymphome, cancer du sein, etc) et sont associés à d'autres drogues anticancéreuses dans la prise en charge des patients. Cependant, l'utilisation du CPM et de l'IFO est limité par leur toxicité dans les protocoles à haute dose.

Notre équipe a d'abord travaillé à la réduction des effets indésirables de l'IFO en modifiant chimiquement la structure de la molécule d'IFO (composés X-IFO). Ces modifications n'affectent pas l'efficacité anti-tumorale et permettent de limiter la production inévitable de métabolites toxiques responsables des effets indésirables (toxicité cérébrale et rénale). Par la suite, nous avons également démontré que l'IFO possèdent des propriétés immunomodulatrices mais aussi, à travers des études préliminaires, que des composés X-IFO se comporteraient de la même manière que le CPM et l'IFO et possèderaient également des propriétés immunomodulatrices en plus de la réduction des effets indésirables.

Durant la dernière décennie, la résistance aux traitements anticancéreux a été largement étudiée. Il a été décrit que certaines tumeurs échappent à la surveillance du système immunitaire par différents mécanismes, le rendant ainsi inefficace dans son rôle de défense et d'élimination des cellules cancéreuses.

Le nouveau paradigme du traitement du cancer n'est plus de s'attaquer frontalement aux tumeurs mais de réveiller et éduquer le système immunitaire à les reconnaître et les détruire. Ainsi, nos composés X-IFO présenteraient un double avantage selon la dose à laquelle ils seraient utilisés : à forte dose et associés à d'autres médicaments tels que l'immunothérapie ils permettraient l'élimination des tumeurs et à faible dose ils permettraient d'éduquer le système immunitaire à reconnaître les cellules cancéreuses.

Nous souhaiterions approfondir l'étude de l'effet immunomodulateur de nos composés X-IFO tant sur l'immunité innée que spécifique, seul ou en association avec l'immunothérapie.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'efficacité antitumorale, la toxicité et le potentiel immunomodulateur de deux formes galéniques de X-IFO (forme libre ou forme liposomale), seul ou en association avec un inhibiteur de la protéine PD1 (programmed cell death protein 1 ; aPD1), protéine impliquée dans l'inhibition du système immunitaire dans son activité anticancéreuse.

L'influence de la diversité des cellules impliquées dans l'immunité ainsi que de l'environnement moléculaire et les nombreux signaux immunitaires, nous obligent à travailler sur un modèle in vivo. Ce modèle est indispensable dans le domaine de l'immunologie et de la cancérologie puisqu'il n'existe pas de méthode alternative traduisant fidèlement les interactions entre le système immunitaire dans sa globalité et les cellules cancéreuses.

La quantité de souris nécessaire pour cette étude a été déterminée afin de réduire au maximum le nombre d'animaux tout en n'impactant pas la significativité de nos résultats via des tests non paramétriques (minimisation des effectifs via un logiciel statistique tout en maintenant la puissance des tests). Le nombre maximal de souris prévues pour ce projet est ainsi de 750. L'ensemble des procédures sera réalisé de façon à éviter tout stress et toute douleur à l'animal. De plus, une

observation, une pesée et une mesure de la taille des tumeurs seront très régulièrement menées afin de prévoir et de diagnostiquer au plus tôt les points limites et les critères d'interruptions du projet. Les contraintes pour les animaux seront celles de l'injection des cellules tumorales (par voie sous-cutanée après application d'un anesthésique local) et l'administration des anticancéreux (injection unique par voie intraveineuse après l'application d'un anesthésique local).

L'établissement des propriétés immunomodulatrices du X-IFO et la preuve de son efficacité antitumorale nous permettra alors de déboucher sur une nouvelle approche thérapeutique chez l'Homme alliant réduction des toxicités induites par les traitements conventionnels et ouverture vers de nouvelles aires thérapeutiques.

17885 Ce projet correspond à une recherche intégrée dans le domaine de la Biologie et de la Santé. Son objectif est de développer des stratégies thérapeutiques innovantes pour le traitement des barrières inflammées ou pour évaluer le passage des médicaments à travers une barrière saine. Nous nous intéressons à six barrières particulièrement importantes d'un point de vue thérapeutique : l'épithélium digestif, nasal, pulmonaire, hépatique et aux barrières cutanée et hémato-encéphalique (BHE). Pour réaliser ces objectifs, différents types de transporteurs (nanovecteurs) de médicaments seront développés, puis testés sur des modèles cellulaires avant d'envisager leur utilisation en expérimentation animale.

Thème A : Evaluation du ciblage du système nerveux central

Nous évaluerons la capacité des nanovecteurs à cibler la BHE saine afin de définir leur distribution cérébrale et d'évaluer les quantités de médicament retrouvé dans le cerveau. Ces nanovecteurs seront aussi étudiés dans le cadre d'un modèle de tumeur cérébrale afin d'étudier leur distribution chez l'animal et d'évaluer leur efficacité antitumorale.

Nombre de rats Sprague Dawley : 1 500

Nombre de rats Fisher 344 : 1 884

Nombre de souris SWISS : 2 140

Thème B : Evaluation de la perméabilité cutanée et traitement de la dermatite

Ce travail vise 3 objectifs principaux i) évaluer le passage des nanovecteurs à travers la barrière cutanée saine ou inflammée, ii) étudier le devenir des nanovecteurs biodégradables ou non lorsqu'ils sont appliqués sur la peau inflammée ou non et iii) évaluer la tolérance cutanée après application des nanovecteurs sur la peau saine ou inflammée.

Nombre de rats Sprague Dawley, Wistar : 2 360

Nombre de souris SWISS : 5 560

Thème C : Evaluation de l'intérêt des nanovecteurs de type lipoprotéines pour faciliter le passage des médicaments à travers l'intestin sain ou traiter une barrière digestive inflammée (traitement des Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI)).

Dans le cas de l'intestin sain, les nanovecteurs seront utilisés pour favoriser le passage de grosses molécules (macromolécules) qui normalement ne franchissent pas la barrière. Cette stratégie permettrait d'administrer par voie orale des molécules qui normalement sont injectées. Dans le cas de la barrière digestive inflammée, l'objectif sera de cibler les zones inflammées de la barrière et de concentrer le traitement spécifiquement à ces zones (meilleure efficacité/moins d'effets secondaires).

Nombre de rats Sprague Dawley, Wistar : 3 210

Nombre de souris SWISS, BALB/c : 5 130

Thème D : Evaluation de la biodisponibilité des macromolécules administrées par voie nasale et pulmonaire. Les nanovecteurs seront utilisés pour améliorer le passage de grosses molécules à travers la barrière pulmonaire ou nasale afin d'administrer par ces voies des médicaments qui normalement sont injectés.

Nombre de rats Sprague Dawley, Wistar : 1 012

Nombre de souris SWISS : 350

Thème E : Evaluation de l'innocuité de molécules chimiques exogènes sur la fonction hépatique.

L'objectif vise à comprendre les mécanismes de modulation du fonctionnement hépatique contrôlés par ces molécules (d'origine synthétique ou naturelle), via l'étude des enzymes du métabolisme et des protéines de transport hépatique. Il s'agit notamment de développer des outils pour la sécurité du médicament. Elles sont menées in vitro sur des cultures primaires de cellules hépatocytaires de différentes espèces incluant le Rat et l'Homme. Ce sont des modèles alternatifs à l'expérimentation animale et permettent de diminuer le nombre d'animaux utilisés en Pharmacotoxicologie.

Nombre de rats Sprague Dawley, Wistar, Lewis : 812

Ce projet utilise deux espèces animales afin de vérifier la conservation des propriétés des nanovecteurs après administration à différentes espèces.

Raffinement: Ce projet sera réalisé par du personnel qualifié s'assurant du bien-être animal. L'hébergement collectif permettra les interactions sociales. Les cages seront enrichies avec des carrés de cellulose pour permettre la nidification. L'intensité de la lumière sera adaptée afin d'éviter un état de stress supplémentaire chez les animaux. Les tests seront réalisés dans des salles séparées des salles d'hébergement pour ne pas perturber le comportement des autres animaux. Un suivi du poids et de l'état du pelage des souris sera réalisé deux fois par semaine pour évaluer leur bien-être. Lors des injections, une attention particulière sera portée à l'apparition d'un comportement douloureux qui sera traité par un antidouleur adapté. En cas de douleur persistante ou de plaies ou de dégradation accrue du pelage ou d'anomalies comportementales sévères, les animaux seront retirés de l'expérience et pris en charge pour diminuer leurs souffrances.

Réduction : Compte tenu de la variabilité inter-individuelle des différents modèles et des lignées, le nombre d'animaux dans chaque groupe a été réduit à un minimum ce qui devrait éviter la répétition des expériences. Les analyses in vitro seront réalisées en amont de l'expérimentation animale afin de ne sélectionner que les formulations optimales. Les analyses chimiques, histologiques et immunologiques seront conduites de façon à répondre aux interrogations posées afin de réduire le nombre d'animaux.

Remplacement : Même si des études in vitro permettront de diminuer le nombre de formulations à tester et de comprendre les mécanismes impliqués, l'évaluation chez l'animal reste une étape incontournable pour évaluer la tolérance, l'efficacité ou la distribution tissulaire.

Au total sur 5 ans : Rats: 10 778 ; Souris: 13 180

Il s'agit du nombre maximal d'animaux pour ce projet sachant que si l'optimisation des formulations n'est pas obtenue, elles ne seront pas testées sur une seconde espèce. Les thématiques ne seront pas explorées de façon identique car leur avancée dépendra des projets financés sur les 5 prochaines années. Il est très probable qu'à l'issue des 5 années, le nombre d'animaux inclus soit très inférieur à ce nombre.

17886 La tDCS (Stimulation transcrânienne par courant continu) est une technique de stimulation cérébrale non invasive dont le potentiel thérapeutique est de plus en plus étudié pour le traitement de plusieurs pathologies psychiatriques, notamment de la dépression, de l'addiction et de la douleur. Les recherches cliniques réalisées à l'heure actuelle ont montré un effet antidépresseur de cette nouvelle stratégie thérapeutique chez des patients souffrant de dépression résistante aux traitements. Cependant, et afin d'améliorer ces effets bénéfiques chez l'Homme et d'utiliser cette méthode en routine, il est nécessaire de comprendre les mécanismes cellulaires sous-jacents. Pour ce faire, des recherches translationnelles doivent être développées.

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre projet. Il vise à caractériser les effets comportementaux de la tDCS chez l'animal et les modifications neurobiologiques associées. Nous utiliserons cette technique sur des souris saines des modèles murins de pathologies psychiatriques (Dépression, addiction) et de douleur chronique (Estimation de 1 620 souris/an sur une période de 5 ans, voir point 3. 4. 10 pour détails) en prenant en compte la loi des 3R : Réduire, Raffiner, Remplacer. Ainsi, nous allons réduire le nombre d'animaux par groupe au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement valides (en comportement N=10-15 par groupe), Nous allons veiller à employer une méthodologie en adéquation avec le bien être animal et nous veillerons, le cas

échéant, à la notion de points limites. Nos études allant de la neurobiologie au comportement, il n'est pas possible actuellement d'utiliser une méthode alternative pour ces expériences.

Nous évaluerons les effets des stimulations en utilisant des tests comportementaux classiques (anxiété, dépression, douleur, consommation de drogues). Parallèlement, des études neuroanatomiques, immunohistochimiques et biochimiques seront entreprises afin d'identifier les mécanismes d'action de la tDCS.

Une attention particulière sera portée sur les circuits hypothalamiques qui seront disséqués par des approches anatomiques novatrices (Techniques de traçages, de pharmacogénétiques DREADD).

17887 Afin d'établir des priorités pour la conservation du Gecko vert de Manapany (*Phelsuma inexpectata*), un projet de recherche vise l'acquisition de connaissances nécessaires pour estimer l'état de conservation des populations résiduelles et leur risque d'extinction.

Le projet global comprend l'étude 1) de la répartition de l'espèce, 2) des caractéristiques démographiques (conditions corporelles, effectifs, survies, densités, structure en âge et en sexe...) et 3) de la structure et diversité génétiques de ses populations.

La procédure expérimentale présentée ici permettra d'acquérir, à partir des individus issus de 12 à 20 populations naturelles, des données biométriques et génétiques nécessaires à la création d'outils puis à l'élaboration d'une stratégie de conservation cohérente à l'échelle de l'aire de répartition de l'espèce.

La procédure expérimentale a été réfléchi sur la base des 3R, afin de réduire au minimum la manipulation des individus sauvages tout en optimisant les données récoltées dans le cadre du projet et pour toutes études ultérieures.

L'impossibilité de remplacement de l'étude des individus de *P. inexpectata* par une autre espèce est inhérente aux questions scientifiques posées. L'utilisation d'individus capturés en milieu naturel est nécessaire pour définir l'état de santé des populations et formuler des priorités de conservation. La capture et manipulation d'individus (prélèvement direct d'ADN) issus de populations à conserver est indispensable pour l'obtention des indicateurs et estimateurs attendus pour répondre à l'objectif final.

Une étude de répartition de l'espèce sera menée dans un premier temps afin d'identifier les populations les plus pertinentes pour étudier l'impact de la fragmentation de l'habitat et de la taille des petites populations sur la diversité et structure génétique des populations. Afin d'avoir une approche de conservation pertinente à l'échelle de l'aire de répartition de l'espèce, de 12 à 20 populations pourront être étudiées (choisies en fonction de critères d'accessibilité, habitat, taille de population, sexe ratio ...). De 20 à 30 individus seront étudiés par population (pour un total de 450 individus maximum) afin d'estimer la distribution des variables morphologiques et obtenir un niveau suffisant de polymorphisme génétique en intra-site, et également assurer la robustesse de tests statistiques en vue de la comparaison entre populations (tests paramétriques, test de normalité des données, conditions d'utilisation des logiciels...). Les résultats pourront ainsi être comparés à ceux obtenus pour une espèce proche.

La méthode de travail a été conçue de manière à minimiser l'impact de la manipulation sur les individus (durée maximale de 15 min. par spécimen) et à respecter et favoriser le bien-être animal (par l'identification de points limites, possibilité d'arrêt et/ou de prises en charge des individus pour réduire fatigue et/ou stress). Les procédures de capture, prises de mesures biométriques et prélèvements de tissu seront effectuées dans des conditions permettant de minimiser le stress et la douleur éventuelle. Le prélèvement de tissus caudal en vue de l'obtention de tissus musculaires est la méthode la plus largement utilisée dans ce type d'étude chez les geckos.

Enfin, il est envisagé d'optimiser la valorisation et la transférabilité de l'expérience acquise par la rédaction d'un rapport de retour d'expérience du protocole pour des études futures.

17888 L'athérosclérose est une pathologie largement répandue dans les pays développés. Elle se caractérise par le développement de plaques composées de lipides au niveau de la paroi interne des artères. Ce dépôt constitue alors l'athérome qui pourra progressivement obstruer les vaisseaux.

Une des complications difficilement prévisible de cette pathologie est la rupture de plaque (la paroi interne se rompt, provoquant une exposition soudaine des composants nécrotiques et inflammatoires de la plaque aux flux sanguin et au système de coagulation) pouvant engendrer une brusque oblitération totale d'un vaisseau et des dégâts irréversibles en empêchant la libre circulation sanguine. L'identification des plaques « fragiles » n'est pas aujourd'hui possible en clinique, il est donc impossible de prévoir ni de stratifier le risque de rupture de plaque. Nous avons dans un projet précédent développé des marqueurs d'imagerie de plaque fragile pouvant être à terme utilisés dans le diagnostic chez l'homme. Pour cela nous avons synthétisé des candidats traceurs d'imagerie que nous avons caractérisés sur souris saines. L'étape suivante consiste à vérifier que ces traceurs vont bien se fixer à la plaque.

Pour cela, nous travaillerons sur un modèle de souris qui développe des plaques d'athérome : les souris LDLr KO qui n'expriment pas un récepteur du « mauvais cholestérol ». Ces animaux doivent être soumis à un régime enrichi en graisse pendant 12 semaines pour développer des plaques. C'est l'objet de la présente demande d'autorisation. Ce projet utilisera 30 souris LDLr KO.

La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R. Le travail préliminaire mené in vitro et sur souris saines permet de réduire le nombre d'animaux. L'étude préalable des molécules d'intérêt in vitro permet de s'affranchir de l'utilisation d'animaux non justifiée et participe au raffinement de l'étude. Il n'est pas possible de remplacer l'utilisation d'animaux pour ce projet visant à étudier le trajet dans l'organisme d'une molécule administrée par voie veineuse.

17889 A l'heure actuelle, l'arrêt cardiaque touche 50 000 personnes chaque année en France. Malgré les progrès scientifiques dans le domaine cardiovasculaire et une amélioration de la prise en charge hospitalière de ces patients, le taux de survie sans séquelle neurologique est très faible de l'ordre de 5%. La compréhension des mécanismes physiologiques mis en cause dans cette pathologie d'ischémie-reperfusion cardiovasculaire représente un domaine de recherche de fort intérêt scientifique.

Dans le présent projet, nous nous intéresserons plus particulièrement au rôle de la « high mobility group box 1 » (HMGB1). Cette protéine est impliquée dans une multitude de processus tels que l'inflammation, la migration cellulaire et comporte plusieurs récepteurs sur lesquels elle peut se lier. Nous utiliserons donc des inhibiteurs pharmacologiques d'un récepteur spécifique à HMGB1 ainsi qu'un inhibiteur de relargage lymphocytaire afin d'évaluer la réponse inflammatoire après un arrêt cardiaque chez le lapin.

Pour conduire cette étude, nous avons cherché à réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaire. L'utilisation d'un modèle animal est indispensable dans la recherche en physiopathologie. La compréhension des mécanismes du syndrome post-arrêt cardiaque ne peut se faire in vitro, compte tenu de la complexité des interactions inter-organes. A toute les étapes susceptibles d'être à l'origine d'une douleur, les animaux feront l'objet d'une anesthésie ou d'une analgésie avec des antalgiques puissants. Nous utiliserons ainsi 70 lapins sur une période de 3 ans. Le milieu des animaux sera enrichi par des bâtonnets en bois.

17890 Les cellules du rein assurent des fonctions cruciales qui permettent de filtrer le sang afin d'éliminer les déchets de l'organisme dans les urines. La filtration rénale dépend de l'intégrité de cellules hautement spécialisées nommées podocytes. Ces cellules sont lésées chez 90% des patients souffrant de maladies rénales et leur incapacité à se régénérer efficacement conduit à terme au développement de l'insuffisance rénale terminale.

Les podocytes sont décrits comme des cellules incapables de proliférer et ayant une capacité de régénération très limitée suite à une lésion ou en conditions normales. Cependant, des études montrent que l'augmentation transitoire de l'expression de la protéine pT dans le rein de souris adultes induit une régénération efficace des podocytes. Ces résultats montrent que les podocytes possèdent une capacité de régénération latente, un potentiel révélé par l'activation d'une voie de signalisation faisant intervenir la protéine pT.

Dans ce projet, nous allons utiliser une lignée de souris génétiquement modifiées permettant d'augmenter l'expression de pT de manière transitoire chez la souris adulte afin de déterminer si la stimulation de la régénération du rein induite par pT permet de ralentir ou de stopper la progression de l'insuffisance rénale chronique. La réalisation de ce projet fournira des connaissances cruciales pour le développement de stratégies thérapeutiques permettant de traiter les patients atteints d'insuffisance rénale.

Pour répondre à nos objectifs, nous allons utiliser un modèle d'insuffisance rénale, et nous allons augmenter l'expression de pT, de manière transitoire, chez ces souris. Une amélioration de la fonction rénale dans ce contexte sera évaluée par analyse de la fonction de filtration du rein tout au long de l'expérimentation, ainsi que par des analyses histologiques.

Le modèle d'insuffisance rénale utilisé ici est associé à une élévation du taux de protéines dans les urines reflétant une dysfonction de la filtration rénale dès 5 jours après l'injection d'une toxine podocytaire. Cette lésion est réversible, la fonction de filtration rénale redevient normale 5 semaines après l'injection, et l'injection simple de cette toxine podocytaire représente donc un modèle d'insuffisance rénale aiguë également observée chez des patients suite à un calcul rénal, à la prise de médicaments tels que des anti-cancéreux ou des anti-inflammatoires, ou à une intervention chirurgicale.

Par ailleurs, nous allons également évaluer l'impact de la stimulation de la régénération du rein sur la progression et l'initiation de l'insuffisance rénale chronique. Dans ce but, nous allons réaliser deux lésions successives avec la toxine podocytaire afin de mettre en place le modèle d'insuffisance rénale chronique.

3Rs :

1) Remplacement

: Suite à ce projet, des analyses moléculaires complémentaires seront mises en place sur des cellules en culture in vitro. Cependant, bien que les techniques de culture cellulaire aient fortement évoluées, les études in vitro ne permettent pas d'étudier des processus biologiques complexes. Seuls les modèles animaux permettent d'aborder des questions relatives au fonctionnement d'un organe dans son ensemble. L'approche de médecine régénérative décrite ici qui vise à traiter l'insuffisance rénale met en jeu des processus physiologiques complexes qui ne peuvent pas être appréhendés sur des cellules en culture. En effet, l'insuffisance rénale chronique ainsi que le processus de régénération des organes sont des mécanismes qui résultent d'interactions fines entre plusieurs types cellulaires au sein de l'organe, ainsi qu'entre différentes zones de l'organe. Aussi, par définition, cet objectif scientifique nécessite le recours à l'expérimentation animale.

2) Réduction :

En tenant compte des exigences de réduction imposées par la législation, nous avons choisi d'utiliser un nombre minimum de souris par groupe expérimental qui nous permet d'obtenir des résultats statistiquement exploitables. Par ailleurs, dans un objectif de réduction, la procédure 3 ne sera réalisée que si la procédure 2 montre un effet bénéfique sur l'initiation et/ou la progression de l'insuffisance rénale aiguë. Ainsi, pour réaliser ce projet sur 5 ans, nous utiliserons un maximum de 240 animaux.

3) Raffinement

: L'évolution de la pathologie rénale sera surveillée étroitement dès le début des procédures. Aussi, pour limiter l'impact de nos expérimentations sur le bien-être des animaux, et conformément à la réglementation éthique en vigueur qui impose de mettre en place les mesures permettant d'augmenter autant que possible le bien-être des animaux de laboratoire, nous avons mis en place un suivi strict et régulier de la douleur et du stress potentiellement engendrés par les procédures expérimentales décrites dans ce projet grâce à l'utilisation d'une grille de score adaptée (annexe 1). En outre, le comportement, l'apparence, et des signes cliniques associés à une altération du bien-être des animaux tels qu'une perte de poids ou la présence de sang dans les urines, seront régulièrement surveillés.

17891 Les traitements pharmaceutiques pour les troubles psychiatriques tels que la dépression, les troubles de stress post-traumatiques et anxieux sont suboptimaux : les anxiolytiques n'ont qu'un effet palliatif et les antidépresseurs nécessitent des semaines, voire des mois pour induire leurs effets bénéfiques et laissent une grande proportion (jusqu'à 50%) de patients insensibles à leurs effets. En dépit de plusieurs décennies d'investissements dans la découverte de nouveaux traitements, aucun concept ou cible radicalement nouveau n'ont émergé au cours des 60 dernières années. Toutes les nouvelles stratégies développées, s'ils ont pu montrer une réduction de certains effets indésirables, ont tous échoué à améliorer de manière significative l'efficacité des traitements. Ces troubles sont la cause principale d'invalidité et de coûts liés à la santé dans le monde, il est donc urgent de reconsidérer les approches scientifiques et méthodologiques dans la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques en neuropsychiatrie.

Au-delà des effets biologiques et cellulaires des antidépresseurs, il reste à caractériser comment le traitement de l'information reçue par le cerveau et les neurones est modifié par les antidépresseurs et laquelle de ces modifications permet in fine de générer la guérison.

Ainsi, nous avons pour but dans ce projet d'étudier de quelle manière un traitement antidépresseur peut modifier le traitement de l'information et les codes générés par les neurones (défini comme « propriétés computationnelles » dans le titre). Pour cela, nous nous concentrerons sur une structure cérébrale particulière l'hippocampe. En effet, il a été montré que les antidépresseurs pouvaient modifier certains processus cellulaires dans l'hippocampe, sans jamais avoir identifié quelle répercussion cela pouvait avoir sur le traitement de l'information et l'activité des neurones de l'hippocampe.

Dans ce but, nous utiliserons un système d'imagerie calcique ultra miniaturisé et portatif permettant de visualiser chez la souris l'activité de neurones de cette structure quand celle-ci sera en train d'explorer de nouveaux environnements, et que de nouvelles informations parviendront aux cerveaux et donc à l'hippocampe. Ces expériences permettront de tester la capacité de ces neurones de l'hippocampe à différencier diverses expériences, une capacité considérée comme cruciale pour s'adapter au stress et guérir de la dépression.

Des souris seront donc traitées avec un antidépresseur ou un placebo pendant quatre semaines et habituées à explorer un environnement. Ensuite à la fin du traitement, ces souris seront soumises à de nouveaux environnements qui offriront des variations plus ou moins grandes entre eux de manière à analyser comment ces variations environnementales sont traitées et encodées par les neurones de l'hippocampe en fonction du traitement reçu (antidépresseurs ou placebo).

Ces résultats serviront de base à la compréhension des effets des antidépresseurs dans l'hippocampe et comment ils peuvent sous-tendre une meilleure adaptation au stress.

Cette étude nécessitera un total de 104 souris adultes maximum (mâles et femelles en nombre égal).

Cette étude respectera les 3R :

Raffinement : Les conditions d'élevage des animaux seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu (cabanons en plexiglass et/ou carton, tubes). Les injections/implantations intracérébrales se feront sous anesthésie générale par des chercheurs formés et expérimentés. Les animaux recevront un traitement analgésique avant l'intervention chirurgicale, un traitement anti-inflammatoire après l'intervention et 24 heures après. Si nécessaire un traitement antibiotique sera administré. Chaque animal est placé sur une couverture thermorégulée pour éviter toute hypothermie. Les cornées sont protégées de la déshydratation. L'anesthésie gazeuse est ici privilégiée pour mieux contrôler la profondeur d'anesthésie et pour une meilleure récupération post-opératoire. Une surveillance post-opératoire d'une semaine est réalisée pour suivre chaque souris et intervenir si nécessaire.

Remplacement : aucune méthode alternative in vitro n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée.

Réduction : Les effectifs sont calculés de manière à permettre une réduction des effectifs optimisée permettant de suivre les recommandations éthiques d'obtenir une puissance statistique de 0.8 avec

un minimum d'animaux. Le nombre d'animaux pourra être réduit en fonction des résultats et notamment de l'efficacité de l'implantation (maximum 104 souris avec un taux de succès attendu de 50% d'après la société du système et notre expérience ; minimum 52 souris avec un taux de succès de 100%)

17892 En élevage, l'ajustement de l'alimentation est un facteur majeur pour atteindre les objectifs de production. Dans le cadre de niveaux de productions élevés, les chèvres laitières reçoivent des rations à haute valeur nutritive (riches en concentrés et pauvres en fourrages). Pour la majorité des animaux, ces rations sont bien supportées, mais certains y sont sensibles et peuvent développer des pathologies telle que l'acidose ruminale subaiguë (ARSA). Cette dernière se définit par des périodes de baisse du pH ruminal (augmentation d'acidité) en-dessous du seuil critique (pH=6) qui se répètent plus ou moins fréquemment dans la journée. Elle est due à une production excessive d'acides gras volatils par rapport aux capacités d'absorption par la paroi ruminale et de neutralisation par l'apport de substances tampon via la salive. Ce dérèglement fermentaire peut provoquer des irrégularités dans l'ingestion de la ration alimentaire et dans la production laitière, et s'accompagner de pathologies plus ou moins graves (acidose aiguë, sensibilité aux infections mammaires, ...). Pour contrer ces phénomènes, une substance tampon telle que le bicarbonate est ajoutée dans les rations acidogènes pour limiter l'acidose des animaux. Chez les vaches laitières, il a été néanmoins montré que l'oxyde de magnésium était plus efficace que le bicarbonate. L'objectif de notre étude est d'étudier les effets de ce complément alimentaire à base d'oxyde de magnésium à différentes doses chez la chèvre laitière sur le comportement d'ingestion et sur la digestion des animaux ainsi que sur la production laitière.

L'expérimentation se fera sur trente-deux chèvres laitières (quatre lots de huit animaux chacun répartis en 2 cases collectives par lot) en début ou milieu de lactation, période plus propice au développement d'une acidose subaiguë. Nous comparerons les effets du complément à base d'oxyde de magnésium à différentes doses à une ration sans supplémentation ou avec du bicarbonate. Nous mesurerons le comportement d'ingestion, le pH du rumen, ainsi que la production laitière des chèvres. Afin d'expliquer les effets de ces substances, nous analyserons le microbiote ruminal (ensemble des micro-organismes présents dans le rumen) des animaux ainsi que le métabolome (ensemble des métabolites présents au sein d'un organisme). Les prélèvements ruminiaux nécessitent l'utilisation d'une sonde œsophagienne. Ils seront réalisés par un personnel expérimenté formé et habilité afin de ne pas provoquer de blessure, et d'éviter toute douleur ou stress supérieurs à ceux provoqués par le prélèvement en lui-même. Le fait d'étudier le microbiote et le métabolome justifie de travailler sur des animaux et la volonté d'étendre l'utilisation de ce complément sur la chèvre laitière justifie notre choix de modèle animal. Afin d'obtenir des résultats statistiquement exploitables, en raison des difficultés techniques de la procédure d'intubation, de la capacité d'hébergement limitée, du faible nombre de prélèvements, de la forte variabilité inter-individus du comportement alimentaire des animaux et de la nature des analyses effectuées, un minimum de 8 animaux par lot a été calculé comme étant nécessaire. Les chèvres laitières sont maintenues en groupe et habituées au dispositif et aux régimes. Un suivi de l'ingestion, du comportement des animaux et de leur poids vif seront des paramètres pour l'identification de points limites. Nos résultats contribueront à limiter cette pathologie courante dans la filière caprine. La durée totale du projet est de 10 semaines.

17893 Le projet s'inscrit dans la recherche de nouvelles approches thérapeutiques antibactériens afin de lutter contre les infections bactériennes qui, ayant acquis des résistances à de multiples antibiotiques, menace la santé humaine à grande échelle. La conception de molécules thérapeutiques innovantes est aujourd'hui devenue une urgence. Nous avons conçu de telles molécules avec une action antibactérienne de par leur capacité à être transportées dans les bactéries à Gram négatif et à inhiber la réplication de l'ADN par l'engagement d'une nouvelle cible thérapeutique. Dans les étapes menant à une application chez l'homme des tests d'innocuité chez la souris sont nécessaires. Des souris saines seront traitées avec des peptides anti-bactériens. Ces peptides seront administrés aux animaux par différentes voies (injection, gavage). Les effets des

peptides sur le système immunitaire (nombre de globules blancs et marqueurs de l'inflammation) seront ensuite évalués. Remplacement : La souris de laboratoire se prête le mieux aux tests d'innocuité de futurs médicaments étant donné sa physiologie proche de l'homme et la facilité d'étude. A l'heure actuelle, une approche alternative aux expériences chez l'animal qui reproduit la complexité des différents organes n'existe pas. La souris recevra des injections de peptides anti-bactériens et son bien-être sera examiné.

Raffinement : Les expérimentations sont effectuées sur des souris par un personnel compétent. Le bien être des souris est évalué quotidiennement par une grille d'évaluation, prenant en compte de multiples paramètres. Des points limites prédictifs ont été déterminés afin d'interrompre les procédures limitant ainsi la douleur animale à son minimum. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux dans un environnement enrichi comprenant des nids et frisure de carton.

Réduction : Nous utiliserons les connaissances rapportées dans la littérature et acquises par les laboratoires, notamment sur la sélection des peptides thérapeutiques tout comme sur leurs doses à utiliser. Le nombre total des souris pour ce projet est de 360 souris. Le nombre d'animaux est le minimum permettant une analyse de nos données par des tests statistiques de type ANOVA/Bonferroni.

17894 La rétine est un tissu neuro-épithélial tapissant le fond interne de l'œil et organisé en différentes couches cellulaires qui sont essentielles pour la vision. Parmi ces couches, les photorécepteurs et l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) sont à l'origine de la transformation du stimulus lumineux en influx nerveux. Ces deux types cellulaires sont étroitement liés physiquement et fonctionnellement.

La maladie juvénile héréditaire de Stargardt est due à des effets toxiques de la lumière et affecte 1-5 personne sur 10000. Nous avons récemment démontré l'efficacité de petites molécules synthétiques dans la protection des photorécepteurs et de l'EPR en culture dans des conditions pathologiques. Ces résultats sont très prometteurs mais l'étude sur l'animal est une étape préalable aux essais cliniques. Il s'agit donc de développer un projet transrationnel chez la souris.

Notre objectif était d'évaluer le potentiel thérapeutique d'une nouvelle molécule candidate dans le traitement d'une lignée de souris modèle de la maladie de Stargardt. Nous avons mesuré donc la perte des photorécepteurs induite par la lumière et la protection apportée par cette molécule. Les travaux ont été publiés en juillet 2020.

Des dérivés de cette molécule doivent être maintenant évalués dans le but d'améliorer l'efficacité thérapeutique et la stabilité du principe actif. Notre projet prévoit une étude des voies d'administration alternatives à l'injection intraveineuse inadaptée au traitement chez l'homme. Nous déterminerons la pharmacocinétique des voies alternatives avec une formulation adaptée.

Cet avenant a pour but de prolonger d'un an le projet initial. Un traitement à court terme sera toujours réalisé avec les mêmes procédures. Quatre nouvelles procédures sont décrites pour le prélèvement sanguin en pharmacocinétique et les voies alternatives d'administration. L'étude des dérives moléculaires nécessitera 45 souris, la pharmacocinétique de la voie orale formulée se fera sur 48 souris, et la détermination de la dose efficace dans les différents modes d'administration demandera environ 80 souris. Au total ~180 souris seront nécessaires pour le traitement court.

Un traitement chronique a été envisagé dans la saisine v3 qui sera maintenu dans l'avenant. La dose optimale non toxique de principe actif sera administrée par la voie la plus efficace avec une fréquence préétablie en pharmacocinétique, ceci pendant 6 semaines. Des stress lumineux seront répétés à intervalle régulier dans les six semaines pour rendre compte de l'effet protecteur du composé. Puisque cette souris Abca4 accumule un marqueur pathogène, l'A2E, celui-ci pourra être un bon indicateur de la progression de la pathologie. Environ 60 souris seront expérimentées.

Pour respecter la règle des 3 R, le recours à la souris modèle est incontournable dans une perspective thérapeutique. Nous limiterons le nombre d'animaux utilisés pour les expériences au minimum nécessaire pour une évaluation statistique de l'effet du composé testé. En développant des procédures appropriées les moins invasives car dérivées de techniques cliniques considérées comme indolores en ophtalmologie humaine, nous éviterons les points limites, et l'observation régulière des animaux (prise alimentaire, hydrique, comportement social et activité circadienne) et

des mesures biologiques (poids, fonction visuelle) après chaque expérimentation permettra de juger de la nécessité d'interrompre l'expérimentation.

17895 Mots clés : ischémie-reperfusion cardiaque, anesthésiques

Objectifs du projet : Ce projet fait suite à deux précédents projets qui nous ont permis de déterminer un nouveau protocole anesthésique (anesthésie « fixe ») fiable et adapté à notre modèle d'ischémie-reperfusion cardiaque. Le but du présent projet est d'améliorer et optimiser ce protocole anesthésique et de vérifier la compatibilité d'un autre type d'anesthésie (« anesthésie gazeuse ») avec notre modèle murin d'ischémie-reperfusion cardiaque, dans l'optique de fournir une alternative dans le cadre de certains projets spécifiques.

Bénéfices escomptés : Il s'agit essentiellement de bénéfices à long terme. En effet, à l'issus du projet, si les résultats obtenus confortent nos hypothèses de départ, nous serons en mesure :

- 1) d'améliorer le réveil des animaux impliqués dans nos projets d'ischémie-reperfusion cardiaque (au sein du laboratoire)
- 2) de proposer un autre type d'anesthésique, adapté lui aussi à nos problématiques d'ischémie-reperfusion cardiaque, et présentant d'autres avantages : plus facilement modulable au cours du temps et donc plus sécurisant pour l'animal et l'expérimentateur,
- 3) Augmenter les connaissances scientifiques dans le domaine de l'anesthésie du rongeur dans le cadre de la réalisation d'actes chirurgicaux, en particulier cardiaques (valorisation/publication de l'ensemble des résultats obtenus sur nos trois derniers projets portant sur l'anesthésie)

Dommmages attendus :

Procédure 1 : les animaux seront soumis uniquement à une anesthésie « fixe » associée à un morphinique, impliquant l'injection de ces substances en sous-cutané puis de 2 injections d'un anesthésique local en sous-cutanées, pendant l'anesthésie générale.

En raison de la gravité (légère) de la procédure 1, les animaux sont maintenus en vie en fin d'expérimentation (sauf complication post-anesthésie ou contre-indication vétérinaire), pour être réutilisés dans d'autres projet ou dans le cadre du maintien des compétences du personnel (dans le respect de consignes de ré-utilisation des animaux), dans un souci de réduction du nombre d'animaux utilisés dans les protocoles expérimentaux.

Procédure 2 : après anesthésie (identique à la procédure 1) les animaux sont soumis à un acte chirurgical impliquant une thoracotomie, sous respirateur et sous anesthésie générale avec couverture analgésique. L'animal est réveillé (impliquant des soins post-opératoires adaptés). 24h plus tard, l'animal est de nouveau anesthésié (de manière identique à précédemment) pour permettre la mise à mort (pendant l'anesthésie) et le prélèvement du cœur.

Procédure 3 : après anesthésie « gazeuse » (associée à une injection sous-cutanée de morphinique), les animaux sont soumis au même protocole que dans la procédure 2

Les animaux des procédures 2 et 3 sont mis à mort pour permettre le prélèvement du cœur, nécessaire aux analyses.

Ce projet nécessite ainsi le recours à 72 animaux maximum.

Prise en compte des 3R :

Remplacement : Il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode alternative (notamment in vitro ou in silico) permettant de mimer ou prédire correctement la réponse d'un organisme entier à un protocole anesthésique (durée d'anesthésie, qualité du réveil), en particulier dans le cadre d'une chirurgie bien précise (ischémie-reperfusion cardiaque avec incidence sur la taille d'infarctus) et d'anesthésie encore peu utilisés.

Réduction : Le nombre d'animaux a été réduit au minimum nécessaire à l'obtention de résultats statistiquement exploitables, sur la base des résultats précédemment obtenus dans les mêmes conditions (tests de puissance).

La chronologie des procédures a été pensée de manière à réaliser des bilans d'étapes permettant alors la suspension de la suite du projet ou de certains tests/procédures en cas de résultats non concluants, évitant ainsi toute utilisation non pertinente/justifiée d'animaux.

Afin de réduire le nombre d'animaux, certains groupes d'étude ont été mutualisés avec d'autres projets en cours et pour lesquels les procédures expérimentales sont identiques.

De même, les animaux subissant une procédure légère sont amenés à être réutilisés, après rémission complète validée, dans des projets ultérieurs ou pour le maintien de compétences techniques (qui, sinon, auraient nécessité l'utilisation d'autres animaux), conformément aux consignes réglementaires de ré-utilisation des animaux. 24 animaux sont concernés.

Raffinement : Compte tenu des objectifs de l'étude, les soins post-opératoires et la surveillance (notamment la surveillance accrue du réveil) sont identiques aux deux précédents projets portant sur l'anesthésie du fait que les résultats doivent pouvoir être comparés entre eux.

Ce raffinement consiste en :

- Une couverture analgésique maximisée pour la chirurgie et le réveil post-opératoire (morphinique + anesthésique local)

- Une surveillance du réveil particulièrement renforcée pour la validation de notre hypothèse de départ : l'optimisation du protocole anesthésique envisagée ici doit permettre d'accélérer le réveil et d'en améliorer la qualité en réduisant notamment le délai de reprise spontanée d'alimentation et de boisson.

Une surveillance post-opératoire parfaitement adaptée à notre modèle chirurgical pour prévenir de manière précoce toute complication (critères d'observation et grille de score conçus à cet effet)

17896 La sclérose latérale amyotrophique est une maladie neurodégénérative de l'adulte pour laquelle nous ne disposons pas de molécule thérapeutique efficace. Les deux thérapeutiques existantes, le Riluzole et l'Edaravone, montrent en effet une efficacité modérée.

L'objectif de l'étude est d'évaluer l'effet métabolique et clinique d'un nouvel anticorps monoclonal dirigé contre la protéine CD38 sur un modèle murin de sclérose latérale amyotrophique.

Pour atteindre cet objectif, nous utiliserons des souris génétiquement modifiées porteuses d'une forme mutée du gène SOD1 codant la protéine superoxyde dismutase 1.

Les souris seront réparties en plusieurs groupes expérimentaux:

- un groupe 1 de 24 souris transgéniques traitées par la solution véhicule (contrôle 1)

- un groupe 2 de 18 souris transgéniques traitées avec un anticorps Isotype (contrôle 2)

- un groupe 3 de 48 souris transgéniques traitées avec l'anticorps B8 (15mg/Kg)

- un groupe 4 de 18 souris transgéniques traitées avec l'anticorps B8 (50mg/Kg)

soit, 108 souris au total.

Plusieurs éléments sont mis en oeuvre afin de suivre au mieux la règle des 3R:

- Remplacement : ce nouvel anticorps développé très récemment dans le cadre des pathologies neurodégénératives montre des effets très intéressants sur des modèles cellulaires. Aujourd'hui, nous souhaitons déterminer le bénéfice thérapeutique de cet anticorps in vivo en conduisant une étude comportementale sur des animaux.

- Réduction: sur la base d'une analyse statistique et de la bibliographie sur l'utilisation de ce modèle murin dans la SLA, le nombre de groupes de souris a été optimisé et le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum.

- Raffinement: l'enrichissement dans les cages d'hébergement sera systématique (Sizzle nest). Les animaux seront surveillés chaque jour pendant toutes les semaines de l'étude. Ils seront surveillés toutes les 30 min pendant 2h après injection de l'anticorps et des critères de point d'arrêt anticipé codifié. La prise en charge d'une douleur potentielle due au traitement conduira à un arrêt du traitement et à l'intervention d'un animalier en vue de réduire cette douleur.

17897 Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de décès dans le monde. Les principaux facteurs de risque des maladies cardiovasculaires sont l'hypertension artérielle, l'obésité, le diabète et l'hypercholestérolémie. Cette dernière est une maladie métabolique caractérisée par une augmentation du cholestérol dans le sang, et particulièrement par une augmentation du taux de cholestérol LDL. Dans 80% des cas d'hypercholestérolémie, l'origine est génétique. Pour les autres, l'origine est souvent associée à un mode de vie sédentaire et une alimentation peu équilibrée. De plus, de nombreux traitements médicamenteux ont montré qu'ils pouvaient induire une augmentation des taux de cholestérol (pilule contraceptive, diurétiques, ...). Dans le cadre de développement de nouveaux candidats médicaments, il est ainsi important de pouvoir définir l'effet de ces composés sur l'hypercholestérolémie.

Si les souris et les rats représentent les espèces les plus utilisées dans l'évaluation des maladies métaboliques, ils ne conviennent pas à l'évaluation des effets de candidats médicaments sur le métabolisme du cholestérol. La limitation majeure de ces modèles précliniques est l'absence du gène de la protéine de transport des esters de cholestérol (CETP) qui est essentielle à l'homéostasie du cholestérol chez les espèces supérieures. Ainsi, l'absence de ce gène chez les rats et les souris ne permet pas de mesurer de manière fiable l'effet d'une molécule candidate sur le profil lipidique et donc de déterminer son influence d'un point de vue cardio-vasculaire au sens large. Le hamster doré (ou hamster Syrien) représente le modèle animal de choix, puisqu'il est très proche de l'homme en termes d'homéostasie du cholestérol et du métabolisme des acides biliaires, mais surtout il exprime de façon constitutive la CETP.

C'est pourquoi cette espèce sera utilisée dans le cadre de ce projet.

Ces études sont réalisées après identification de candidats médicaments efficaces dans des indications diverses (métabolisme, cardiovasculaire, oncologie, neurologie, ...). Elles seront effectuées en cas d'alerte observée dans les études d'efficacité ou en fonction des connaissances sur la cible du candidat médicament (connaissance indiquant une association de la cible avec le métabolisme du cholestérol).

A l'heure actuelle, l'effet potentiel d'un composé sur l'homéostasie du cholestérol ne peut être évalué qu'après un traitement chronique chez l'animal car il résulte de l'intégration de toutes les interactions hormonales, inflammatoires et tissulaires impliquées dans le métabolisme lipidique. Une telle intégration n'existe pas pour des cellules ou organes isolés. Il n'y a donc pas à ce jour de méthodes *in vitro* pouvant se substituer totalement à l'approche *in vivo*.

L'objectif de ce projet est ainsi d'évaluer l'effet de candidats médicaments sur l'homéostasie du cholestérol. Les études seront réalisées par administration chronique (pouvant aller jusqu'à 14 jours) à des hamsters normo-lipidiques nourris avec un régime normal, afin d'évaluer les effets secondaires associés à de nouveaux candidats médicaments via des mesures biochimiques sur des échantillons sanguins et par des mesures d'engagement de cible dans les organes d'intérêt en fin d'étude (foie, muscle, cœur, cerveau, tumeur, . . .). Les volumes des échantillons sanguins prélevés respecteront les recommandations de respect de la volémie physiologique et temps de récupération nécessaire.

Enfin, les hamsters seront utilisés à l'âge adulte et seront hébergés en groupe dans des cages enrichies de cubes de bois, de matériaux de nidification et de litière adaptée. Tous ces éléments leur permettent d'exprimer leurs comportements naturels tels que le fouissage, l'exploration ou encore la nidification. Ils font l'objet d'une observation et d'un suivi quotidien par les pharmacologues et le personnel de zootechnie. Le prélèvement sanguin nécessaire à la conduite de l'étude sera réalisé sous anesthésie générale et analgésie locale afin de limiter tout stress ou douleur.

Afin de réduire le nombre d'animaux, l'effectif nécessaire par groupe a été prédéfini en collaboration avec le service biostatistiques et fixé à 10. Chaque étude prévoit entre 4 et 5 groupes (traitements et témoins) et 3 études sont envisagées pour la durée totale du projet (1 an). Ce projet prévoit l'utilisation au maximum de 150 hamsters au total.

17898 1. Contexte scientifique du projet

L'URP2 (urotensin II-related peptide 2) est une hormone peptidique découverte par notre équipe chez le poisson-zèbre en 2011. Des travaux récents, impliquant plusieurs équipes dont la nôtre, ont montré que cette hormone, produite principalement par certains neurones de la moelle épinière et du tronc cérébral, participe de manière importante à la mise en place de l'axe vertébral au cours du développement. En effet, l'invalidation génétique de l'un de ses récepteurs appelé UTR3, spécifiquement exprimé dans les muscles, conduit à des poissons présentant un phénotype de type « scoliotique ». Ce phénotype apparaît dès la période larvaire et tend à s'aggraver avec l'âge.

Jusqu'à présent l'existence de l'URP2 n'avait été rapportée que chez les poissons. En revanche son absence était bien attestée chez les mammifères. Il était donc généralement admis que l'URP2 était un peptide propre aux poissons. Nous avons récemment remis en cause cette conception en démontrant l'existence de l'URP2 chez les amphibiens. Cette découverte indiquait donc que l'URP2 était vraisemblablement déjà présent chez le dernier ancêtre commun de

tous les vertébrés osseux, il y a plus de 400 millions d'années. Elle suggérait que son absence chez les vertébrés était certainement le résultat d'une perte secondaire.

2. Objectifs du projet

Le projet que nous souhaitons développer aujourd'hui vise à déterminer si les fonctions de l'URP2 dans la mise en place de l'axe vertébral initialement mises en évidence chez les poissons sont conservées chez les amphibiens. Pour cela nous souhaitons réaliser son invalidation, par la méthode CrispR Cas9, ainsi que celle de son récepteur UTR3.

3. Balance dommages/bénéfices

Pour cette étude, nous avons choisi d'utiliser l'espèce *Xenopus laevis* comme modèle expérimental, car c'est le modèle amphibien actuellement le mieux connu et une espèce non en danger. Le xénope est un modèle reconnu pour les études de biologie depuis de nombreuses décennies, notamment pour l'étude des processus développementaux. Ses avantages comme modèle expérimental sont nombreux. Pour notre étude, le recours au xénope est rendu nécessaire par le fait c'est chez cette espèce que, pour la première fois chez un tétrapode, l'existence d'un système URP2-ergique a été identifié. Elle constitue donc un modèle idéal pour tester la conservation des fonctions de ce système des poissons aux tétrapodes

Si l'invalidation des gènes présentés est conservée parmi les vertébrés nous nous attendons à ce que ces invalidations conduisent au développement d'animaux présentant des altérations plus ou moins importantes de l'axe vertébral.

Dans le but de ne pas générer des animaux qui pourraient souffrir de ces malformations à l'âge adulte, le projet ne vise pas à établir une lignée génétiquement modifiée fondatrice knock-out pour les gènes invalidés, à savoir URP2 et UTR3, mais à étudier sur la génération F0 le phénotype induit par l'invalidation de gènes.

4. Conformité avec la règle des 3R

Dans le but de satisfaire la règle des 3 R

Remplacer. L'objectif de notre projet est de mieux comprendre les fonctions des peptides URPs. Pour cela nous avons décidé d'appliquer une stratégie génétique de perte de fonction par la technique de Crisp-Cas9. Notre but est donc de générer des animaux mutants invalidés pour les gènes du peptide UTR2 et de son récepteur putatif UTR3. Les études préalables menées chez le poisson-zèbre ont montré que la voie de signalisation du récepteur UTR3 est un déterminant important de la mise en place de l'axe vertébral. Or cette mise en place est un processus complexe, hautement intégré qu'il n'est pas possible de reconstituer ou perturber dans un simple système cellulaire. Il nécessite donc l'utilisation d'animaux en cours de développement. De plus, nous utilisons des stades précoces pour une partie des expériences.

Réduire. Le projet implique l'utilisation de 20 femelles adultes, pour la production des oeufs. Elles seront réutilisables après un repos de quatre mois. Elles seront injectées afin d'obtenir des oeufs (PROCEDURE 1) que nous féconderons par fécondation in vitro (FIV, non soumis à procédure). Des oeufs fécondés seront injectés avec un mélange permettant d'invalider les gènes visés (URP2 ou UTR3) ou avec un mélange ne générant pas de modifications (groupe contrôle).

Nous réduirons le nombre d'animaux en expérimentation avec un phénotype dommageable. En effet seuls 50 têtards par condition seront élevés (150 têtards par expérience, avec trois expériences réalisées soit 450 têtards en tout pour le projet) entre les jours 6 et 33 post fécondation (PROCEDURE 2). Après photographie et films de leur nage les 450 têtards seront euthanasiés au jour 33. Enfin 3)

Raffiner. Pour assurer le bien-être des animaux utilisés, les animaux font l'objet d'un suivi particulier. Pour les adultes injectés nous les suivons les jours suivant l'injection de l'hormone permettant la stimulation de la ponte pour éviter toute réaction non désirée (existence de points limites listés dans la DAP). Les animaux ayant subi l'invalidation sont suivis tout au long de leur développement jusqu'au stade 55 (jour 33). L'ensemble des animaux est observé quotidiennement (J1-J5) par les soigneurs et les expérimentateurs jusqu'au stade 45 (J5). Tout animal présentant un signe (point limite) évoquant une pathologie sera euthanasié.

Dans le cadre de la production d'animaux génétiquement modifiées, afin de ne pas mettre en élevage des animaux présentant un phénotype dommageable, les animaux font l'objet d'un suivi poussé par les expérimentateurs pendant les 5 premiers jours de développement (stades embryonnaires non soumis à une autorisation. Le phénotype scoliotique ne sera pas considéré comme dommageable car attendu. Tout animal présentant un autre point limite (maigreur, œdème, hémorragie, léthargie) sera euthanasié.

17899 La résistance à la chimiothérapie ou à la radiothérapie est fréquente en cancérologie. Une tumeur peut être résistante aux médicaments ou peut développer, au cours du traitement, différents mécanismes de résistance. Dans ce contexte, la protéine Tau semble être une cible de choix. Exprimée majoritairement au niveau neuronal, une littérature abondante a cependant montré une augmentation de son expression dans plusieurs types de cancer et son association à une résistance acquise aux molécules thérapeutiques. Nos récents travaux ont démontré que Tau est impliqué dans les mécanismes de réparation de l'ADN et dans la régulation du stress oxydant dans des cellules du cancer du sein. Ces effets pourraient avoir un lien direct avec la résistance à certains traitements anti-cancéreux tel que la chimiothérapie ou radiothérapie. Une inhibition in vitro de Tau par shRNA augmente la sensibilité des cellules tumorales aux traitements. Basé sur nos résultats précédents, nous nous proposons d'évaluer le potentiel thérapeutique de l'inhibition de la protéine Tau dans la (re)sensibilisation à la chimiothérapie/radiothérapie chez la souris. La règle des 3Rs a été prise en compte dans l'élaboration du présent protocole : 1) Raffinement : dans tous les protocoles, l'ensemble des procédures expérimentales sera réalisé en limitant au maximum (durée et intensité) toute douleur et/ou stress pour les animaux utilisés par la mise en place de période d'accoutumance et l'emploi d'anesthésiants et antalgiques adaptés. Les animaux seront hébergés avec un enrichissement du milieu. L'évaluation de la souffrance sera basée sur un suivi quotidien (attitude corporelle, aspect du pelage, poids corporel) de sorte à administrer un traitement anti-inflammatoire/antalgique supplémentaire, ou sortir un animal de l'étude en cas d'atteinte des points limites établis. 2) Réduction : Pour chacun des groupes constitués, le nombre d'animaux a été réduit au maximum tout en permettant l'obtention de résultats satisfaisant (différences statistiquement observables). 3) Remplacement : basé sur des observations in vivo, l'utilisation d'animaux vivants pour établir le rôle de Tau dans la sensibilisation aux thérapies anti-tumorales revêt donc un caractère de stricte nécessité afin d'envisager une application chez l'Homme. Le nombre total d'animaux concernant les procédures de notre unité sur les 5 ans à venir est estimé à 378 souris. Cette utilisation maximise les données obtenues de chaque animal, ce qui peut limiter ou éviter l'utilisation subséquente d'animaux supplémentaires, et ce, sans pour autant compromettre le bien-être animal. Les animaux seront suivis précisément pour chaque protocole, pour lesquels des points limites adaptés ont été définis. Toute souffrance, angoisse ou comportement inhabituel sera pris en charge par des approches appropriées. Les animaux présentant un des points limite spécifié pour chaque approche expérimentale sera sacrifié dans une salle dédiée ; le tout en lien avec le responsable du bien-être animal.

17900 Une plaie est considérée comme chronique lorsqu'elle ne présente aucune tendance à la cicatrisation après 4 à 12 semaines, malgré un traitement local approprié.

La prise en charge d'une plaie chronique est devenue un défi thérapeutique majeur dans le monde occidental et ce problème ne fera que s'aggraver avec l'incidence croissante des causes de l'apparition des plaies chroniques telles que le diabète, l'obésité et les troubles vasculaires.

Une plaie chronique, du fait de la destruction de la barrière cutanée, permet la fuite des fluides corporels tels que l'eau et la lymphe... Le management de ces sécrétions, nommées « exsudats », est un véritable challenge pour le corps médical qui est amené à utiliser des pansements complexes (propriétés absorbantes, adhésives...), souvent très onéreux et dont le changement doit être très régulier. De plus chaque changement de pansement est douloureux pour le patient.

Nous développons un pansement pour le traitement des plaies chroniques. Ce pansement est composé de deux couches. La mise en œuvre du pansement consiste en l'application de la première couche à la surface du tissu de la plaie qui assure un ancrage dans le tissu permettant une très bonne tenue dans le temps. La deuxième couche du produit permet de renforcer le pansement en surface afin qu'il apporte une protection supplémentaire et empêche la contamination par l'extérieur.

Ce pansement est comparable à une croûte qui a une très bonne tenue dans le temps et empêche la sortie d'exsudats qui gênent la cicatrisation. La cicatrisation qui s'effectue sous le pansement peut alors se réaliser dans des conditions idéales. Le pansement tombe une fois que l'épithélialisation de la plaie est complète.

Nous avons aujourd'hui sélectionné 2 formules de pansement pour leur bonnes propriétés mécaniques. Afin de poursuivre le développement de notre dispositif médical, nous devons passer par une étape de tests précliniques ; indispensables à l'évaluation d'un dispositif médical avant le passage aux tests cliniques chez l'Homme. Selon la Règle des 3R, IDans ce cas, le « remplacement » des animaux dans cette études n'est pas envisageable

Le but de cette étude préclinique est de déterminer l'efficacité de 2 formules de pansement liquide nouvelle génération développées par notre laboratoire (comparativement à un pansement technique utilisé couramment) dans le traitement de plaies chroniques et de les comparer au standard.

Pour cette étude préclinique nous avons choisi d'utiliser un modèle animal couramment utilisé en expérimentation animale dans le domaine de la plaie chronique : la plaie ischémique de l'oreille chez le lapin.

Pour cela nous utiliserons 10 lapins de 2,5kg chez qui, l'une des oreilles sera rendue ischémique en ligaturant 2 des 3 artères à la base de l'oreille. Nous regarderons alors l'évolution des plaies induites sur l'oreille ischémique VS sur l'oreille saine en comparant 3 solutions de pansements. En utilisant chaque animal comme son propre témoin, nous réduisons le nombre d'animaux utilisés.

Les plaies seront réalisées à l'aide d'un Punch à biopsie stérile de 6mm de diamètre. Les plaies seront suivies au cours du temps et des prélèvements histologiques seront effectués à différents stades de la cicatrisation. Afin de limiter la douleur ressentie, les animaux seront anesthésiés profondément et localement au cours de la procédure opératoire. Ils recevront également un anti inflammatoire non stéroïdien quotidiennement durant les 3 premiers jours puis en cas de besoin les jours suivants. Le suivi très régulier des animaux permettra de déceler rapidement une quelconque souffrance. En cas de douleur intense, l'animal sera mis à mort.

Afin d'assurer aux animaux de bonnes conditions d'hébergement, leur environnement est enrichi d'une structure pour se cacher et monter dessus, de jeux à faire rouler, de bois à rongeur.

17901 Les maladies chroniques du foie représentent la principale cause de développement du carcinome hépatocellulaire et sont associées au syndrome métabolique (surpoids, diabète, obésité, hypertension, dyslipidémie). Le spectre de ces complications hépatiques (NAFLD : Non Alcoholic Fatty Liver Disease) vont d'une stéatose simple (foie gras), à la stéatohépatite (Non Alcoholic Steato Hepatitis: NASH), puis à la fibrose, voire la cirrhose et à l'hépatocarcinome. Malgré l'importance

clinique de ces maladies chroniques du foie, aucun traitement pharmacologique efficace n'est actuellement disponible.

La mise en place d'une inflammation à bas bruit dans le foie joue un rôle crucial dans le développement des maladies chroniques dans cet organe. Notre équipe de recherche s'intéresse à la protéine kinase SYK, qui joue un rôle central dans la signalisation intracellulaire au cours des réponses inflammatoires médiées en outre par les macrophages.

Nos données préliminaires montrent que l'expression hépatique de SYK est fortement augmentée avec l'inflammation hépatique et corrèle avec les caractéristiques de la NAFLD (stéatose, inflammation et souffrance hépatique) chez les patients obèses et dans nos modèles murins de stéatohépatite. L'objectif de ce projet est d'évaluer le potentiel thérapeutique d'inhibiteurs de la protéine kinase SYK au cours de la stéatohépatite.

Pour satisfaire au remplacement, nous réaliserons des études préliminaires in vitro sur des lignées cellulaires. Cependant, il nous est nécessaire de réaliser des études in vivo car les études in vitro ne permettent pas de reproduire les interactions complexes qui existent entre les différents organes et entre les différents types tissulaires.

Pour satisfaire à la réduction, nous utiliserons un nombre d'animaux aussi faible que possible. L'application de tests statistiques nous permettra de réduire le nombre d'animaux au minimum nécessaire à l'obtention de résultats significatifs et exploitables. Nous prévoyons d'utiliser 506 souris sauvages C57BL/6 et 120 souris Db/Db (ou Db/+) sur une période de 5 ans soit un nombre total d'animaux de 626.

Pour satisfaire au raffinement, nous serons particulièrement attentifs à tout changement physique ou de comportement. Leur bien-être sera scrupuleusement pris en compte dans toutes les procédures en termes de conditions d'élevage (température, hygrométrie), d'hébergement (présence de tige en coton et d'igloo dans les cages). Le suivi sanitaire quotidien assuré par les animaliers auquel s'ajoutent les visites régulières des expérimentateurs (au moins une fois par semaine en fonction des procédures) nous permettra de détecter précocement tout signe de stress ou de douleur et d'appliquer les points limites que nous avons définis pour chaque procédure.

17902 Les forces mécaniques appelées « contraintes » sont des forces physiques que les cellules peuvent « sentir » et qui ont un impact sur leur prolifération et migration. Elles sont omniprésentes en biologie et sont maintenant bien reconnues comme parmi les acteurs majeurs favorisant le développement de la plupart des cancers. Il est donc important de mieux les comprendre pour traiter les patients atteints de cancer. Il existe trois types de contraintes : le cisaillement, la tension et la compression. Les contraintes de cisaillement sont liées au passage de fluides entre les cellules ou dans les vaisseaux sanguins. Les contraintes de tension arrivent lorsque les cellules sont étirées ou quand elles adhèrent à leur environnement ; elles sont actuellement bien étudiées et ont été associées à l'augmentation de la prolifération et de la migration des cellules cancéreuses. Les contraintes de compression apparaissent lors de la croissance des cellules dans un espace limité. Les cellules se retrouvent confinées et serrées contre une matrice souvent rigide. En 1829, J. Récamier un précurseur dans l'étude des contraintes compressives sur les cancers, avait imaginé un dispositif de bandeau visant à comprimer mécaniquement des tumeurs du sein. Il avait montré que ces contraintes peuvent diminuer la croissance des masses tumorales mammaires dans certains cas ou l'augmenter.

Comprimer une cellule tumorale in vivo peut donc soit favoriser ou ralentir la croissance de la tumeur. Certaines thérapies actuelles visant à diminuer la compression tumorale pourraient avoir des effets délétères. A l'inverse dans certains cas, il faudrait comprimer les tumeurs. Comprendre les déterminants de ces phénomènes est nécessaire pour mieux traiter les tumeurs.

Nous avons choisi d'étudier ces phénomènes dans le cancer du pancréas car les contraintes compressives y sont très fortes. Ce cancer est aussi l'un des plus agressifs ; son pronostic vital est faible. Dans ce contexte, ce projet met en place un modèle de compression mécanique des tumeurs chez la souris et étudie l'impact de ces contraintes sur les cellules pancréatiques. Alliant compétences physiques et biologiques, il vise à étudier l'impact de la compression mécanique dans

un modèle de cancer du pancréas. Nous avons créé une méthode afin de compresser des tumeurs pancréatiques en utilisant un dispositif imprimé en 3D comprimant une tumeur à l'aide d'une vis micrométrique. Cette compression, de l'ordre du kPa, sera calibrée à l'aide d'un capteur de force. Ces tumeurs compressées seront ensuite soumises à des agents chimiothérapeutiques afin d'étudier les capacités prolifératives, invasives, les mutations engendrées et la réponse de l'environnement tumoral.

Seuls les modèles murins nous permettront de comprendre comment la compression favorise ou restreint la progression tumorale pancréatique.

La combinaison des facteurs mécaniques et mutationnels associées ou non aux traitements chimiothérapeutiques n'a encore jamais été étudiée sur le cancer du pancréas. Ce projet ouvrira des voies pour une potentielle forme mécanique de traitement du cancer, et aidera à concevoir de nouvelles thérapies combinées des cancers pancréatiques ou autres types de cancers actuellement pas étudié.

Ce projet comporte une expérimentation sur 1200 animaux. Nous travaillons dans le respect de la règle des 3R. 1- Réduire: Les groupes d'animaux sont prévus afin de permettre des analyses statistiques concluantes et éviter les duplications d'expériences. Nous prélevons le maximum de données et d'organes par souris que nous partageons avec des collaborateurs au niveau d'une banque d'échantillons. Le nombre d'animaux nécessaire sera affiné en fonction de la puissance statistique obtenue. 2- Raffiner: Nous utilisons des techniques d'imagerie de pointe afin de raffiner nos expérimentations et le suivi des points limite. 3- Remplacer: Nous créerons des lignées cellulaires à partir des animaux pour modéliser les conditions in vitro à l'aide de co-cultures.

17903 La dermatite atopique, encore appelée eczéma atopique, est une des maladies les plus fréquentes de l'enfant qui peut apparaître dès les premiers mois de la vie.

C'est une maladie inflammatoire chronique de la peau. Elle débute le plus souvent vers l'âge de trois mois, mais peut également s'observer dès les premiers jours de la vie. Chez le nourrisson les lésions de la peau s'observent sur les joues et le menton, les cuisses, les bras et l'abdomen.

Les lésions évoluent progressivement ou simultanément sous la forme de rougeurs, de démangeaisons, de vésicules puis de croûtes.

L'origine de cette pathologie est principalement allergique.

Il n'existe pas de traitement curatif efficace à ce jour. Les traitements utilisés sont symptomatiques et permettent de réduire les signes cliniques.

Il est donc important d'avoir un modèle préclinique pertinent permettant de tester l'efficacité de nouvelles molécules thérapeutiques. Il est indispensable de tester ces molécules dans ce modèle pour plusieurs raisons :

- Il n'existe pas de modèle in vitro de dermatite atopique pouvant remplacer complètement la peau en tant que tissu biologique vivant. Il existe cependant des modèles in vitro qui permettent d'effectuer un premier criblage d'efficacité de molécules, mais cette efficacité doit ensuite être confirmée chez l'animal.

- Ces modèles in vitro ne permettent pas de tester des produits thérapeutiques ou des dispositifs médicaux destinés à être appliqués sur la peau (voie dermique / topique)

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

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

Il est prévu d'utiliser 500 souris sur une période de 5 ans pour permettre l'évaluation de l'efficacité de molécules pharmaceutiques ayant une indication thérapeutique dans le traitement la dermatite atopique.

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

- Remplacement des animaux d'expérience : L'utilisation du modèle animal de dermatite atopique ne sera utilisé qu'en dernier recours après des tests préalables de criblage et d'efficacité in vitro.
- Réduction des animaux: Le design de l'étude étant un plan d'expérience contrôlé en mesures répétées, le nombre d'animaux est réduit à 8 animaux par groupe.
- Raffinement : Evaluation de points finaux tous les jours (poids, état d'hydratation, comportement de l'animal, état des lésions induites), enrichissement du milieu dans les cages.

(igloo, coton et bûchette de bois).

Afin de minimiser le potentiel de souffrance et/ou de détresse chez les animaux, les points limites établis sont les suivants :

- Défaut d'alimentation et/ou de boisson sur une période de 24 à 48h se traduisant par un amaigrissement et une déshydratation ;
- Perte de poids >20 % du poids normal maintenue sur 72h ;
- Hypothermie persistante, décelée par un animal froid au toucher et réticent à bouger ;
- Difficulté respiratoire, avec augmentation du rythme respiratoire ;
- Plaie nécrosée, purulente ou exsudative
- Complication sur le site d'application de la molécule topique

En cas de dépassement, les animaux seront euthanasiés.

17904 Les bronchopneumopathies chroniques obstructives (BPCO) ont une incidence en constante augmentation ce qui en fait la 3ème cause de mortalité dans le monde en 2016 (OMS). Le tabac est à l'origine d'environ 80% des cas de BPCO, mais les facteurs de risques sont multiples (pollution de l'air extérieur et intérieur ou l'asthme). Les BPCO sont caractérisées par une diminution progressive et irréversible des capacités respiratoires associée à une réponse inflammatoire chronique. Elles sont à l'origine d'obstruction des voies respiratoires et d'emphysème, une destruction du parenchyme pulmonaire et une perte de son élasticité. Les traitements actuels ne peuvent que ralentir l'évolution de la maladie à l'aide d'une prise en charge multidisciplinaire (arrêt tabac, réhabilitation respiratoire) associée à des molécules non-spécifiques (bronchodilatateurs et corticoïdes). Ces dernières années, de gros progrès ont été faits dans la compréhension de la réponse immunitaire et il est évident aujourd'hui que le système immunitaire, qui est le principal acteur dans les maladies inflammatoires, est une cible prometteuse. Les études d'immunothérapies ciblant des cytokines ou chimiokines pro-inflammatoires n'ont pour l'instant montré que peu ou pas d'effet thérapeutique. Les nouvelles stratégies d'immunothérapies cherchent à améliorer l'effet anti-inflammatoire des traitements en limitant les effets secondaires. Ces approches vont cibler des populations cellulaires ou des mécanismes immunitaires spécifiques de l'organe pathologique. Parmi ces populations, les macrophages alvéolaires et les neutrophiles sont les piliers de la chronicité de la maladie. De nouveaux récepteurs à la surface de ces cellules ont été identifiés comme ayant un rôle dans la modulation de leur fonction inflammatoire. Nous aimerions tester différentes molécules capables d'activer l'un de ces récepteurs et analyser les effets engendrés par cette activation dans différents modèles animaux de bronchopneumopathies chroniques obstructives. Ce type d'étude ciblant le système immunitaire nécessite une preuve d'efficacité in vivo dans des modèles précliniques car à l'heure actuelle aucun système ne permet d'étudier l'ensemble du système immunitaire in vitro, c'est pourquoi nous voulons tester ces thérapies chez la souris. Le nombre maximal d'animaux utilisés sera de 2810 souris (répartis sur 4 modèles différents, selon 4 axes par modèle, et 5 groupes par axe) pour combiner un nombre réduit d'animaux avec une pertinence statistique.

Le projet a été pensé pour répondre à des besoins scientifiques tout en adoptant un comportement responsable en matière d'expérimentation animale (Règle des 3R). Ces traitements à évaluer dans les BPCO ont déjà démontrés des résultats prometteurs in vitro et dans d'autres modèles d'inflammation chez la souris (colites). Le nombre d'animaux est réduit par une mutualisation des groupes contrôles lorsque c'est possible, et il est limité au strict nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement fiables. Pour le bien-être des animaux, une étape d'acclimatation de 5 jours

minimum sera respectée avant inclusion dans des protocoles expérimentaux. Le suivi des animaux sera quotidien et la gestion de la douleur maîtrisée le plus adéquatement possible afin d'apporter les soins nécessaires le plus rapidement aux animaux. Pour limiter le stress et l'inconfort, les animaux sont maintenus dans des cages ventilées dans un cycle jour/nuit de 12h/12h avec un accès à l'eau et à la nourriture à volonté ainsi qu'un nombre maximum de 5 animaux par cage et des brindilles de papier pour s'enfouir et se cacher. Enfin des points limites ont été mis en place afin de réagir rapidement en cas d'inefficacité des traitements ou de souffrances animales.

17905 Ce projet couvre l'ensemble des études très précoces réalisées sur l'ensemble des candidats médicaments de notre recherche, études pour lesquelles il n'existe pas d'alternative, validée scientifiquement, éthiquement et réglementairement, à l'utilisation d'animaux. Ces études sont réalisées conformément aux principes éthiques. Au cours du développement de tout nouveau médicament, des études sont requises par les autorités pour évaluer sa sécurité d'utilisation chez l'Homme, rechercher les mécanismes liés à une toxicité éventuelle et proposer des mesures d'accompagnement pour renforcer le bénéfice/risque à utiliser ces médicaments. La réglementation impose l'utilisation d'espèces rongeurs et non-rongeurs. Les études incluses dans ce projet ont une durée de 1j à 4 semaines selon le mode d'administration prévu chez l'Homme. Les voies d'administrations (orale ou parentérale) sont celles prévues chez l'Homme. Des examens réguliers, à l'aide de matériel adapté à chaque espèce, incluent observations cliniques, prise de température corporelle (mesure rectale), prélèvements de sang pour vérifier les paramètres hématobiochimiques et vérifier le passage du médicament dans le sang, examen cardiologique (ECG ou mesure de pression artérielle généralement par télémétrie non invasive), collecte d'urines (via des entonnoirs placés sous les unités d'hébergement), examen ophtalmologique.

Pour mener à bien ces études, il peut être nécessaire de manipuler les animaux sur une très courte durée ; les animaux sont régulièrement entraînés à ces manipulations et des procédures de renforcement positifs (récompenses, jeux) sont régulièrement mises en œuvre. Certains animaux peuvent être ré-utilisés si les conditions sont conformes à la réglementation. Les autres animaux sont sacrifiés en fin d'étude pour identifier les organes qui pourraient être l'objet d'effets adverses. Le nombre d'animaux utilisé dans ces études préliminaires est inférieur à celui des études réglementaires et est choisi en fonction de la variabilité des paramètres examinés afin de permettre d'atteindre les objectifs de l'étude. Le degré de sévérité de ces études ne doit pas dépasser le stade modéré : des grilles de points- limites sont appliquées, sous contrôle d'un vétérinaire, afin de prendre des décisions très rapidement chaque fois que cela s'avère nécessaire et éviter ainsi toute souffrance inutile.

Le bénéfice apporté par ce projet est de permettre d'optimiser le développement de candidats médicaments en évaluant très précocement leur toxicité éventuelle (réduction ainsi du nombre d'études réglementaires) et en ajustant au mieux les doses et le schéma expérimental des études réglementaires (diminution des contraintes pour l'animal dans les études réglementaires). Selon le nombre de candidats médicaments qui atteindront l'étape de validation « in vivo », chaque année, un maximum de 1000 rongeurs et 50 chiens sera utilisé (dont des animaux ré-utilisés).

17906 Les ruminants ont un système digestif particulier, à plusieurs compartiments (rumen, réseau, feuillet, caillette). Le rumen leur permet de valoriser les parois cellulaires végétales (fibres), par l'action des microorganismes présents dans le rumen, qui dégradent ces fibres par fermentation anaérobie et produisent des acides gras volatils (AGV), valorisables par l'animal comme source d'énergie. La biomasse microbienne est aussi utilisée comme source de protéines par l'animal. A l'inverse, les microorganismes peuvent parfois détruire certains nutriments présents dans la ration, alors qu'ils sont essentiels à l'animal. Ils sont également à l'origine de la production de méthane, gaz impliqué dans l'effet de serre. Cette 1ère étape de fermentation ruminale du processus digestif, est donc essentielle et impactante à plusieurs niveaux, mais le fonctionnement des microorganismes impliqués reste encore peu connu et fait toujours l'objet de nombreuses recherches. Dans un contexte de raréfaction des ressources naturelles et de préoccupations écologiques, il est aujourd'hui fondamental d'améliorer nos connaissances sur l'évolution des

composants de la ration au sein du rumen, afin d'optimiser l'efficacité alimentaire globale des animaux et de minimiser les pertes et les rejets au sein de l'environnement.

L'objectif de ce projet est d'affiner nos connaissances sur le fonctionnement du rumen, et de permettre l'évaluation scientifique du devenir et de l'effet sur l'environnement ruminal de différents constituants de ration, dans des environnements métaboliques standards ou perturbés (acidose, stress oxydant).

Le contenu ruminal est un milieu très complexe. A ce jour, la composition précise du « cocktail » de microorganismes présents dans le rumen n'est pas connue et donc non reproductible par culture 100% in vitro. Les études in vitro sont possibles, et font partie intégrante de ce projet, mais nécessitent quand même des prélèvements de jus de rumen pour apporter les microorganismes. De ce fait, le recours à l'animal (utilisé en tant que tel ou comme donneur de jus de rumen) reste indispensable. Le modèle animal retenu dans ce projet est la vache adulte équipée d'une canule ruminale. Cette canule, une fois posée, permet un accès direct au rumen sans douleur ni stress pour l'animal, quel que soit le nombre de manipulations. Plusieurs essais peuvent donc être réalisés sur le même animal, ce qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés. L'accès direct au rumen via la canule permet d'évaluer, par des méthodes standardisées, la fermentescibilité et la valeur nutritionnelle des différents composants de la ration, l'effet des matières premières, des minéraux, et/ou des additifs sur l'activité fermentaire et la production de produits de fermentation (acides gras volatils, ammoniac, méthane. . .), et l'effet des composants de la ration sur l'évolution du pH, paramètre essentiel pilotant l'activité des microorganismes et participant au confort digestif de l'animal.

Certaines procédures du projet intègrent des prises de sang, afin de pouvoir doser des indicateurs sanguins ou mesurer l'absorption de nutriments d'intérêt. L'utilisation de cathéters posés en début d'essai et retirés en fin d'essai pour la réalisation de ces prises de sang permet de limiter le nombre de piqûres et le stress pour l'animal. Certains de ces indicateurs (notamment celui permettant d'évaluer la croissance de la biomasse microbienne) se retrouvant dans les urines, certaines procédures intègrent des prélèvements urinaires. Ils sont alors réalisés par sonde, car la maîtrise du moment de prélèvement est indispensable.

Ces vaches canulées au niveau du rumen sont aussi utilisées comme "donneuses" de jus de rumen pour alimenter des fermenteurs in vitro. Ce type de dispositif permet d'évaluer simultanément un grand nombre de composants et de réduire le nombre d'animaux qui auraient été nécessaires si ces tests avaient dû être réalisés in vivo. Il permet aussi de tester l'effet de composants de rations ou d'additifs à des doses potentiellement toxiques, sans aucun risque pour l'animal (uniquement donneur de jus). Ces méthodes in vitro ne peuvent cependant pas totalement se substituer aux méthodes in vivo (directement sur les animaux), car elles n'intègrent pas les effets potentiels de la rumination, de la salivation, de la taille du rumen et de capacité d'adaptation des microorganismes in vivo.

Ce projet prévoit l'utilisation de 16 vaches maximum, sur 5 ans. Pour chaque procédure expérimentale, le nombre d'animaux utilisé est réduit à son minimum (2 à 8). Il existe une variabilité inter individuelle importante chez les ruminants, et l'utilisation de dispositifs expérimentaux en carré latin (tous les traitements sont testés sur tous les animaux), tels que prévus dans ce projet permet d'éliminer cet effet « individu » et de réduire le nombre d'animaux nécessaires pour détecter des effets statistiquement significatifs.

Une fois canulées, les vaches sont utilisées dans plusieurs procédures, avec l'accord du vétérinaire en charge du suivi des animaux. Pendant les périodes de mesures, elles sont bloquées, et disposent d'un matelas en caoutchouc pour se coucher. Un temps de repos obligatoire, en stabulation libre ou sur aire paillée, entre 2 utilisations est prévu. Des points limites sont également définis dans chaque procédure, tels que l'apparition de boiterie ou de refus pendant l'alimentation. S'ils sont atteints, l'animal est remis dans les conditions d'élevage standard. L'ensemble des manipulations et mesures sur les animaux est réalisé par du personnel formé et expérimenté. Les animaux bénéficient d'un suivi rapproché par les animaliers locaux, ainsi que par les différents intervenants notamment le vétérinaire

17907 Les maladies induisant des pertes de tissu osseux, comme l'ostéoporose, touchent un nombre croissant de personnes dans le monde et constituent un problème de santé publique majeur. A l'échelle mondiale, plus de deux millions de greffes osseuses sont réalisées annuellement afin de combler des défauts osseux (c'est à dire des manques de matière osseuse) en chirurgie orthopédique, neurochirurgie et chirurgie dentaire. De nombreuses solutions thérapeutiques existent actuellement pour favoriser la régénération osseuse, mais elles présentent toutes des limites et des risques. Un des challenges majeurs de l'ingénierie tissulaire osseuse est de générer de nouveaux substituts osseux aux propriétés optimisées pour favoriser la repousse de l'os et la réapparition des vaisseaux sanguins. Pour cela, il faut comprendre les mécanismes cellulaires mis en jeu dans la réparation osseuse. Le développement et la validation des biomatériaux de reconstruction osseuse doit suivre plusieurs étapes successives, incluant des tests *in vitro* de compatibilité avec les cellules et de performance mais également des études *in vivo* permettant de mettre en évidence l'innocuité du produit, notamment pour les cellules, ainsi que son effet sur la reconstruction osseuse. Il existe actuellement plusieurs modèles animaux validés pour l'évaluation des biomatériaux de substitution osseuse. Ces tests sont habituellement d'abord réalisés chez des rongeurs (souris, rat) qui présentent l'avantage d'être plus simples à mettre en œuvre et plus reproductibles que les tests sur les gros animaux. L'objectif général de ce projet est d'étudier l'impact des biomatériaux sur les ostéocytes dans un contexte de régénération osseuse. En effet, les ostéocytes représentent 90 à 95% des cellules osseuses et sont responsables de l'orchestration du remodelage osseux. Si l'on sait aujourd'hui qu'elles communiquent avec les ostéoblastes et les ostéoclastes pour contrôler la formation et la résorption osseuse, leur rôle dans la réparation osseuse en lien avec les vaisseaux et leur réaction à l'implantation d'un biomatériau ne sont pas connus et ont été très peu étudiés. Dans nos expérimentations, des souris transgéniques (pour mettre en évidence les vaisseaux) et non transgéniques, seront utilisées. Des biomatériaux seront implantés 1) au niveau de défauts critiques de calvaria (défauts osseux du crâne, qui ne se réparent pas seuls) ou 2) non critiques de fémur (défauts qui se réparent seuls). Nous utiliserons des biomatériaux déjà caractérisés par notre laboratoire et /ou déjà mis sur le marché. Pour obtenir un suivi de la réparation au cours du temps, il est nécessaire de préparer plusieurs groupes d'animaux dont la réparation osseuse sera étudiée à des temps différents. Les méthodes de caractérisation des sites implantés comprennent des évaluations cliniques (inflammation, douleur...), radiologiques, histologiques et de biologie moléculaire. Remplacement : il n'existe pas de modèle *in vitro* permettant d'étudier la réparation osseuse dans ce contexte. Réduction : ces expériences sont conçues pour limiter le nombre d'animaux à 8 par temps et pour chacune des conditions expérimentales, en utilisant des tailles de groupes basées sur des travaux antérieurs et permettant des comparaisons statistiques. Du fait des expérimentations prévues lors des 5 prochaines années (test de plusieurs biomatériaux), nous envisageons d'utiliser 50 animaux par an, soit 250 au maximum sur 5 ans. Raffinement : une méthode d'analgésie des animaux sera réalisée en post-opératoire ainsi que le lendemain de l'intervention. Après l'intervention, les animaux seront replacés en fratrie avec des conditions d'hébergement et un milieu d'enrichissement adaptés, favorables au bien-être de l'animal (litière avec copeaux de peuplier, tuyaux pour jouer).

17908 L'utilisation de modèles chroniques d'infarctus permet de mieux comprendre les mécanismes responsables des troubles du rythme chez les patients présentant un infarctus mais également d'explorer des solutions thérapeutiques conduisant à une meilleure prise en charge des patients souffrant de ces pathologies.

L'objectif de ce projet consiste à créer des modèles animaux ayant des infarctus chroniques afin de pouvoir les utiliser par la suite dans des projets visant soit à comprendre les mécanismes électrophysiologiques et le remodelage structurel liés à un infarctus, soit d'étudier des méthodes pour résoudre les phénomènes pathologiques associées.

De par leurs caractéristiques anatomiques et électrophysiologies cardiaques proche de ceux de l'homme, les espèces du porc et de l'ovine ont été identifiées comme les meilleurs modèles pour reproduire la pathologie étudiée. Ils permettront une application à l'homme des résultats obtenus dans ses différents projets.

En fonction des altérations cardiaques recherchées (tissulaires, structurelles, physiologiques ou électrophysiologiques) et face à la diversité des mécanismes d'infarctus, différentes méthodes pourront être utilisées pour créer ces modèles selon la définition du projet dans lequel l'animal sera réaffecté après création de l'infarctus.

Pour répondre aux questions d'ordre clinique, des modèles animaux de pathologies humaines et des tissus animaux sont nécessaires, le REMPLACEMENT des animaux n'est actuellement pas possible. En effet, l'étude des mécanismes physiologiques complexes dans leur globalité nécessite d'avoir recours à un modèle animal et il n'existe pas à ce jour de modèle de modélisation pour répondre aux objectifs.

Nous avons fixé une limite maximale 350 animaux au total sur 5 ans, soit en moyenne 70 animaux par an répartis sur 2 espèces (ovins et porcins) en fonction des besoins des études. Il s'agit du nombre minimal d'animaux nécessaire en se basant sur notre expérience antérieure dans l'utilisation de ce modèle au cours de divers projets menés jusqu'à présent et au regard des projets à venir. Une attention sera portée à la REDUCTION du nombre de ces animaux utilisés dans les projets de réaffectation. Dans cet objectif de réduction, nous ferons également en sorte que chaque animal soit son propre contrôle dès que cela sera possible.

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

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

17909 Le système immunitaire peut éliminer des tumeurs naissantes. Néanmoins, l'émergence de tumeurs montre que celui-ci ne permet pas toujours leur contrôle. L'échappement tumoral est généralement associé à une régulation négative du système immunitaire affectant principalement les cellules dendritiques. Les cellules dendritiques sont les sentinelles du système immunitaire. Présentes dans les tissus, elles ont pour fonction de capturer les antigènes des tumeurs puis de migrer vers les ganglions drainants où elles présenteront ces antigènes aux lymphocytes. Si les cellules dendritiques sont bien activées, elles induiront l'activation et la différenciation de ces lymphocytes en cellules capables d'éliminer des tumeurs. Inversement, si celles-ci ont reçu des signaux négatifs liés à l'environnement tumoral, ces lymphocytes ne seront pas efficaces à éliminer les tumeurs.

La découverte de facteurs inhibiteurs de la réponse immunitaire et la démonstration, dans des modèles animaux, que des anticorps bloquant ces facteurs peuvent restaurer une réponse immunitaire contre des tumeurs a révolutionné le traitement des cancers. Ces thérapies sont particulièrement efficaces dans le traitement des mélanomes ou des cancers du sein. Ces observations indiquent que le système immunitaire peut être reprogrammé pour éliminer des tumeurs. Toutefois, seulement un petit nombre de patients répondent favorablement. Ceci semble lié à des défauts fonctionnels des cellules dendritiques. Identifier des facteurs qui permettront d'accroître le recrutement des cellules dendritiques dans les tumeurs et de les reprogrammer est donc un enjeu majeur dans le traitement des cancers.

Dans ce contexte, nos objectifs sont, d'une part, de définir les mécanismes permettant le recrutement des cellules dendritiques vers une tumeur solide et vers les ganglions drainants. D'autre part, nous cherchons à mieux comprendre comment l'environnement tumoral modifie la fonction des cellules dendritiques afin d'identifier des facteurs qui permettront de les reprogrammer.

L'utilisation de modèles animaux est essentielle à ce projet. En effet, l'environnement tumoral et l'organisation tridimensionnelle de la tumeur sont des paramètres clés qui régulent le recrutement

et la mobilité des cellules dendritiques. A ce jour, cette complexité ne peut être entièrement reproduite in vitro. De même, les différents acteurs du système immunitaire, cellules dendritiques et lymphocytes patrouillent l'ensemble de l'organisme et leur recrutement dans la tumeur est défini par son anatomie. Aussi, nous utilisons différents modèles de mélanomes et cancer du sein chez la souris. La souris est un modèle de choix car elle reproduit assez fidèlement la pathologie humaine. La disponibilité de nombreux modèles de souris exprimant ou non des facteurs d'intérêt permet aussi de préciser les mécanismes impliqués, une étape essentielle au développement de nouveaux traitements.

Globalement, l'ensemble des expériences est planifié pour réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés au moyen d'expériences «preuve de concept» in vitro, par des expériences pilotes sur de petits groupes d'animaux et par l'utilisation de systèmes expérimentaux permettant de suivre dans le temps un même animal. Nous utilisons des modèles expérimentaux très reproductibles, ce qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés tout en atteignant des résultats exploitables. Toutes les expériences sont réalisées dans des conditions réduisant au maximum l'inconfort ou la souffrance des animaux. Notamment, les animaux sont hébergés dans des conditions respectant la réglementation internationale, avec des observations quotidiennes afin d'identifier rapidement tout signe d'inconfort ou de souffrance. Nous avons aussi établi un ensemble de points limites

: l'expérience sera arrêtée si les animaux risquent de souffrir. A noter que les modèles de tumeurs utilisés conduisent à des tumeurs localisées non métastatiques, ce qui réduit considérablement les risques de souffrance animale. Finalement les expérimentateurs sont formés à une expérimentation respectueuse du bien-être animal.

Le nombre de souris nécessaire à la conduite de ce projet est estimé à 2490 pour les 5 années.

17910 L'anémie de Fanconi (AF) est une maladie héréditaire, rare, caractérisée par des malformations dès la naissance, une prédisposition aux cancers solides et du sang et une défaillance de la production de cellules sanguines par le tissu de la moelle osseuse, menant à une quantité réduite de globules rouges, blancs et plaquettes dans le sang. À l'inverse, une portion minoritaire des patients atteints d'AF a un tableau hématologique moins grave. Ces patients ont une quantité de cellules sanguines quasiment normale et ils ne présentent que rarement un cancer du sang. Des mécanismes génétiques spontanés causant une correction du défaut de la cellule, c'est-à-dire, une réversion acquise pendant la vie, sont suffisants pour rétablir le bon fonctionnement cellulaire.

L'objectif global de cette étude est de reproduire l'anormalité génétique présente dans l'anémie de Fanconi et sa correction et d'explorer l'impact de la correction sur le risque d'évolution vers un cancer du sang. Pour ce faire, nous allons utiliser un modèle de souris portant un défaut génétique type Fanconi, mais ne présentant pas de phénotype dommageable chez la souris adulte. Dans la phase embryonnaire, il y a plus de mortalité intra-utérus et un retard de croissance chez les souris Fanconi ; elles peuvent aussi présenter des malformations des yeux qui restent stables pendant la vie de la souris. Les souris Fanconi adultes sont similaires aux souris wild-type, ne présentant pas de défaillance spontanée de la moelle osseuse et pas de développement spontané de cancers. Nous allons modifier in vitro les cellules des souris Fanconi. Pour cela, nous allons prélever les cellules souches de la moelle osseuse (tissu responsable pour la production de cellules du sang) des souris après euthanasie et soit corriger le défaut génétique Fanconi soit les transformer en cellules précancéreuses (pré-leucémiques). Ensuite, nous allons réinjecter ces cellules par voie intraveineuse à des souris vigiles de la même lignée, conditionnées au préalable pour recevoir la greffe de cellules. Nous allons analyser si les cellules corrigées prolifèrent mieux que les cellules précancéreuses chez les souris receveuses. Le conditionnement avant la greffe par irradiation corporelle totale la veille de l'injection des cellules, habituellement utilisé chez la souris, est très toxique chez le patient Fanconi. Nous testerons aussi une alternative prometteuse qui est l'utilisation d'une protéine (un anticorps) ciblée contre les cellules souches hématopoïétiques à la place de l'irradiation. Ce traitement est administré aux souris vigiles en dose unique par voie veineuse huit jours avant l'infusion cellulaire et remplace l'irradiation. Sa bonne efficacité et faible toxicité ont été déjà démontrées chez des souris non Fanconi et nous testerons l'efficacité de ce

conditionnement dans notre modèle Fanconi (Fancg KO). Dans cette étude, nous allons comparer l'efficacité de l'injection des cellules entre ces deux conditionnements chez la souris Fanconi.

Le suivi clinique et comportemental sera quotidien pour toutes les souris injectées dès le début de l'expérience. Un traitement adapté sera administré selon le tableau clinique : de la nourriture humidifiée ou de la gélose pourra être ajoutée dans le cas de perte de poids ou diarrhées légères, des antalgiques pourront être administrés selon la grille et, en cas de souffrance importante ou irréversible, les animaux seront euthanasiés.

Enfin, nous étudierons si les cellules corrigées ont un avantage sélectif sur les autres cellules chez la souris. Ce suivi se fera par prélèvement mensuel de cellules de la moelle osseuse sous anesthésie gazeuse et analgésie. Pour les souris susceptibles de développer une leucémie (à partir de 10% de blastes présents dans un prélèvement de la moelle osseuse) ce suivi se fera par prélèvement sanguin hebdomadaire sur souris vigile. À l'issue de la période de suivi ou dans le cas où un point limite est atteint, les animaux seront euthanasiés. A terme, ce projet devrait permettre de tester des mécanismes menant à une évolution hématologique favorable dans l'anémie de Fanconi.

En accord avec la règle des 3R, nous réaliserons le maximum d'expériences in vitro. Néanmoins, l'utilisation d'animaux est indispensable car nous avons besoin de démontrer l'avantage sélectif des cellules corrigées dans un environnement cellulaire Fanconi, surtout au niveau de la production de cellules sanguines dans la moelle osseuse. Les outils pour reproduire l'anormalité génétique présente dans l'anémie de Fanconi, la greffe de cellules souches hématopoïétiques et la thérapie génique sont validés dans la littérature chez la souris. Au total, nous utiliserons 324 souris sur une durée de cinq ans. À la fin d'une période de suivi de 12 mois maximum ou si un des points limites est atteint, les souris seront euthanasiées. Nous avons réduit au maximum le nombre d'animaux après estimation des effectifs basée sur les données antérieures du laboratoire et une simulation statistique afin de garantir l'obtention de résultats statistiquement interprétables. Une attention toute particulière sera également portée sur le bien-être des animaux par une surveillance journalière qui sera assurée par le personnel de l'animalerie, en complément de celle des expérimentateurs. Les animaux sont maintenus dans des salles d'hébergement adaptés, dans des cages enrichies, avec un change hebdomadaire assuré par les animaliers de l'EU. Nous veillerons aussi à réduire au minimum (intensité et durée) les souffrances ressenties par les animaux, en utilisant une grille d'évaluation de points limites suffisamment précoces et prédictifs prenant en compte l'apparence physique, le poids et le comportement des animaux ainsi que le développement de la maladie. Nous avons ainsi défini des critères d'arrêt qui lorsqu'ils sont atteints conduiront à l'euthanasie de la souris.

17911 La prévalence de la Fibrillation Auriculaire (FA) dans la population âgée de plus de 65 ans était de 12% en 2010 et elle devrait passer à 22% d'ici 2040, rien qu'en Europe. L'âge est de loin le facteur de risque le plus pour les maladies cardiovasculaires. Avec le vieillissement de la population, les maladies cardiovasculaires devraient augmenter de 200% au cours des 20 prochaines années et, en particulier, la fibrillation auriculaire.

L'utilisation d'un modèle chronique de fibrillation auriculaire (FA) permet de mieux comprendre les mécanismes responsables des troubles du rythme chez les patients présentant cette pathologie mais également d'explorer des solutions thérapeutiques conduisant à une meilleure prise en charge des patients en FA.

L'objectif de ce projet consiste à créer un modèle animal de FA chronique afin de pouvoir l'utiliser par la suite dans des projets visant soit à comprendre les modifications biologiques liés à la FA, soit de tester des thérapies alternatives à celles actuellement utilisées, soit de développer des outils diagnostiques et thérapeutiques directement transférable à la clinique, soit de répondre aux besoins des industriels (test de nouveaux cathéters d'ablation par exemple).

De par ses caractéristiques anatomiques et électrophysiologies cardiaques proche de celles de l'homme, l'ovine a été identifiée comme un très bon modèle pour reproduire la pathologie étudiée.

Pour répondre aux questions d'ordre clinique, des modèles animaux de pathologies humaines et des tissus animaux sont nécessaires, le REMPLACEMENT des animaux n'est actuellement pas possible. En effet, l'étude des mécanismes physiologiques complexes dans leur globalité nécessite d'avoir recours à un modèle animal et il n'existe pas à ce jour de modèle de modélisation pour répondre aux objectifs scientifiques et cliniques.

Nous avons fixé une limite maximale de 100 animaux au total sur 5 ans, soit en moyenne 20 animaux par an en fonction des besoins des études. Il s'agit du nombre d'animaux nécessaire en se basant sur notre expérience antérieure dans l'utilisation de ce modèle au cours de divers projets menés jusqu'à présent et au regard des projets à venir. Une attention sera portée à la REDUCTION du nombre de ces animaux utilisés dans les projets de réaffectation. Dans cet objectif de réduction, nous ferons également en sorte que chaque animal soit son propre contrôle dès que cela sera possible. Nous avons développé un simulateur basé sur des cœurs humains imprimés en 3D qui sert de banc de tests aux nouveaux cathéters. Cela ne permet pas de remplacer complètement les animaux mais réduit les besoins. Nous avons également récemment développé la télémétrie au laboratoire, cette approche nous permettra de raffiner les études expérimentales et de réduire le nombre d'animaux utilisés dans chaque étude. Cette approche télémétrique permet de récolter à distance (i) de nombreux paramètres caractérisant la pathologie et (ii) d'évaluer l'efficacité d'un traitement thérapeutique.

Le respect du bien-être animal repose sur plusieurs mesures (RAFFINEMENT) :

- les animaux sont hébergés dans des locaux agréés et bénéficient de soins quotidiens dispensés par du personnel compétent et soucieux du bien-être animal
- les animaux sont habitués aux personnels animaliers afin de limiter tout stress
- les animaux sont hébergés en groupes sociaux ce qui leur permet d'exprimer des comportements naturels ils disposent d'enrichissements adaptés (foin et pierre à sel)
- toutes les procédures sont réalisées sous anesthésie générale (mise en œuvre et surveillée par du personnel dédié) et une analgésie adaptée est systématiquement mise en place
- des critères d'alerte précis sont surveillés ; si l'animal présente un signe d'appel, des mesures adaptées sont mises en place immédiatement (ajout d'analgésique par exemple).
- La télémétrie permet de suivre en temps réel la température, l'activité et le rythme cardiaque de l'animal permettant ainsi une surveillance rapprochée de l'état clinique de l'animal et d'agir en fonction.

17912 La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est une maladie du poumon létale sans traitement capable de freiner ou d'inhiber sa progression. La FPI est caractérisée par l'activation de cellules qui communiquent entre elles de façon aberrante, ce qui favorise un phénomène de désorganisation du tissu pulmonaire, d'envahissement de l'espace alvéolaire indispensable aux échanges gazeux et qui conduit à une insuffisance respiratoire fatale. On connaît différents mécanismes cellulaires responsables de la transformation du tissu pulmonaire. On sait que de petites molécules présentes dans les cellules pulmonaires, les protéines de choc thermique (HSP) stimulent les mécanismes cellulaires menant à la fibrose pulmonaire. Notre équipe a précédemment montré que plusieurs d'entre elles, notamment HSPB1, HSPB5 et HSP90 sont surexprimées dans les poumons des patients souffrant de fibrose pulmonaire. Ces médiateurs sont présents en quantité importante dans les cellules de poumons fibreux mais peuvent aussi être libérés de ces tissus malades, et aller interagir avec les tissus environnants. Ils se comportent alors comme des messagers extracellulaires. Des données préliminaires obtenues in vitro montrent que cette communication, et en particulier celle portée par HSPB1 est aussi impliquée dans le développement de la fibrose pulmonaire.

Nous voulons caractériser les effets d'HSPB1 extracellulaire sur le développement de la fibrose pulmonaire.

Nous utiliserons le modèle murin de fibrose pulmonaire induit par administration IV de bléomycine, un agent anti-cancéreux. Ce modèle est utilisé et reconnu dans la communauté scientifique.

Ce projet nécessitera 312 souris (C57Bl6/N) et se déroulera sur 1 an.

Nous utiliserons une stratégie suivant la règle des 3R. Le tissu pulmonaire est un tissu complexe composé de différentes cellules épithéliales, fibroblastiques, mésothéliales, organisées en tissu et interagissant dans un système dynamique. La fibrose pulmonaire est elle aussi complexe et son développement implique plusieurs processus (inflammation, remodelage tissulaire). Tout ceci rend indispensable de travailler in vivo sur l'organe pulmonaire entier pour bien comprendre le rôle des HSPs dans la communication intercellulaire impliquée dans le développement de la fibrose.

Nous raffinerons nos expérimentations pour produire des données les plus pertinentes possibles tout en réduisant l'inconfort des animaux et nous réduirons le nombre d'animaux au minimum tout en permettant de remplir nos objectifs et répondre aux exigences des tests statistiques. Une attention particulière sera apportée au bien-être des animaux (densité par cage, enrichissement de milieu). Les souris auront accès à une alimentation enrichie et bénéficieront d'injection sous-cutanée de serum physiologique à partir d'un seuil de perte de poids, pour limiter la déshydratation qui caractérisent le modèle. Le modèle de fibrose pulmonaire sera appliqué par du personnel qualifié et entraîné. Les animaux seront suivis au moyen d'une échelle d'évaluation de la douleur permettant d'éviter une souffrance susceptible d'avoir une incidence grave sur leur état général (cf 3. 4. 13.). Les points limites fixés nous permettront de décider de la nécessité de mise à mort des animaux.

17913 L'accident vasculaire cérébrale (AVC) est un enjeu majeur de santé publique en étant la troisième cause de mortalité dans le monde avec 15 millions de décès chaque année. Il s'agit également de la 1ère cause de handicap acquis chez l'adulte et 25% des patients survivant à l'AVC vont être atteint de déclin cognitif dans les 5 ans. Un AVC, ou ischémie cérébrale, est une occlusion, causée par un caillot de sang, dans une artère cérébrale ou à destinée cérébrale entraînant la mort rapide de cellules en aval du territoire touché. Les seuls traitements actuellement disponibles consistent à recanaliser le vaisseau occlus soit à l'aide d'un médicament désagrégant le caillot soit en le récupérant mécaniquement via un dispositif médical. Du fait de la courte fenêtre thérapeutique de ces traitements, moins de 10% des patients peuvent en bénéficier. Néanmoins, certains patients récupèrent spontanément, ainsi, il y a donc des mécanismes de récupération qui peuvent se mettre en place. Réussir à les comprendre et à les favoriser permettrait de développer de nouveaux traitements et d'élargir la fenêtre thérapeutique.

D'après de récentes études, cibler l'inflammation cérébrale afin de la rendre moins délétère pourraient stimuler le remodelage cérébral et favoriser la récupération post AVC à long terme, sur le plan de la motricité mais aussi en limitant/empêchant la démence. Lors d'un AVC, une des premières cellules inflammatoires à intervenir et ayant des conséquences considérables sur la survie du tissu cérébral est le neutrophile. En effet, il libère des dérivés réactifs de l'oxygène, qui sont des molécules toxiques, et de puissantes protéases qui contribuent à la destruction et / ou au dysfonctionnement cérébral. Parallèlement, l'AVC induit la rupture de la barrière hémato-encéphalique qui est la barrière physiologique entre sang et cerveau constituée de cellules endothéliales notamment et ayant un rôle de filtre. Cette rupture favorise alors l'entrée de cellules inflammatoires délétères, et également la formation d'œdème concourant à l'aggravation de l'état du patient.

De manière intéressante, une protéine appelée CD31 et ayant un rôle essentiel dans le maintien d'un état stable des cellules qui l'expriment, est retrouvée à la fois à la surface des neutrophiles, et à la fois à la surface des cellules endothéliales, notamment. Il joue un rôle pacificateur de l'interface sang-vaisseau. Pendant l'AVC, le CD31 est cependant partiellement coupé de la surface cellulaire, perdant ainsi ses propriétés régulatrices. En effet, il peut être coupé par des protéases, ce qui réduit l'inhibition de l'activation des neutrophiles et pourraient également entraîner la perte de jonction entre les cellules endothéliales et donc une aggravation de la rupture de la barrière hématoencéphalique. Ce phénomène, au niveau cérébral et/ou de l'organisme entier, pourrait donc contribuer aux dommages observés lors d'un accident vasculaire cérébral.

Le but du projet est de comprendre le rôle du CD31 lors d'un AVC. Nous faisons l'hypothèse qu'en restaurant les fonctions du CD31, les phénomènes inflammatoires ainsi que la rupture de la barrière

hématoencéphaliques seraient diminués et permettrait de limiter la lésion cérébrale. Pour vérifier cette hypothèse, nous allons évaluer le rôle thérapeutique d'un peptide agoniste, développée au sein du laboratoire, c'est-à-dire d'une petite chaîne d'acides aminés bien définie pouvant se fixer sur le CD31 coupé et ainsi en restaurer sa fonction initiale.

Le recours au modèle animal est justifié car aucune approche in vitro ne permet de rendre compte des processus de réparation neurovasculaire après ischémie cérébrale au cours du temps. Les modèles d'AVC ne sont à l'heure actuelle pas remplaçables. Ce projet nécessite 864 souris mâles adultes pour l'ensemble des procédures expérimentales sur une période de 5 ans, ce nombre ayant été élaboré en respectant la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner). Ce nombre rend compte de 6 groupes génétiquement modifiés et un groupe contrôle et ce pour 2 modèles d'ischémie expérimentale. Pour chaque groupe nous utiliserons pour l'analyse histologique 8 souris et pour l'analyse en biologie moléculaire 10 souris. L'étude se fera sur trois temps de prélèvement à J2, J7 et J40 post-occlusion soit 756 souris. Il y aura également 2 groupes d'évaluation du peptide agoniste au CD31. Pour chacun de ces groupes une étude histologique et en biologie moléculaire sera effectué à J2, J7 et J40 post-occlusion soit 108 souris.

Les groupes ont été conçus de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Un calcul statistique du nombre de sujets nécessaires a été réalisé afin d'évaluer le nombre d'animaux à inclure pour obtenir des résultats significatifs tout en minimisant ce nombre. Ces calculs ont été possibles grâce aux résultats antérieurs obtenus avec ces modèles animaux. Pour le raffinement, le soin et le suivi des animaux seront faits par des personnes compétentes et expérimentées. La douleur sera évaluée par la mise en place de points limites bien définis à l'aide d'une grille de score. En cas de douleurs, l'administration d'antalgique et d'analgésie sera réalisée. Si la douleur persiste, l'animal sera euthanasié.

17914 La trisomie 21 (T21), aussi appelé Syndrome de Down (DS), est due à la présence d'un chromosome 21 supplémentaire. Elle touche 1 nouveau-né pour 2000 naissances et représente environ un tiers des déficiences intellectuelles chez les enfants d'âge scolaire. C'est la forme la plus fréquente de retard mental, qui est également associée à de nombreuses modifications morphologiques. Arriver à augmenter le quotient intellectuel des patients T21 de quelques points, leur permettrait d'avoir une vie plus autonome et socialement intégrée, et constituerait un progrès très important pour la qualité de vie des patients et de leur entourage. La finalité de la recherche sur la T21 est donc de parvenir à mettre au point un traitement améliorant, puis normalisant, les fonctions intellectuelles des malades.

Nous proposons dans cette étude d'explorer en Imagerie par Résonance Magnétique (IRM), les effets sur le cerveau de deux molécules ayant la propriété d'améliorer les capacités altérées dans cette pathologie. En effet, ces molécules ciblent et inhibent toutes deux une protéine dont l'expression est perturbée dans la Trisomie 21, menant à des déficiences mentales sévères et un syndrome autistique. . Les utilisations de ces molécules chez des souris génétiquement modifiées modélisant le DS, ont fait l'objet de deux APAFIS acceptées dont les études ont permis de caractériser la toxicité et l'efficacité de ces composés chez la souris. En effet, aucune toxicité des molécules n'a été observée, et les souris traitées présentaient une correction de leur capacités de mémoire. A noter que le remplacement de l'animal par des techniques in vitro est impossible car l'évaluation des performances intellectuelles et comportementales ne peut être effectuée que sur un organisme entier.

Dans ce projet, nous réaliseront une étude IRM sur 3 souris modèles de la trisomie 21 et 2 modèles de rats traités avec la L41 ou l'EMD92. Les modèles animaux de la trisomie 21 présentent des déficits d'apprentissage et de mémoire qui sont évalués dans des tests comportementaux tel que le test de reconnaissance d'objet. Ces modèles présentent aussi des anomalies crânio-faciales. L'IRM du cerveau représente actuellement la seule méthode permettant de cartographier l'architecture des réseaux cérébraux de manière non-invasive, permettant de donner des indications unique sur l'efficacité des molécules thérapeutiques et de mieux comprendre le mode d'action des molécules thérapeutiques ainsi que les mécanismes sous-jacents au DS.

Afin d'obtenir des résultats significatifs, un minimum de 120 animaux par modèle génétique est requis (6 groupes expérimentaux constitués de 20 animaux pour chaque modèle), résultant à un total de 600 animaux. De plus, 5 souris et 5 rats sains seront utilisés afin d'optimiser le protocole d'anesthésie pour l'IRM pour chacune des espèces.

Ce projet comporte 3 procédures expérimentales :

- 1) une procédure d'optimisation de l'anesthésie, permettant de mettre au point les doses à utiliser lors des examens IRM afin que les animaux se trouvent le plus proche possible d'un état de repos.
- 2) une procédure de traitement par gavage des animaux pour l'EMD92
- 3) une procédure d'acquisition IRM du cerveau sur les modèles souris et rats. Pour atteindre les objectifs du projet, deux techniques seront utilisées au cours de l'examen d'IRM, afin d'obtenir des informations à la fois sur les changements de fonctionnement du cerveau et de sa structure : de l'IRM fonctionnelle de repos et l'IRM du tenseur de diffusion.

REMPLACEMENT :

L'étude portant ici sur des modèles précliniques du syndrome de Down, des rongeurs seront donc utilisés.

RAFFINEMENT :

Les animaux seront hébergés en groupes sociaux de 3 animaux dans des cages enrichies avec un barreau à ronger et des papiers absorbants pour qu'ils puissent faire leur nid. Ils bénéficieront d'un suivi quotidien à partir du début de leur traitement jusqu'à la fin de l'expérience. Une grille d'évaluation sera utilisée afin de détecter les animaux qui présenteraient des signes de souffrance, de mal-être, ou de douleur. Toutes les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie pour éviter toute souffrance et douleur des animaux.

REDUCTION :

Dans cette étude, des rongeurs mâles seront utilisés à partir de 12 semaines, âge équivalent au jeune adulte. Nous utiliserons et testerons les deux composés sur des animaux sauvages qui serviront de groupes contrôles. D'après la littérature de précédentes études IRM chez le rongeur, 20 animaux par groupe seront utilisés, correspondant à l'effectif minimal pour obtenir des résultats statistiques fiables.

17915 La fibrose pulmonaire idiopathique est une maladie chronique, dévastatrice et mortelle, caractérisée par la dégradation progressive des fonctions pulmonaires. Le terme « fibrose pulmonaire » fait référence à un processus de cicatrisation aberrante du tissu pulmonaire conduisant à une réduction de l'élasticité et une destruction des alvéoles pulmonaires provoquant une dyspnée (difficulté à respirer) qui s'aggrave avec le temps. Cette pathologie serait la conséquence d'agressions répétées de la surface des alvéoles pulmonaires (tabac, infections virales, pollution), probablement associées à un dérèglement de la réponse immunitaire qui favoriserait ce processus de cicatrisation excessive. Les poumons malades sont infiltrés par une population de cellules du système immunitaire, les lymphocytes, dont la contribution à l'apparition et/ou le développement de la maladie n'est pas connue.

Les lymphocytes MAIT (Mucosal Associated Invariant T cells) constituent une population de lymphocytes T circulant dans le sang et pénétrant dans les muqueuses, le foie, l'intestin et les poumons et participant à l'immunité anti-infectieuse. Les MAIT reconnaissent spécifiquement certains types de microbes. A leur contact ils s'activent, produisent des substances qui aident le système immunitaire à détruire les bactéries et induisent une inflammation. Cependant, même en l'absence d'infection, les MAIT peuvent s'activer « spontanément » dès qu'ils pénètrent dans un tissu inflammatoire où ils vont amplifier ce phénomène d'inflammation, ce qui peut être délétère. Ainsi, il a été décrit que les MAIT pourraient être impliqués dans le développement de certaines maladies inflammatoires, de maladies auto-immunes et de maladies fibrosantes comme la cirrhose hépatique.

Comparé à des sujets contrôles, le nombre de MAIT circulant dans le sang est diminué chez les patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique, plus particulièrement dans les formes sévères

de la maladie. De plus, les MAIT circulants semblent être plus activés dans les formes sévères de fibrose. Ces résultats préliminaires nous amènent à penser que les MAIT sont moins nombreux dans le sang car ils pourraient être recrutés et activés dans les poumons chez les patients présentant une forme sévère de fibrose pulmonaire idiopathique. La question serait alors de savoir si les MAIT favorisent le développement de la maladie. A ce jour, il n'existe pas de méthodes alternatives à l'expérimentation animale pour modéliser le développement de la fibrose pulmonaire.

L'objectif de ce projet est d'étudier ces hypothèses in vivo dans un modèle animal se rapprochant le plus possible de la pathologie des patients. Le modèle souris est pertinent car son système respiratoire est très similaire à celui de l'Homme. L'exposition pulmonaire à un agent anti-cancéreux est un modèle établi de fibrose pulmonaire chez la souris. De plus, les souris offrent la possibilité de travailler sur des organismes génétiquement modifiés et de cibler le rôle des MAIT en particulier sur le développement de la fibrose pulmonaire. Nous utiliserons trois modèles de souris qui diffèrent par leur fréquence de MAIT : forte (comme chez l'homme), faible ou nulle. Ces lignées ne présentent pas de phénotype (y compris pulmonaire) particulier. Ce sont des modèles bien établis qui ont permis d'étudier la biologie fondamentale des cellules MAIT, ainsi que leur implication dans de nombreux modèles de maladies inflammatoires et auto-immunes. Nous souhaitons ici déterminer si l'absence de MAIT permet de freiner le développement de la fibrose pulmonaire.

Nous testerons notre hypothèse en instillant cet agent anti-cancéreux dans la trachée par voie chirurgicale chez des souris préalablement anesthésiées. Les souris seront euthanasiées à J14 après anesthésie profonde et différents prélèvements seront réalisés afin de mesurer le degré de fibrose et d'inflammation pulmonaire. Pour récupérer les cellules immunitaires présentes au niveau des alvéoles pulmonaires, une solution physiologique sera injectée dans les bronches puis aspirée et analysée. Le bloc cœur poumon sera prélevé en vue d'analyser la morphologie pulmonaire, de quantifier les MAIT et de quantifier l'expression de marqueurs de fibrose et d'inflammation. Un prélèvement de sang sera également réalisé pour quantifier et mesurer l'état d'activation des MAIT.

Nous avons réduit le nombre de souris utilisées au minimum nécessaire et suffisant pour valider scientifiquement notre hypothèse de travail. Après analyse statistique le nombre de souris nécessaires pour mener à bien cette expérience est de 48 animaux (16 animaux dans chacun des trois groupes : 8 recevant l'agent anti-cancéreux et 8 recevant une solution saline contrôle). Suite à l'instillation par voie chirurgicale, une source de chaleur sera mise en place pour éviter l'hypothermie. L'administration de l'agent anti-cancéreux peut entraîner une perte de poids dans les 7 premiers jours. Une attention particulière sera donc portée au bien-être des animaux par une surveillance journalière assurée par le personnel de l'animalerie et les expérimentateurs. Nous veillerons à réduire au minimum l'intensité et la durée des souffrances ressenties par les animaux en utilisant une grille d'évaluation prenant en compte le poids et le comportement des animaux. Les souris présentant des souffrances ou des douleurs (atteinte du point limite) seront euthanasiées selon la méthode réglementaire. A l'issue des 14 jours d'expérimentation tous les animaux seront euthanasiés. La durée totale du projet, incluant le temps d'élevage nécessaire à l'obtention du nombre suffisant de souris sera de 3 an.

17916 Les glioblastomes sont les tumeurs du système nerveux central les plus agressives, cependant aucun traitement efficace n'est à ce jour disponible. Ces tumeurs sont tout particulièrement difficile à traiter car elles sont très hétérogènes en cellules. En plus de contenir des cellules tumorales, ces tumeurs sont composées de vaisseaux et de cellules immunitaires qui favorisent la croissance tumorale et modifient la réponse au traitement. Afin d'améliorer l'efficacité des traitements et ainsi la survie des personnes atteintes de cette tumeur, notre hypothèse de travail est d'utiliser des molécules qui agiraient sur les cellules tumorales mais aussi sur les cellules de l'environnement de la tumeur. Par ailleurs, les glioblastomes surexpriment des protéines qui entraînent une résistance au traitement dont les inhibiteurs de l'apoptose. Dans ce contexte nous nous sommes intéressés aux molécules qui bloquent les inhibiteurs de l'apoptose appelées les mimétiques de Smac. Au laboratoire, nous avons montré que ces mimétiques de Smac en plus de sensibiliser les cellules au processus d'élimination cellulaire, agissent sur les vaisseaux de la tumeur et sur les cellules du système immunitaire périphérique. Cette étude a pour objectif de comprendre quelle(s)

population(s) cellulaire(s) du système immunitaire est impactée par le traitement au mimétique de Smac. Pour cela nous allons rendre les cerveaux traités ou pas transparents afin d'analyser l'organisation 3D des tumeurs et déterminer exactement quelles cellules immunitaires sont présentes au site tumoral en effectuant de la cytométrie de masse. Des cellules de glioblastomes d'origine murine (GL261-DsRED) seront greffées en intracérébral dans des souris C57BL6. Un total de 130 souris sera nécessaire pour une durée de 5 ans : 80 souris seront utilisées pour les tests de cytométrie de masse et 50 pour les expériences de clarification de cerveaux. Les animaux seront traités 1 fois par semaine en i. v. à la dose de 20 mg/kg et le début du traitement commencera une semaine après greffe. Pour les expériences de clarification une cinétique sera effectuée et les cerveaux seront récupérés après 15, 21 et 28 jours post greffe (10 souris pour chaque temps comprenant 5 traitées au GDC-0152 et 5 contrôle). Pour la cytométrie de masse les cerveaux seront récupérés après 21 et 28 jours post-greffe (15 souris traitées au GDC-0152 et 15 souris contrôle). Les autres animaux serviront pour les mises au point. Dans le souci du respect de la règle des 3R, le nombre d'animaux prévu est minimum et suffisant dans chaque groupe. Il est basé sur un calcul d'effectif permettant de prédire que nous avons 80% de chance d'arriver à un résultat statistiquement significatif. Pour le bien-être de l'animal, les souris seront hébergées selon les normes requises avec un enrichissement (coton, rouleau de carton) et en groupes de 5 individus par cage afin d'éviter le stress de l'isolement. Les souris seront surveillées quotidiennement et pesées 2 fois par semaine. Une analgésie péri-opératoire sera effectuée afin d'éviter la douleur. Le suivi général de l'état de l'animal sera assuré ainsi que le niveau de souffrance évalué en fonction d'une grille de score. Les animaux seront mis à mort dès l'apparition d'un signe de détresse. Le remplacement de ces expériences conduites chez l'animal n'est pas possible car elles nécessitent un être vivant.

17917 La diminution progressive de la masse musculaire observée au cours du vieillissement, associée à une perte d'autonomie avec l'âge, représente un enjeu majeur de santé publique. Notre équipe s'intéresse à une protéine, appelée ici T, liée au vieillissement cellulaire. En effet, cette protéine protège une partie de l'ADN. Cependant, la quantité de cette protéine diminue avec l'âge, ceci a déjà été observé chez l'homme, la souris, le poisson, entre autres. Son rôle est bien décrit pour des cellules qui se renouvellent rapidement. Cependant, sa fonction reste inconnue dans des tissus à renouvellement lent ou presque inexistant, tels que le muscle squelettique et le cerveau. Nous avons créé une lignée de souris dans laquelle T a été supprimée dans le muscle squelettique. Nos résultats préliminaires suggèrent que les souris femelles déplétées de T ont une résistance supérieure à des tests de force musculaire, ainsi qu'une prolongation de la longévité par rapport aux mâles et aux femelles contrôles, cependant ces résultats préliminaires ne sont pas suffisants pour établir une conclusion statistiquement solide.

Notre objectif est de déterminer si la suppression dans le muscle d'une protéine liée à la longévité (appelée ici T) a un effet bénéfique sur la durée de vie des souris.

Pour répondre à la question, nous utiliserons 3 lignées : la lignée dans laquelle la protéine T est supprimée dans le muscle et deux lignées contrôle.

Pour cette procédure, nous utiliserons un total de 45 souris.

Ces souris seront suivies de façon rapprochée à partir de leurs 18 mois (2 mois avant qu'une souris ne soit considérée âgée) avec des pesées hebdomadaires. Nous effectuerons 2 prélèvements sanguins par souris, un à l'âge de 18 mois et un à l'âge de 25 mois, afin de mesurer la biochimie de base ainsi qu'un marqueur d'inflammation lié à l'âge, ce qui nous donnera des informations sur l'état de santé ainsi que le bien-être des animaux. Chez ces souris, pour évaluer l'impact du vieillissement, tous les deux mois à partir de l'âge de 18 mois, nous évaluerons la dépense énergétique par calorimétrie indirecte et l'activité de chaque souris, ainsi que la masse corporelle par RMN. Nous utiliserons des critères précis de poids et de température pour prédire au mieux le décès de ces souris afin d'effectuer une euthanasie préventive pour éviter les souffrances agoniques. Cela nous permettra également de prélever différents échantillons musculaires.

Pour limiter l'impact du vieillissement sur le bien-être animal, nous allons appliquer la règle des 3Rs:

-Raffinement: pour limiter l'impact du vieillissement, nous avons mis en place un suivi strict et régulier des animaux grâce à l'utilisation d'une grille de score qui définit des points limites clairs, précis et précoces.

-Réduction: pour réaliser ce projet en 5 ans, nous utiliserons un maximum de 45 animaux. Le nombre de souris utilisées dans ce projet a été déterminé afin d'obtenir des résultats statistiquement robustes.

- Remplacement : Le projet se base sur des résultats scientifiques obtenus in vitro sur des cellules musculaires humaines. Cependant, le processus physiologique du vieillissement ne peut pas être réalisé, à l'heure actuelle, sur des cultures cellulaires.

17918 À l'heure actuelle, la médecine obstétricale moderne est axée sur la réduction des complications lors de l'accouchement. En conséquence, les césariennes sont l'une des chirurgies les plus courantes au monde, représentant environ 20% des naissances en France. Bien que cette procédure médicale ait sauvé la vie de femmes et d'enfants, elle peut également avoir des effets délétères, notamment un risque plus élevé de développer des maladies chroniques plus tard. Par ailleurs, des études chez l'homme ont démontré que le microbiote des nouveau-nés mis au monde par césarienne est modifié par rapport à celui des enfants nés par voie naturelle. Une hypothèse avancée est donc que ce risque accru de développer une pathologie plus tard, en incluant des maladies inflammatoires de l'intestin, est lié à ces modifications du microbiote.

Le microbiote intestinal est une communauté dynamique, composée de microorganismes (bactéries, champignons, virus et achéobactéries) influencée par de multiples facteurs tout au long de la vie d'un individu. La transmission du microbiote par la mère est le facteur le plus important qui conditionne le schéma de colonisation microbienne chez le nouveau-né (primocolonisation). L'accouchement par césarienne, en supprimant cette transmission du microbiote de la mère, induit des perturbations majeures au niveau de la primocolonisation de l'intestin du nouveau-né. Au cours du développement précoce du nouveau-né, des perturbations dans les interactions entre le microbiote et l'hôte pourraient nuire de manière irréversible et durable à la maturation du système immunitaire, prédisposant l'hôte à développer des maladies inflammatoires et une altération de la fonction de la barrière intestinale. Cette fonction correspond à la capacité de la muqueuse intestinale à confiner des éléments indésirables (typiquement des bactéries pathogènes) dans la lumière intestinale tout en conservant sa capacité d'absorption des nutriments. Par ailleurs, la césarienne est associée à certaines maladies inflammatoires comme la maladie de Crohn et aussi à l'obésité.

Bien que des méthodes d'ensemencement de bactéries visant à contrecarrer les effets de la césarienne aient été suggérées (transfert de bactéries vaginales vers le nouveau-né, par badigeonnage), leur mise en œuvre est délicate d'un point de vue sécurité sanitaire. Des interventions ciblées au tout début de la vie pourraient constituer des stratégies plus faciles à mettre en œuvre et à contrôler pour compenser les perturbations du microbiote dues à la césarienne.

Dans ce projet, nous nous proposons d'étudier l'influence d'une supplémentation avec différents probiotiques, c'est-à-dire des microorganismes ayant des effets santé bénéfique, dans la mise en place d'un microbiote intestinal dont la composition favorise le maintien en bonne santé dans un modèle souris, chez des animaux issus ou non d'une césarienne.

Dans une première partie de projet, nous donnerons à des souris gestantes une supplémentation de probiotiques par gavage. Chez ces mères, nous évaluerons l'impact de la supplémentation en probiotiques sur le lait maternel et sur la composition du microbiote intestinal par comparaison avec des mères n'ayant pas été complémentées avec le probiotique. Nous réaliserons des hystérectomies (ablation de l'utérus afin de mettre au monde des souris à la manière d'une césarienne) chez les souris gestantes et nous comparerons des paramètres physiologiques des souriceaux exposés ou non à des probiotiques afin d'analyser le bénéfice potentiel d'une supplémentation en probiotiques chez des animaux nés suite à une hystérectomie. Nous observerons notamment l'inflammation intestinale (dosages sanguins et réponse immunitaire), des paramètres métaboliques (glycémie et insulïnémie en réponse à une administration d'insuline ou de glucose) et la composition du microbiote intestinal. Ces paramètres nous sont accessibles par des

interventions simples et faiblement douloureuses ou stressantes : prises de sang, récupération de lait maternel sous anesthésie et de fèces.

Dans une seconde partie, des animaux seront élevés pour participer par la suite à un protocole d'inflammation et déterminer leur sensibilité à une inflammation intestinale induite avec un produit chimique. L'objectif est de démontrer que les traitements probiotiques des mères et/ou des jeunes souriceaux peuvent bien permettre de corriger les déficiences induites par une naissance par césarienne.

Nous utiliserons au maximum 2 262 animaux au cours de ce projet (mères et souriceaux compris), soit un maximum d'environ 450 par an pendant 5 ans.

Ces travaux nécessitent l'utilisation d'animaux vivants car les phénomènes ciblés (développement de l'intestin, inflammation intestinale, variation de composition du microbiote) ne peuvent pas être étudiés par des méthodes de substitution. Pour toutes les procédures expérimentales, nous avons calculé le nombre minimal de souris requis afin d'aboutir à des données analysables par méthodes statistiques. Nous améliorons le bien-être des animaux via un enrichissement apporté dans les cages (fourniture de cellulose permettant la construction de nids par les animaux, bâtons à ronger), un hébergement en cages collectives, la prise en charge de la douleur si nécessaire. Nourriture et eau sont accessibles en permanence. Nos procédures sont faiblement invasives et d'une durée de 7 semaines au maximum néanmoins les animaux sont observés quotidiennement. Par ailleurs, des critères d'arrêt ont été définis (perte de poids pour les mères ou les jeunes adultes subissant la procédure de colite, absence de gain de poids pour les petits, immobilité). Nous espérons que ces travaux permettront d'établir les bases de recommandations nutritionnelles pour les mères d'enfants nés par césarienne et permettant de réduire les risques des troubles associés à cette opération.

17919 L'arthrose est la pathologie du cartilage articulaire la plus fréquente. Avec le vieillissement de la population et la pratique grandissante du sport, cette pathologie est devenue un problème majeur de santé publique entraînant invalidité et absentéisme avec un coût croissant pour la société. Les origines de cette pathologie sont complexes et mal comprises. L'une des raisons vient du fait que le cartilage articulaire est un tissu avasculaire et non innervé dont le potentiel régénératif est très faible ce qui se traduit par une érosion progressive et irrémédiable du cartilage. Cette pathologie est d'origine plurifactorielle avec une composante mécanique prépondérante. Il existe un modèle de choix permettant de reproduire au mieux l'arthrose humaine, notamment son caractère progressif. Elle est appelée arthrose post-traumatique et est aujourd'hui communément utilisée par les équipes de recherche travaillant sur cette pathologie. Elle consiste à effectuer une déstabilisation du ménisque médian (DMM) par incision de ce dernier (ménisectomie partielle), entraînant une déstabilisation de l'articulation et provoquant une arthrose apparaissant progressivement. Le projet consiste à tester l'implication d'une enzyme dans le développement de l'arthrose et a pour but de déterminer si l'inhibition de cette protéine dans le cartilage articulaire peut être une stratégie pour empêcher l'apparition ou freiner l'arthrose.

Afin d'obtenir l'invalidation la plus spécifique au sein du cartilage, nous utiliserons 3 modèles de souris différentes dont 2 modèles nous permettant de vérifier la spécificité tissulaire de l'invalidation. Il y aura plusieurs conditions : l'invalidation du gène sera réalisée à 2 moments de la pathologie : Le premier moment se situe avant le déclenchement de la pathologie donc avant la chirurgie, afin d'évaluer l'impact sur le déclenchement de la pathologie. Le deuxième se fera au cours de la pathologie afin d'évaluer l'impact sur la progression de la pathologie. 2 temps seront analysés.

Ce projet concerne un nombre total de 1244 souris.

Remplacement : L'articulation est un environnement composé de plusieurs tissus différents qui rend l'approche in vitro particulièrement inopérante pour comprendre les mécanismes mis en jeu au cours de l'arthrose. De plus les contraintes mécaniques auxquelles le cartilage est soumis sont elles aussi difficiles à reproduire ce qui explique le recours à l'expérimentation animale.

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

reproductibles. En fonction des résultats de la procédure 1 nous n'utiliserons qu'un des 2 modèles d'invalidation dans les procédures 2 et 3.

Raffinement : Une procédure d'anesthésie adaptée sera effectuée avant chirurgie ; les souris se verront administrer un traitement antalgique afin de limiter la douleur. De la nourriture et de l'eau gélifiée seront posées au sol de la cage en post-opératoire afin d'améliorer la prise alimentaire. Des points limites adaptés seront utilisés afin de vérifier le bien être des souris.

17920 La protéine NLRP3 peut avoir plusieurs fonctions selon la cellule dans laquelle elle se trouve. Dans les globules blancs dits « myéloïdes » comme les macrophages, cette protéine participe aux mécanismes impliqués dans la mort immunogène. Récemment, des équipes ont montré qu'elle pouvait également être présente dans d'autres globules blancs appelés « lymphocytes CD4 ». Le rôle de NLRP3 dans les lymphocytes CD4 est mal connu et à l'heure actuelle, on ne sait pas s'il impacte la réponse aux chimiothérapies ou à l'immunothérapie.

Ainsi, ce projet vise à étudier le rôle de NLRP3 dans les lymphocytes CD4 et son impact dans la réponse à l'immunothérapie mais également aux chimiothérapies dites « immunogènes » et « non immunogènes ».

Pour cela, nous utiliserons des souris C57Bl6 présentant un génotype normal ou génétiquement modifiées pour avoir soit une perte de NLRP3 dans toutes les cellules ou exclusivement dans les lymphocytes CD4. Les souris recevront des injections de cellules tumorales induisant des tumeurs dans la cuisse permettant de mesurer la taille de la tumeur au cours du temps. Plusieurs modèles de tumeurs seront testés (cancer du poumon, mélanome, cancer du pancréas et cancer du côlon) car ils ne répondent pas tous de la même manière à la chimiothérapie. Afin d'évaluer l'impact du génotype des souris sur la réponse aux traitements, les souris seront traitées avec soit de l'immunothérapie (anti-PD1), soit des chimiothérapies non immunogènes (étoposide et 5-Fluorouracil), soit des chimiothérapies immunogènes (oxaliplatine et doxorubicine). Nous suivrons la croissance des tumeurs tous les 2 jours. A la fin des expériences, les souris seront mises à mort et nous étudierons les caractéristiques des cellules présentes dans les tumeurs ainsi que les molécules qu'elles produisent.

La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R. Tout d'abord, les expériences ne seront réalisées que deux fois et les prélèvements biologiques seront analysés sur les mêmes animaux ce qui permet de réduire le nombre d'animaux de l'étude. Nous avons fait appel à un méthodologiste afin de déterminer au mieux le nombre minimal de souris requis pour que nos tests statistiques soient suffisamment puissants. L'analyse des souris de manière individuelle nous permettant d'avoir une réelle puissance statistique. A ce niveau de l'étude, il n'est pas possible de travailler in vitro car nous recherchons les effets des traitements sur la croissance tumorale en lien avec le système immunitaire. Si les résultats obtenus au cours de ces expériences nous permettent d'identifier une cible cellulaire ou moléculaire, la suite du projet pourra être réalisée in vitro (remplacement). Enfin, les souris seront observées quotidiennement pour limiter au maximum leur inconfort, raffinement de l'étude. Les animaux seront hébergés à raison de 10 souris par cage en présence des éléments nécessaires à la fabrication d'un nid. Les douleurs induites par les injections sous-cutanées (tumeurs) seront réalisées au cours d'une brève anesthésie générale à l'isoflurane et les injections intrapéritonéales (traitements) ne provoquent que de légères gênes est ne nécessitent pas que les animaux soient anesthésiés. Cette étude nécessitera 2240 souris au maximum.

17921 Dans le règne animal, l'olfaction joue un rôle majeur à l'échelle individuelle comme des relations interindividuels intra- ou inter-espèces. Cette sensorialité est par exemple impliqué dans les comportements sociaux, reproducteurs, alimentaires, dans la capture proies ou la fuite face à un prédateur. L'olfaction est ainsi apte à moduler l'état motivationnel et émotionnel des animaux. Cela est notamment vrai chez le lapin européen (*Oryctolagus cuniculus*), espèce étudiée ici, comme chez les autres espèces de mammifères sauvages et/ou domestiquées.

Par les expériences proposées ici sur des lapins juvéniles (8-10 semaines d'âge), nous testerons si l'exposition d'animaux à une odeur précise a un effet positif sur leur comportement. En particulier,

nous déterminerons si grâce à cette exposition à l'odeur les animaux sont plus résistants au stress et explorent davantage l'environnement. In fine, les résultats de cette étude pourrait avoir des conséquences appliquées en termes de bien-être animal et de relation homme-animal (éleveurs, particuliers). La nature de l'odeur utilisée, qui est une odeur naturelle typique de l'environnement des lapins, n'est pas indiquée ici en raison d'un accord de confidentialité.

Au cours des expériences, nous comparerons les animaux de deux groupes (n = 20 lapins/groupe), l'un exposé à l'odeur quotidiennement durant 14 jours et l'autre non (exposition contrôle au solvant). Pour avoir une idée de l'effet potentiel du traitement sur le comportement des lapins, nous effectuerons à deux reprises auprès des mêmes animaux des tests comportementaux standardisés, d'une part à J+7 (J0 = début de l'exposition à l'odeur) puis à J+14. Ces tests consisteront à (a) faire entrer les animaux dans une arène de type « open-field » pour déterminer leur exploration spatiale durant un temps donné, (b) confronter les animaux, dans l'arène sus-nommée, à un objet nouveau pour déterminer leur niveau de néophobie, et (c) étudier dans un dispositif complémentaire de type « évitement passif » (« dark-light box ») le délai avant que les animaux ne quittent une boîte sombre et entrent dans une arène éclairée pour mesurer leur témérité. Nous évaluerons également leurs réactions comportementales à la manipulation par les expérimentateurs afin de savoir si ceux exposés à l'odeur se montrent plus facilement manipulables que les autres. L'ensemble des comportements étudiés sera filmé, enregistré puis analysé et comparé statistiquement entre le groupe expérimental et le groupe contrôle. Par ces comparaisons, il sera possible de tirer des conclusions sur l'efficacité de l'exposition à cette odeur pour influencer positivement le comportement des lapins domestiques.

17922 Les arenavirus sont des virus à l'origine d'infections de gravité variée et parfois sévères, en particulier le virus de Lassa, endémique en Afrique de l'Ouest et responsable de plusieurs milliers de morts chaque année et le virus de Machupo qui sévit en Bolivie avec une mortalité atteignant 20% en l'absence de traitement. Le principal traitement de ces fièvres hémorragiques repose sur l'utilisation de ribavirine, un anti-viral qui semble efficace. Toutefois, il est important de développer d'autres molécules possédant des mécanismes d'action complémentaires.

Dans ce but, notre laboratoire a identifié deux nouvelles molécules qui ont montré une très bonne activité antivirale sur des cultures cellulaires infectées par différents arenavirus. L'objectif de ce projet est d'établir, dans un modèle animal, si elles sont efficaces contre une infection in vivo. C'est un préalable indispensable avant d'entreprendre leur développement clinique chez l'homme.

L'une de ces molécules a déjà été utilisée avec succès chez la souris pour le traitement d'une infection non virale, démontrant qu'elle peut être administrée à l'animal sans toxicité aiguë. A notre connaissance, l'autre molécule a été seulement étudiée in vitro et n'a jamais été administrée dans un organisme vivant. Nous allons donc dans un premier temps déterminer les conditions d'administration à utiliser pour atteindre une concentration efficace dans l'organisme. Nous allons également vérifier que l'administration de cette molécule ne présente pas de toxicité, en particulier hépatique, à la dose qu'il serait nécessaire d'utiliser pour traiter une infection.

Pour tester l'efficacité de ces molécules, nous utiliserons un modèle d'infection de la souris par un arenavirus très proche de Lassa et Machupo mais non pathogène pour l'homme et peu pathogène pour les souris immunocompétentes. Des souris immunodéprimées développent une concentration virale sanguine élevée accompagnée d'une perte de poids progressive et d'une aggravation de l'état général de l'animal conduisant à la mort. Dans un premier temps, nous reproduirons ce modèle d'infection pour vérifier les données de la littérature. Ensuite, nous évaluerons l'efficacité de la première molécule dans ce modèle d'infection en suivant l'évolution de la virémie et du poids des souris. Nous testerons également la deuxième molécule si elle s'est révélée non toxique. Ces tests seront effectués dans un seul sexe (femelles) car il n'est pas décrit de différence de sensibilité à l'infection au virus Mopeia entre sexes et ceci réduira le nombre d'animaux utilisés. Si les résultats sont positifs, ils seront confirmés chez des mâles dans un projet ultérieur.

Ce projet comportera trois procédures. La première utilisera 40 souris et nous prévoyons une sévérité modérée. La seconde procédure utilisera 36 souris et sera également de sévérité modérée en raison des points limites que nous appliquerons. La troisième procédure utilisera au plus 72

souris et sera également de sévérité modérée pour la même raison. Les effectifs ont été établis en fonction des méthodes d'analyse utilisées et des paramètres à comparer entre les groupes. Conformément au modèle d'infection publié, nous utiliserons des femelles âgées de 6 semaines lors de l'infection (procédures 2 et 3). Par conséquent, nous devons utiliser également des souris femelles âgées de 6 semaines pour les tests sur la seconde molécule (première procédure).

Lors des premières administrations de la seconde molécule (première procédure), nous serons particulièrement attentifs à l'état général des animaux pour détecter tout signe pouvant faire penser à un effet toxique (perte de poids, expression douloureuse, . . .). Nous suivrons également un paramètre de souffrance hépatique. Si cette molécule présente une toxicité, nous interrompons la procédure et ne la testerons pas dans l'infection. Les souris infectées (procédures 2 et 3) seront surveillées et pesées chaque jour. Elles seront mises à mort si la perte de poids dépasse 25% ou si leur état clinique est dégradé.

Ce projet permettra d'établir si ces nouvelles molécules, qui agissent par un mécanisme différent de la ribavirine, sont efficaces pour traiter une infection par un arenavirus très proche des virus Lassa et Machupo hautement pathogènes pour l'homme. Sur cette base, des essais cliniques pourront être entrepris.

17923 Le corps humain comprend des centaines de différents types cellulaires qui ont des fonctions variées. Toutes ces cellules nécessitent une régénération continue et cette régénération est réalisée par la division cellulaire qui est le mode de multiplication de toute cellule. Cette division cellulaire comprend la mitose qui désigne les événements chromosomiques de la division cellulaires des eucaryotes. C'est la division d'une cellule mère en deux cellules filles strictement identiques génétiquement c'est à dire qui ont le même ADN et donc toutes les cellules ont le même patrimoine génétique. Par contre, les cellules se différent les unes des autres que ça soit au niveau fonctionnelle ou morphologie. Cette différence est due à une expression très différente de l'ADN selon le tissu auquel elles appartiennent ou selon les signaux environnementaux ou les signaux cellulaires reçus. Ce processus par lequel les cellules se spécialisent en un type cellulaire défini est appelé la différenciation. Durant ce processus, il y a certains mécanismes qui modifient de manière réversible, transmissible (lors des divisions cellulaires) et adaptative l'expression des gènes sans en changer la séquence nucléotidique (ADN) par l'intermédiaire des modifications de certaines protéines: C'est l'épigénétique. Cette différenciation est observée par exemple dans le renouvellement de la peau: La partie basale de la peau est constituée de cellules souches, qui se multiplie de façon asymétrique pour régénérer le pool de cellules souches : une cellule souche donne une cellule de la peau (kératinocyte) et une cellule souche. La cellule de la peau formée se différencie et migre progressivement jusqu'à la surface de la peau. Ainsi, notre épiderme se renouvelle en permanence. La différenciation est observé surtout au niveau de l'embryogenèse: tous les différents types cellulaires sont dérivés d'une seule cellule-œuf fécondée et c'est grâce à la différenciation. L'inverse est vrai dans le cancer où les cellules peuvent se dédifférencier, régresser vers des propriétés plus proches des cellules souches, et en général, plus les cellules sont dédifférenciées, plus le cancer est agressif. Ce projet a pour objectif d'étudier des gènes qui codent pour des protéines impliquées dans le marquage de l'ADN au niveau des gènes actifs c'est à la différenciation et qui sont surexprimés dans plusieurs cancers. La mutation de certains de ces gènes est mortelle chez la souris au stade de l'embryon de quelques cellules. La mutation d'un gène déclenchée uniquement dans un tissu adulte n'a pratiquement pas d'effet décelable. Certains de ces gènes sont présents en deux exemplaires dans les génomes de la souris et de l'homme. Il a été montré qu'il faut que les deux allèles des deux gènes soient inactifs pour voir un effet dans des cellules adultes. Nous avons construit ou récupéré par des collaborations des souris avec des mutations conditionnelles pour plusieurs de ces gènes à la fois et nous allons pouvoir provoquer la mutation dans l'épiderme de la souris. Nous avons choisi la peau car : c'est un tissu où il y a en permanence division et différenciation des cellules, c'est un organe visible, c'est-à-dire que nous pourrions voir les effets de la mutation et agir au mieux pour limiter l'impact sur les animaux, et enfin, c'est un tissu pour lequel il y a des modèles in vitro performants pour étudier la différenciation et poursuivre nos études. REMPLACER : les résultats déjà obtenus en culture cellulaire sur

l'inactivation de ces gènes sont contradictoires, seuls les effets sur un tissu vivant permettront de valider les observations. Mais une fois ces observations faites, notre étude pourra se poursuivre par des études in vitro, en culture cellulaire, ou peau reconstruite. REDUIRE : nous utiliserons un nombre minimum d'animaux vivants, nous prévoyons d'utiliser 116 animaux sur 3 ans, dont la moitié seront des contrôles qui ne devraient pas souffrir (ils n'auront pas la mutation complète). RAFFINER : nous ne savons pas ce que va provoquer la mutation. La gravité maximale est donc SÉVÈRE. La simple logique veut que nous déclenchions une pathologie proche de l'épidermolyse bulleuse (formation d'ampoules suite au décollement de la peau). Mais il est possible que la mutation empêche juste la cicatrisation de petites plaies cutanées ou la résistance aux rayons ionisants, ce que nous testerons aussi. Nous interviendrons par la mise à mort des animaux avant que toute pathologie ne devienne grave, ou que des plaies s'infectent sans qu'on puisse les soigner. Une analyse histologique (des coupes de peau) sera notre observation clé au cours de ces expériences pilotes. Nos points limites seront alors réajustés pour minimiser la souffrance ou la gêne des animaux. Enfin, si les symptômes sont trop graves, nous pourrions restreindre le déclenchement de la mutation à une partie de la peau. (Des contraintes techniques nous empêchent de faire ainsi d'emblée). Nous utiliserons systématiquement des antalgiques dès l'apparition de symptômes pour couvrir la douleur qu'elle soit avérée ou éventuelle.

17924 La malnutrition sévère est un enjeu de santé public majeur et est la cause de plus d'un tiers des décès d'enfants de moins de 5 ans dans les pays à faibles et moyens revenus. Selon l'UNICEF et l'OMS, la malnutrition aigüe (émaciation) affecte 52 millions d'enfants dont 17 millions souffrant d'émaciation sévère. De plus, en 2020, 165 millions d'enfants dans le monde atteints d'un retard de croissance, soit près d'un enfant sur quatre, conséquence directe de la malnutrition.

La malnutrition sévère résulte d'un déséquilibre des apports des besoins en macronutriments (protéines, lipides, glucides) et/ou des micronutriments (vitamines, ions, minéraux), pouvant aboutir à une carence énergétique.

De plus, les conditions d'hygiène limitées dans les pays à faibles et moyens revenus, augmentent le risque d'exposition aux microorganismes pathogènes, permettant l'apparition d'une entéropathie environnementale ou Environmental Enteric Dysfunction. Cette entéropathie environnementale se caractérise par une inflammation et une hyperperméabilité intestinale, une atrophie villositaire. Cela peut alors conduire à une malabsorption des nutriments et entretenir ainsi le cercle vicieux de la malnutrition.

A l'heure actuelle, les solutions thérapeutiques nutritionnelles permettent d'améliorer l'état de dénutrition mais ne permettent pas de rétablir la fonction de barrière intestinale.

Objectif : Développer de nouvelles solutions nutritionnelles permettant d'améliorer la fonction de barrière intestinale sur un modèle d'entéropathie murin.

Méthodes : Nous souhaitons développer une nouvelle formulation d'une solution nutritionnelle ciblant la fonction de barrière intestinale.

Pour cela, nous testerons plusieurs combinaisons de nutriments (prébiotiques, probiotiques et autres nutriments) dans un modèle de malnutrition associée à une entéropathie chez la souris. Pour induire ce modèle de malnutrition associée à l'entéropathie, nous utiliserons un total de 310 souris, souris mâles Mus Musculus de souche C57Bl/6, âgées de 3 semaines en début de protocole. Les souris recevront ad libitum une alimentation pauvre en protéines pendant 3 semaines et un gavage quotidien d'indométacine pendant une semaine. La solution nutritionnelle sera administrée dans l'alimentation des animaux. Ce modèle expérimental permet de reproduire les caractéristiques suivantes : dénutrition, cassure de la courbe de croissance staturo-pondérale et altération de la fonction de barrière intestinale (inflammation, hyperperméabilité intestinale) comme chez l'enfant atteint de malnutrition sévère.

Notre stratégie des 3R :

Remplacer : La malnutrition sévère ne peut être reproduit par un modèle in vitro mais les effets des nutriments sur la fonction de barrière intestinale seront étudiés sur des cellules épithéliales intestinales cultivées sur filtre.

Raffiner : Habituation : avant de commencer les expérimentations, les animaux seront acclimatés au minimum une semaine. Hébergement amélioré : les animaux seront disposés dans une cage ordinaire au lieu d'une cage métabolique avec un cycle 12h/12h jour et nuit. Afin de permettre les interactions avec leurs congénères, les souris seront disposées à 4 ou 5 par cage, car une étude a montré que les souris vivant à quatre dans une cage subissaient un stress minimal par rapport à celles groupées à deux ou à huit. Des abris seront mis à disposition dans les cages. De plus, du papier de nidification sera placé dans les cages pour enrichir le milieu. Point d'arrêt 1 : Un point d'arrêt anticipé a été défini pour toute perte de poids supérieure à 20% en 3 jours. Point d'arrêt 2 : score supérieur ou égal à 7 d'un score reposant sur un système cumulatif de points selon l'attitude (0-3), la déshydratation (0-2) et la diarrhée (0-4) de la souris.

Réduire : Pour diminuer le nombre d'animaux utilisés, plusieurs approches combinées ont été prévues : (i) l'utilisation d'espèces de souris utilisées à des fins scientifiques, caractérisés par une faible variation génétique permet de limiter la variabilité de la réponse biologique et par conséquent le nombre de souris. (ii) l'effectif de chaque groupe a été déterminée par une approche statistique. (iii) Nous avons fait le choix de tester les composés alimentaires uniquement sur les animaux dénutris avec une entéropathie, limitant ainsi le nombre d'animaux. (iv) Utilisation de méthodes non-invasives comme la mesure d'un marqueur inflammatoire fécal pour limiter le nombre d'animaux. Différentes approches nutritionnelles seront évaluées. De même, la mesure de la composition corporelle par EchoMRI ne nécessite pas l'utilisation d'anesthésiants.

Ce projet de Recherche permettra de répondre à des questions fondamentales dans le contexte de la malnutrition sévère et de proposer de nouvelles options thérapeutiques pour prévenir ou inhiber l'altération de la fonction de barrière intestinale qui limite actuellement le bénéfice des approches thérapeutiques et qui peut contribuer au cercle vicieux de la dénutrition.

17925 La conception et la production de systèmes de délivrance de médicament, notamment via l'injection sous cutanée tend vers une utilisation élargie car elle permet au patient de prendre son traitement à domicile et non plus en milieu hospitalier (via une injection intraveineuse).

Les traitements utilisent de plus en plus des anticorps monoclonaux. Ces anticorps sont des molécules complexes de grande taille qui nécessitent une grande dilution. Les volumes injectés ont tendance à augmenter jusqu'à 10 mL voir 20 mL dans certains cas. Les temps d'injection augmentent en parallèle jusqu'à 30 min, voire 1h.

Afin de développer un système d'injection confortable pour le patient, l'injecteur doit aussi présenter une taille minimale, la moins encombrante possible, et doit pouvoir injecter dans un temps déterminé à l'avance. Pour cela, le dispositif doit pouvoir assurer une vitesse d'injection régulière. Le moteur doit donc être dimensionné correctement afin de fournir une puissance suffisante pour pouvoir injecter régulièrement.

Dans le cadre du développement de ce dispositif médical, nous cherchons à connaître la contre pression liée à l'injection d'un médicament. Cette contre-pression est un facteur important dans la conception du dispositif car la valeur de cette contre-pression peut impacter de moyennement à fortement la conception du dispositif ainsi que les composants choisis pour administrer le médicament. La contre pression peut varier suivant plusieurs facteurs liés à la physiologie de l'individu, du médicament (viscosité, volume), de la manière d'injecter le médicament (débit de l'injection). Ces facteurs sont pour la plupart propres au dispositif développé. Dans la littérature (articles scientifiques, thèses...), il est difficile de retrouver ces données qui sont spécifiques à notre dispositif.

L'objectif premier serait donc de quantifier cette contrepression réelle lors d'une injection de 20 mL d'une durée de 30 min (faible débit) de manière à dimensionner notre dispositif correctement (taille, moteur, batterie...).

Un objectif secondaire serait de vérifier la présence d'un gonflement de la peau au point d'injection, ainsi que le reflux du liquide lors du retrait de l'aiguille (ces deux phénomènes étant liés à la pression tissulaire).

Le porc est l'animal dont la physiologie de la peau se rapproche le plus de l'être humain. Cette étude sera donc effectuée sur deux porcs. Une solution stérile d'une viscosité définie sera injectée en sous-cutané à chaque porc dans la région abdominale et/ou inguinale à intervalle de 2 à 4 jours pendant une durée de 5 à 6 semaines afin d'avoir 10 points d'injections par animal. Avant chaque injection les porcs seront anesthésiés. La mesure de la contre-pression sera réalisée à l'aide d'un capteur. Après chaque essai la zone où le médicament a été injecté sera photographiée et mesurée (diamètre et hauteur). A la fin de cette étude les deux porcs seront euthanasiés. Il y a une seule étude avec 2 porcs.

Les expérimentations seront menées à bien selon le principe des 3R.

Raffiner : Les 2 porcs seront maintenus en groupe pour laisser libre court à leurs interactions sociales dans une case, l'animalerie sera sous contrôle de la température adapté à ces animaux ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). Une surveillance quotidienne des animaux sera mise en œuvre afin de veiller à leur bien-être. Certaines procédures seront réalisées avec une récompense alimentaire (banane, compote. . .). Les animaux seront sous anesthésie générale avec une ventilation mécanique assistée, ils seront aussi monitorés pour le suivi de leurs paramètres physiologiques et ainsi surveiller au mieux son anesthésie et pouvoir réagir rapidement.

Réduire : les animaux sont au nombre de 2 afin d'éviter un isolement. Le nombre répété d'injections sur le même animal permettra d'avoir plusieurs points (10 injections par animal). Le nombre de points par animal est calculé de façon à avoir une représentativité statistique suffisante.

Remplacer : Ce projet vise à étudier la contre-pression de l'injection d'un produit (grand volume) en sous-cutanée en tenant compte de la physiologie de la peau dans son ensemble, cet objectif ne peut être évalué qu'à l'aide de modèles animaux.

17926 Le cancer est la deuxième cause de mort dans le monde responsable de 9. 6 millions de décès en 2018. Différents traitements sont disponibles pour le cancer mais l'exérèse chirurgicale de la tumeur primitive est la plus fréquente pour les tumeurs solides. Pendant cette période, l'utilisation des anesthésiques généraux sont souvent combinés à des anesthésiques locaux (AL) pour un meilleur contrôle de la douleur.

Des études rétrospectives ont suggéré un possible rôle anti tumoral des AL après observation d'une diminution de récurrences métastatiques et une meilleure survie chez les patients ayant reçu ces produits. Ainsi, des études ont démontré in vitro que les AL peuvent induire la mort de cellules tumorales, cependant des données in vivo sont encore limitées. Ce projet a pour but d'établir une preuve d'efficacité des AL contre la progression tumorale dans des modèles animaux. Nous réaliserons des expériences de croissance tumorale avec des souris traitées avec les AL seuls ou combinés à des agents anti cancéreux et nous évaluerons l'impact sur la progression de la tumeur. Ce projet a été conçu en respectant le principe de bioéthique (3R) qui vise à réduire les nombres des animaux, à raffiner la méthodologie utilisée et à remplacer les modèles animaux quand il est possible.

Remplacement : Cette étude ne peut être faite que sur des modèles animaux car il n'y a pas des méthodes alternatives meilleures pour mimer toute la complexité qui est impliqué dans la croissance tumorale (système vasculaire, système immunitaire, environnement de la tumeur). En plus, l'efficacité des traitements généralement passe par différents paramètres physiopathologiques (interaction des cellules immunitaires avec des cellules tumorales, inflammation, stress, métabolisme des drogues, etc), lesquels sont difficiles d'établir dans la culture cellulaire ou dans des modèles informatiques.

Réduction : Ce projet utilisera un nombre maximal de 630 souris. Les différents traitements planifiés seront regroupés quand il est possible pour diminuer la quantité des souris contrôles requises. Les protocoles d'expérimentation ont été déjà bien établis dans notre laboratoire ce qui évitera l'utilisation des souris pour mettre au point les expériences prévues.

Raffinement : Pour maximiser le bien être des souris, elles seront mises dans des boîtes appropriés avec de la nourriture et de l'eau ad libitum et posséderont des enrichissements de milieu tels que des nids végétaux ou des tunnels en cartons. Avant le début de l'expérience, les souris seront

gardées pendant 7 jours pour leur acclimatation afin de réduire le stress associé à un nouvel environnement. Pour réduire la douleur et l'angoisse, les injections de cellules tumorales et des traitements seront faits sous anesthésie générale et des points limites précoces sont établis pour éviter la souffrance inutile mise en évidence par une perte excessive de poids, diminution de la température corporelle, respiration irrégulière, léthargie ou réticence à se déplacer, isolation du groupe, posture voûtée et absence de toilettage.

17927 Le calcium (Ca^{2+}) est un second messager essentiel et omniprésent dans la cellule. Les changements dans la concentration de Ca^{2+} cytosolique déclenchent des événements critiques pour la tumorigenèse, tels que la motilité cellulaire, la prolifération et l'apoptose. La régulation dynamique de la signalisation Ca^{2+} est obtenue par la coopération de divers composants cellulaires, notamment des récepteurs, des canaux, des transporteurs, des protéines tampons et des effecteurs en aval. Ainsi, une activation inappropriée des canaux d'afflux de Ca^{2+} ou une régulation à la baisse des mécanismes d'efflux et de séquestration de Ca^{2+} pourraient augmenter le niveau calcique basal pour augmenter la signalisation du Ca^{2+} et la prolifération des cellules tumorales.

Le cancer représente la première cause de morbidité dans les pays industrialisés. La prise en charge du cancer repose sur des protocoles de chimiothérapie, et en dépit de la mise au point régulière de nouvelles thérapies, il reste malheureusement incurable. Cette maladie se caractérise par une survie accrue des cellules cancéreuses et une résistance à l'apoptose. Ces deux mécanismes sont associés à des défauts de régulation de l'homéostasie calcique. C'est dans cette optique que se positionne notre projet de recherche; nos études récentes ont clairement mis en évidence des perturbations de la signalisation calcique dans trois types de cancer : la leucémie aiguë lymphoblastique, le neuroblastome et le cancer du sein. Ainsi, nous avons identifié les molécules responsables de cette dérégulation calcique dans ces cancers et que l'utilisation des inhibiteurs dirigés étaient efficaces *in vitro* pour corriger ces anomalies. Ce projet a pour objectif principal de proposer une alternative thérapeutique en utilisant des anticorps ou inhibiteurs spécifiques qui ciblent ces molécules responsables de cette dérégulation calcique dans ces cancers.

Le but général de cette étude est d'évaluer au mieux l'efficacité des ces anticorps ou inhibiteurs spécifiques tant d'un point de vue de correction du défaut de l'homéostasie calcique que de leur efficacité thérapeutique. Dans cette optique, le protocole expérimental vise à effectuer une chimiothérapie de nos anticorps ou inhibiteurs spécifiques afin d'évaluer leurs efficacités. Malgré les progrès considérables des traitements conventionnels, ces derniers sont confrontés à un phénomène de résistance responsable chez de nombreux patients d'une rechute ou d'une évolution rapide de la maladie. Il est donc important d'étudier ces phénomènes de résistance appréciable à travers une thérapie combinée. Ainsi, nos anticorps ou inhibiteurs seront combinés avec la dexaméthasone pour la leucémie, le trioxyde d'arsenic pour le neuroblastome et la doxorubicine pour le cancer du sein.

L'intégralité de cette étude sera réalisée chez la souris femelle, en effet, les mâles élevés en communauté malgré un environnement *had oc* et enrichis ont tendance à se battre. Deux lignées seront utilisées à savoir :

-NSG® souris (JAX™ Mice Strain)

-BALB/c-nude Immunodéficiente

Cette demande d'autorisation de projet comporte 3 procédures :

- Etude de l'efficacité antitumorale (Leucémie aiguë lymphoblastique, LAL)

Souris NSG. Nous aurons 4 études à réaliser composées au total de 17 groupes à raison de 6 souris par groupe soit 102 souris. Le but de cette étude est d'évaluer l'efficacité anti-tumorale des inhibiteurs seuls ou combinés avec la dexaméthasone.

- Etude de l'efficacité antitumorale (Neuroblastome)

Souris BALB/c-nude. Nous aurons 2 études à réaliser en utilisant 24 souris par étude. Chaque étude est composée de 4 groupes, et 6 souris par groupe soit au total 48 souris. Le but de cette étude est d'évaluer l'efficacité anti-tumorale des inhibiteurs seuls ou combinés avec le trioxyde d'arsenic.

- Etude de l'efficacité antitumorale (Cancer du sein)

Souris BALB/c-nude. Nous aurons également 2 études à réaliser en utilisant 24 souris par étude. Chaque étude est composée de 4 groupes, et 6 souris par groupe soit au total 48 souris. Le but de cette étude est d'évaluer l'efficacité anti-tumorale des inhibiteurs seuls ou combinés avec la doxorubicine.

Pour l'ensemble de la demande d'autorisation de projet 198 souris seront prévues sur 2 ans.

Au regard du respect de la règle des 3R, les souris seront élevées en communauté dans une animalerie agréée, où les conditions d'hébergement sont contrôlées : température, hygrométrie, cycle jour/nuit, change et nourriture. Le nombre d'animaux nécessaires est réduit au minimum en tenant compte de la variabilité des mesures entre les souris du même groupe permettant une analyse statistique significative. Plusieurs screening et évaluations (efficacité, cytotoxicité, etc.) in vitro des différents traitements sur des lignées cellulaires ont été effectués et en dehors du modèle silico qui ne permet pas de remplacer le modèle in vivo pour l'étude de nouvelles thérapies, nous souhaitons valider ces résultats in vitro au sein d'un organisme vivant et avons choisi le modèle murin comme méthode alternative.

Une échelle de gravité des symptômes observés permet d'établir un point limite dans l'ensemble des expériences. Ces points limites permettant d'identifier le moment à partir duquel la souffrance et/ou la détresse de l'animal doit être arrêtée.

17928 Le cancer est désormais la première cause de mortalité dans les pays développés, devant les pathologies cardiovasculaires. Dans ce contexte, l'objectif de nos recherches est le développement de nouvelles techniques d'imagerie pour évaluer la réponse aux traitements anti-cancéreux et permettre d'adapter les traitements de façon la plus individualisée possible à chaque patient grâce à un examen indolore d'imagerie médicale.

Au cours de nos travaux d'imagerie, nous distinguerons 2 approches distinctes :

1°) Approche diagnostique : cette stratégie permet d'identifier une caractéristique particulière propre à une tumeur donnée, comme par exemple la surexpression d'une protéine qui sera la cible du futur traitement. Pour cela, nous identifierons la molécule se liant le mieux possible à la cible choisie (protéine surexprimée), puis nous y ajouterons une molécule « signal » permettant sa détection (radioactivité ou fluorescence). Toutes ces étapes menées sur culture cellulaire permettront également de vérifier l'absence de toxicité du traceur développé. Ce n'est qu'ensuite que nous administrerons ce traceur par voie intraveineuse à des souris afin de suivre celui-ci dans le temps par imagerie nucléaire ou fluorescence corps entier (qui va détecter la molécule signal grâce à des caméras spécifiques, identiques à celles utilisées chez l'homme) et de vérifier qu'il se lie bien spécifiquement à la tumeur.

2°) Approche thérapeutique : cette stratégie permet d'évaluer dans le temps l'efficacité de molécules anticancéreuses en suivant l'évolution d'un traceur d'imagerie tumorale. Il est ainsi possible dans certains types de cancer de détecter l'efficacité d'un traitement très tôt (après seulement une cure de chimiothérapie) avant que le volume de la tumeur commence à diminuer. Cette technique permet également de modifier le traitement s'il n'est pas assez efficace. Dans notre travail, nous essaierons d'élargir cette technique à de nouveaux types tumoraux. Pour cela, des souris porteuses de tumeurs seront traitées par un médicament anticancéreux et des imageries hebdomadaires seront réalisées pendant la période de traitement afin de vérifier si le marqueur d'imagerie est modifié avant que la taille de la tumeur soit réduite.

Pour chaque étude diagnostique qui a pour but de développer de nouveaux outils d'imagerie moléculaire pour la détection de biomarqueurs des cancers (estimées à 3 études par an), nous formerons 2 groupes d'animaux (n=10 animaux par groupe, n=20 animaux par étude) recevant le traceur d'imagerie libre ou lié à la molécule ciblante étudiée. Pour chaque étude thérapeutique qui permet de valider l'effet de nouveaux anticancéreux via l'utilisation de l'imagerie moléculaire

(estimées à 2 études par an), nous formerons 3 groupes d'animaux (n=10 animaux par groupe, n=30 animaux par étude) qui seront traités par le véhicule ou la molécule d'intérêt à 2 doses distinctes. Sur 5 ans nous estimons donc le nombre d'animaux à n=600 souris.

La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R. Tout d'abord, en comparaison avec une étude « classique » qui nécessite l'euthanasie des animaux à chaque point de temps examiné, l'imagerie nous permet de répéter l'imagerie à différents temps chez le même animal et donc de réduire le nombre d'animaux d'autant. L'étude préalable des molécules d'intérêt sur culture cellulaire permet de s'affranchir de l'utilisation d'animaux non justifiée (remplacement). Enfin, la totalité des procédures impliquant les animaux (injection sous-cutanée, intraveineuse et imagerie) est réalisée sous anesthésie suivie d'un réveil sous lampe chauffante réduit l'inconfort potentiel à son minimum permettant ainsi le raffinement de l'étude.

17929 La sclérose latérale amyotrophique (SLA) et la démence fronto-temporale (DFT) sont deux maladies neurodégénératives fatales qui restent actuellement incurables. Le risque de développer ces maladies au cours de la vie est de 1/1000. Ces maladies sont caractérisées par une dégénérescence de certains types de neurones. La SLA se manifeste par une paralysie progressive qui entraîne la mort du patient dans les 3 à 5 ans suivant le diagnostic. La DFT se manifeste par des anomalies du comportement qui sont retrouvées également dans certains patients SLA. Des analyses anatomopathologiques ont montré que les patients souffrant de la SLA et de DFT présentent des agrégats de protéine FUS dans leurs cellules, et notamment dans les oligodendrocytes : des cellules de soutien des neurones. Une mutation dans le gène FUS entraîne une forme précoce et particulièrement fulgurante de la maladie. Nous avons récemment caractérisé une souris transgénique présentant la mutation FUS. A présent nous souhaitons utiliser des modèles de souris transgéniques où la mutation de FUS peut-être induite ou retirée dans un type cellulaire donné. Nous analyserons alors si la mutation de FUS dans les oligodendrocytes est suffisante ou nécessaire pour le développement de symptômes moteurs et cognitifs. Pour cela, nous ferons passer des tests comportementaux à nos animaux, avant d'étudier la dégénérescence des neurones en cas de mutation FUS uniquement dans les oligodendrocytes, ou bien dans tous les types cellulaires sauf les oligodendrocytes.

Les souris seront laissées à plusieurs par cage et un enrichissement sera mis à disposition.

Dans la perspective du respect de l'approche des 3 R, nous avons réduit le nombre de souris utilisées. Nous proposons d'utiliser un maximum de 247 souris. La compréhension des mécanismes derrière la pathogénicité de la mutation FUS pourrait permettre de développer de nouveaux traitements qu'il serait possible de proposer aux patients pour affronter cette maladie jusqu'alors incurable.

- Remplacer : La modélisation de la SLA/DFT nécessite la présence d'un réseau nerveux complet (terminaisons nerveuses, nerfs, moelle épinière et cerveau), il n'est pas possible de remplacer le modèle murin par des modèles in silico ou in vitro. Nous allons réaliser une étude comportementale longitudinale de ces souris pour évaluer la coordination motrice.

- Réduire : Grâce à une connaissance du modèle associée à la puissance du test statistique utilisé, nous considérons que 8-10 animaux par groupe expérimental sont suffisant pour observer ou non un effet significatif. De plus, l'utilisation d'animaux consanguin limite la variabilité phénotypique.

- Raffiner : Les animaux sont maintenus en groupe social dans un environnement enrichi (nid, matériel à ronger). Nous avons défini des points limites clairs nous permettant d'intervenir de manière adéquate en cas de souffrance de l'animal.

17930 Alors que les adénomes cortico-surréaliennes (ACS) sont fréquents affectant 3 à 7% de la population de plus de 50 ans, les carcinomes (CCS) sont rares avec 0.5 à 2 nouveaux cas par an et par million. Ils sont cependant agressifs avec un taux de survie à 5 ans de moins de 40%. De plus, les ACS et CCS peuvent sécréter en excès une ou plusieurs hormones cortico-surréaliennes induisant ainsi des désordres métaboliques importants dont de l'hypertension artérielle. Afin

d'améliorer le diagnostic et le traitement de ces tumeurs, il est nécessaire de mieux comprendre leur cause génétique. C'est dans ce cadre que s'inscrit ce projet qui a pour but de caractériser nos modèles murins reproduisant 4 altérations génétiques identifiées dans les ACS et CCS humains.

Les 5 procédures présentées ici ont été inspirées des tests de diagnostic utilisés chez l'Homme afin de déterminer s'il existe chez nos modèles, une dérégulation de la fonction surrénalienne se traduisant par une hypersécrétion hormonale et/ou un développement de tumeurs cortico-surrénales. Le cortex surrénalien sécrétant à la fois de la corticostérone et de l'aldostérone chez la souris, nous avons élaboré 3 procédures qui ont comme principal objectif de déterminer si la régulation et la sécrétion de corticostérone sont altérées dans nos modèles et une qui est quant à elle focalisée sur la sécrétion de l'aldostérone. Les différents résultats obtenus ici, nous permettront de déterminer si nos altérations entraînent une hypersécrétion hormonale et donc si les gènes altérés sont normalement impliqués dans la régulation de la fonction surrénalienne. D'autre part, afin de déterminer si nos modèles murins développent une tumeur cortico-surrénalienne, nous analyserons si le nombre de cellules en prolifération est augmenté dans nos modèles ce qui serait un signe d'un potentiel développement tumoral.

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 1140 souris. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé reposant sur les principes de la « règle des 3 R ».

Remplacement : nous avons remplacé l'utilisation de modèles murins par des analyses in vitro quand cela était possible.

Réduction : nous limitons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables.

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

L'ensemble de ces analyses permettra de déterminer le rôle joué par un ou plusieurs de nos 4 gènes candidats dans le développement tumoral et dans la régulation de la fonction cortico-surrénalienne.

17931 La malnutrition chronique chez l'enfant est un problème majeur de santé publique dans les pays en développement, touchant aujourd'hui plus de 150 millions d'enfants dans le monde. Les conséquences à long terme sont particulièrement délétères, notamment marquées par un retard de croissance ainsi que des déficits neurocognitifs et immunitaires qui persistent à l'âge adulte. De nombreuses études suggèrent que les macronutriments critiques dans cette période de la vie des enfants sont les protéines. Ainsi, chez le rongeur, une alimentation appauvrie en protéines induit notamment un retard de croissance.

Des études récentes suggèrent un lien fort entre la composition du microbiote intestinal (anciennement appelé flore intestinale) et le régime nutritionnel. En particulier, une intervention probiotique chez le rongeur dans un contexte de malnutrition, permet de compenser partiellement le retard de croissance chez le juvénile. La paroi de l'intestin est composée notamment de cellules appelées cellules entéroendocrines, elles représentent 1% de cette paroi et sont impliquées dans la perception du contenu de l'intestin. Elles constituent le plus gros organe endocrine du corps et elles sont fondamentales au maintien de l'homéostasie métabolique (processus de régulation permettant le maintien des différentes constantes du milieu intérieur entre les limites des valeurs normales). En réponse à des signaux mécaniques ou chimiques, tels que des métabolites ou des molécules de surface provenant du microbiote, elles libèrent différentes hormones. Ces hormones jouent un rôle de médiateurs qui peuvent agir sur l'ensemble de l'organisme, mais aussi localement sur les neurones localisés dans l'intestin appelés neurones entériques ou sur d'autres cellules constituant la paroi intestinale. Les cellules entéroendocrines régulent ainsi la motilité intestinale

(mouvements de contraction de l'intestin), l'absorption des nutriments ou encore l'effet barrière de la paroi intestinale. L'objectif de cette étude est d'étudier l'effet d'un probiotique (c'est-à-dire un micro-organisme vivant qui, lorsqu'il est ingéré en quantité suffisante, exerce des effets positifs sur la santé, au-delà des effets nutritionnels traditionnels) sur la mise en place et les fonctions physiologiques des cellules entéroendocrines dans un contexte de malnutrition protéique chez des souris juvéniles, génétiquement modifiées sans impact dommageables pour l'animal.

Dans un premier temps, il s'agira de nourrir des souris exprimant une molécule fluorescente dans les cellules entéroendocrines après le sevrage avec un régime appauvri en protéines afin de mettre les souris dans un contexte de malnutrition pour comprendre l'effet de la malnutrition sur le développement et le fonctionnement des cellules entéroendocrines. Dans un second temps, après des apports oraux du probiotique pour lesquels l'hypothèse est qu'une intervention probiotique permettra de restaurer partiellement les déficits observés dans ce contexte de malnutrition, le développement et le fonctionnement des cellules entéroendocrines sera également étudié. ce régime alimentaire appauvri en protéines est isocalorique (apporte le même nombre de calories que le régime alimentaire d'entretien de l'animalerie), il n'induit donc pas de sensation de faim, de douleur ou de stress, lorsqu'il est administré à des juvéniles de plus de 8 g.

Pour ce projet, le respect de la règle des « 3R » sera appliqué :

Remplacement :

Aucun modèle *in vitro* ne permet de reproduire la complexité d'un organisme dans son entier dans un contexte de malnutrition et pour l'étude des cellules entéroendocrines de l'intestin entier. C'est pourquoi cette étude nécessite l'expérimentation animale. La souris sera utilisée car il s'agit d'un bon modèle pour étudier les modifications induites par une malnutrition protéique sur les cellules entéroendocrines dans un contexte physiologique, ainsi que les conséquences locales et systémiques de ces modifications ainsi qu'une étude ciblée de cellules entéroendocrines.

Réduction :

Le nombre de souris nécessaire a été réduit à son maximum afin que la taille de l'échantillon permette de dégager des résultats statistiquement fiables, c'est pourquoi ce projet nécessitera 80 souris.

Raffinement :

Les soins et la disponibilité des aliments seront adaptés en fonction de l'âge des animaux pour leur bien. L'usage du régime appauvri en protéines a déjà été testé et n'induit pas de comportement agressif chez les juvéniles.

Des points limites seront définis pour être assez prédictifs pour palier à toute souffrance, à tout mal être ou au stress animal, les expérimentations ne seront pas poursuivies au-delà de l'apparition de ces points limites.

17932 Les tumeurs cérébrales constituent la première cause de mortalité et de morbidité par cancer chez l'enfant. Actuellement, la durée de survie moyenne après diagnostic d'un patient atteint d'un gliome infiltrant du tronc cérébral (DIPG) est de 9 mois. Ces tumeurs pédiatriques sont les formes les plus graves et les plus mal connues sur le plan biologique. Les DIPG ne forment pas de masse tumorale distincte mais infiltrent différentes structures cérébrales. Ces propriétés d'invasion et sa localisation profonde dans le tronc cérébral sont une cause d'échec des chimiothérapies mais aussi l'inefficacité du traitement conventionnel qu'est la radiothérapie. Ces tumeurs sont incurables et constituent à ce jour, le plus grand défi thérapeutique de l'oncologie pédiatrique.

La compréhension de ces tumeurs demeure un challenge afin d'identifier leurs propriétés d'infiltration. L'étude des interactions entre la tumeur et son microenvironnement jouent un rôle important dans la résistance aux traitements. Cependant, l'utilisation de modèle alternatif type culture cellulaire ne nous permettent pas d'étudier le comportement tumoral dans son propre environnement. La complexité de ces interactions ne peuvent être étudiés exclusivement que dans des modèles *in vivo*.

Compte tenu de la rareté du matériel tumoral, le développement de modèles murins xenogreffés à partir de cellules tumorales provenant de patients atteints de gliomes reste décisif.

Ces cellules implantées dans le cerveau de souris feront l'objet d'un suivi par imagerie afin de suivre l'évolution de la pathologie au cours de temps. Cette méthode d'imagerie est non invasive et permet une réduction du nombre d'animaux utilisé.

Afin d'obtenir un panel de modèles reflétant la variabilité inter-tumorale pour les différents types tumoraux, nous grefferons la totalité des tumeurs qui seront mises à notre disposition. Pour chaque nouvelle tumeur, nous grefferons au maximum 10 souris. Nous recevons 20 tumeurs par an maximum, il est donc prévu pour le développement de nouveaux modèles un maximum de 600 souris sur 3 ans. Nombre d'animaux défini par test statistique pour l'obtention de résultat fiable.

Les souris seront hébergées en groupe avec un accès à l'eau et la nourriture ad libitum et leur environnement sera adapté et enrichi pour apporter un maximum de confort. Pour limiter les douleurs, toutes les procédures seront réalisées sous anesthésie générale et un antalgique sera administré dès l'apparition des premiers signes cliniques. Des points limites précoces ont été établis pour réduire la souffrance de l'animal et seront strictement respectés.

17933 Ce projet consiste à évaluer l'activité antitumorale de différentes approches thérapeutiques dans des modèles de tumeurs obtenues par greffe de matériel biologique d'origine tumorale dans les tissus superficiels (en général sous-cutanés) de rongeurs (rat ou souris), la souris étant l'espèce animale la plus utilisée.

Une masse tumorale se forme alors progressivement au site d'implantation. L'efficacité antitumorale d'une approche thérapeutique est déterminée par l'évolution de la croissance tumorale chez des animaux traités par rapport à des animaux non traités (ou recevant le placebo ayant servi à formulation des produits testés) ou recevant un traitement de référence.

Le nombre prévisionnel maximum d'animaux est de 3600 souris et 1200 rats.

La conception de ce projet prend en compte la règle des 3R.

Remplacement : Malgré l'effort constant de développement de méthodes alternatives pour limiter le recours à l'expérimentation sur les animaux, il existe actuellement de nombreuses questions scientifiques en oncologie, notamment concernant l'évaluation pharmacologique des candidats médicaments anti-tumoraux, auxquelles il n'est possible de répondre que par l'étude de la croissance de tumeurs in vivo. Il n'existe effectivement pas de méthode de substitution adaptée (in vitro ou in silico) pour répondre aux objectifs de ce projet. A ce jour, la souris et le rat sont les espèces qui sont les plus adaptées à ce type de modèle d'étude.

Réduction : Un nombre minimal et suffisant d'animaux par groupe est utilisé afin d'analyser de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et d'effectuer des analyses statistiques.

Raffinement : dans ce projet, le raffinement sera obtenu par :

- . le recours à des procédures les moins invasives possibles et moins douloureuses possibles (par exemple, le suivi non-invasif des tumeurs notamment par imagerie)
- . le suivi d'éventuel signes cliniques
- . la détermination des points limites
- . le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.
- . un protocole analgésique adapté pour la chirurgie d'excision de tumeur et pour la période post-opératoire associé à un suivi de l'état de santé des animaux avec des soins et un enrichissement adaptés afin de permettre une bonne récupération des animaux.

17934 L'alimentation des vaches laitières fortes productrices conduit aujourd'hui à utiliser des quantités importantes de protéines dans leur alimentation qui, lorsqu'elles sont données en excès, conduisent à des rejets azotés qui posent des problèmes environnementaux. Une réduction modérée de l'apport protéique aux vaches est un levier intéressant pour limiter les rejets azotés et augmenter l'efficacité d'utilisation des protéines ingérées par les animaux. Cependant, cette réduction conduit

généralement à une baisse d'ingestion des animaux et de production de lait, ce qui est un frein pour utiliser ces pratiques. Pour limiter cette baisse de production de lait, il est important de mieux maîtriser la nature des nutriments apportés dans les rations. Ainsi à court terme, chez les vaches en milieu de lactation, une meilleure maîtrise des quantités d'amidon apportées dans l'énergie ingérée, comme une meilleure maîtrise de la nature des acides aminés apportés dans les protéines digérées, permet d'augmenter la production de protéines du lait et parfois le volume de lait sans augmenter l'apport total de protéines ou d'énergie à l'animal. Cependant, ni les effets de telles pratiques, ni de leur interaction n'ont été étudiés sur le long terme (du pic de lactation à la fin du milieu de la lactation). De plus, la plupart des essais portant sur la nature de l'énergie ou sur l'apport en acides aminés ont étudié les réponses des animaux à ingestion contrôlée.

Un essai d'alimentation sera conduit sur 48 vaches laitières en production, représentatives de celles rencontrées dans les élevages. Toutes les vaches seront conduites avec une alimentation apportant une quantité de protéines limitées conforme aux recommandations pour être économe en apport azoté. Les vaches recevront alors une alimentation énergétique plus riche en fibre ou en amidon croisée avec une alimentation protéique soit bien équilibrée dans le profil en acides aminés soit moins bien équilibrée. Ces travaux nécessitent des expérimentations *in vivo* car les réponses biologiques sur l'ingestion des acides aminés et de régimes plus riches en amidon ne peuvent être simulés précisément pour l'instant, en particulier à l'échelle d'une lactation. Les résultats obtenus novateurs sur l'ingestion et la compréhension des modifications du volume de lait contribueront ainsi à développer les modèles de prévision nécessaires au principe de "remplacement" des 3R. L'essai sera mené en continu pour éviter les potentiels effets rémanents d'un des régimes alimentaires sur l'ingestion et le volume de lait avec quatre lots de 12 vaches.

L'ingestion et la production de lait de chaque vache en réponse à une alimentation classique seront au préalable mesurées pendant une période pré-expérimentale. L'intégration de ces mesures préliminaires caractérisant chaque vache dans l'analyse statistique permet de réduire le nombre d'animaux à utiliser pour tester l'effet de la supplémentation en amidon ou en acides aminés des régimes. Le nombre de prélèvements sur les animaux sera également réduit au minimum pour effectuer un suivi longitudinal des animaux (1 prélèvement par mois) avec un focus à deux stades physiologiques particuliers (pic de lactation et fin du milieu de lactation). Ces deux derniers points permettront de répondre au principe de "réduction" des 3R. Enfin, une attention particulière sera portée au bien-être des animaux suivis (ingestion, état de santé général), et toute indication de mal-être des animaux conduira à les sortir de l'expérimentation, en accord avec le vétérinaire, respectant ainsi le principe de "raffinement" des 3R. Cette expérimentation se déroulera dans des conditions proches de celles d'un élevage classique, respectueux de l'environnement, contribuant à élaborer des modèles mathématiques d'alimentation fiables pour transposer ces résultats expérimentaux dans des pratiques d'élevages laitiers et inciter à réduire l'utilisation des protéines.

17935 Les prokinétines sont une famille de protéines récemment incriminée dans le développement de plusieurs pathologies, incluant la pré-éclampsie (PE) et une forme de démence de la maladie d'Alzheimer (MA) associée à cette pathologie de la grossesse. Cette famille de protéines compte deux membres. Le premier, canonique dénommé, EG-VEGF (endocrine gland derived vascular endothelial growth factor) et le second, BV8 (Bambina Variegata 8). EG-VEGF et BV8 se lient avec la même affinité à deux récepteurs transmembranaires, PROKR1 et PROKR2.

La PE est une pathologie qui touche 5 à 6% des grossesses suite à une hypoxie placentaire prolongée au-delà du premier trimestre de la grossesse. Elle est souvent diagnostiquée tardivement devant des signes de complications (Hypertension, œdèmes, éclampsie, affection cérébrales à long terme chez la mère, retards de croissance intra-utérins).

Nous nous intéressons au rôle de l'EG-VEGF, de BV8 et de leurs récepteurs dans le développement de la PE et aux effets de cette pathologie sur la fonction cérébrale, à long terme et aux effets directs de la protéine BV8 sur les fonctions cérébrales.

Nous avons récemment démontré que les taux d'EG-VEGF circulants étaient significativement plus élevés chez les femmes faisant une pré-éclampsie, particulièrement au 3ème trimestre de leurs

grossesses. Par ailleurs, des recherches très récentes ont démontré que la protéine BV8 serait associée au développement de la MA chez l'adulte.

Dans ce projet, nous émettons l'hypothèse que des dérégulations dans les niveaux circulants de la protéine EG-VEGF ou BV8, très tôt au cours de la grossesse (premier trimestre), seraient associées au développement de pathologies de la grossesse comme la PE avec des conséquences sur les fonctions cérébrales mimant le développement d'une démence s'apparentant à celle de la MA. Pour vérifier cette hypothèse, nous étudierons l'effet de l'EG-VEGF ou de son analogue, la protéine BV8 chez les souris invalidées pour la protéine BV8 ou pour la protéine EG-VEGF, respectivement. Afin de mieux caractériser leurs rôles respectifs dans la grossesse normale et pathologique, nous avons développé deux modèles de rongeurs invalidés pour la production d'EG-VEGF, ou BV8. Chez ces souris nous introduirons soit de l'EG-VEGF soit la BV8 afin de dissocier leurs rôles dans le développement de la PE.

Pour ce projet, 852 animaux seront nécessaires pour répondre à nos questions scientifiques, ce nombre correspond à un minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement fiables. Les animaux sont suivis quotidiennement afin de s'assurer de leur bon état général. Dans le cas d'observation de signes de souffrance, des molécules antalgiques seront distribuées.

Plusieurs études ont montré qu'il existe une grande similitude dans l'expression et la régulation des gènes clés de la placentation chez l'humain et le rongeur, que les prokinétines et leurs récepteurs sont exprimés dans des types cellulaires similaires et régulés de la même façon. L'appareil reproducteur des mammifères est régulé par des processus biologiques complexes que nous cherchons à déterminer, il est pour le moment impossible de reproduire toutes les expressions et régulation des gènes dans des systèmes in vitro.

Les animaux sont hébergés en groupe dans un milieu enrichi de maisonnettes et de carrés de coton ou papier pour faciliter la nidification.

17936 Intitulé du projet : Preuve d'efficacité d'un vaccin Pan-arénavirus du nouveau monde

Durée du projet : 5ans : Préparation du protocole d'expérimentation, réservation des animaux pour l'expérimentation, 3 mois de vaccination, 1 mois de challenge, analyses post-expérimentation et rédaction des publications associées.

Mots clés : Vaccination, Arénavirus du nouveau monde, Cynomolgus, protection

Finalité du projet : Recherche translationnelle et appliquée

Objectifs et bénéfices escomptés : Les Arénavirus du nouveau monde sont nombreux mais plusieurs d'entre eux sont à l'origine de fièvres hémorragiques à l'instar des virus Guanarito, Machupo, Sabia, Chapare et Junin. Un vaccin existe seulement pour ce dernier alors que les autres virus sont également responsables d'émergences sporadiques avec un taux de mortalité élevé pouvant atteindre les 30%.

La plateforme vaccinale a déjà prouvé son efficacité en protégeant des singes cynomolgus contre un challenge par le virus Lassa et par le virus Machupo.

L'objectif de ce nouveau projet est de démontrer son potentiel de protection contre les cinq Arénavirus pathogènes circulant en Amérique du Sud.

Le projet vise donc à :

- Démontrer l'innocuité du vaccin injecté
- Vérifier que la protection acquise contre le virus Machupo reste aussi efficace que lors de l'expérimentation précédente où les animaux n'avaient été vaccinés que contre ce virus.
- Vérifier la protection par un challenge avec un autre Arénavirus phylogénétiquement éloigné du virus Machupo pour démontrer qu'une protection est attendue contre l'ensemble des Arénavirus du nouveau-monde. En effet, si ce vaccin est à même de protéger efficacement contre deux virus génétiquement distants, nous pouvons attendre logiquement une bonne protection contre tous les virus d'intérêt. Ce procédé est le plus adapté car il est impossible de tester la protection contre tous les virus d'intérêt dans une même expérimentation.

- Vérifier l'absence d'effets adverses liés à la multiplicité des virus ciblés tels que la présence d'anticorps à même de faciliter l'infection. Un tel vaccin pourrait permettre de proposer une prophylaxie contre tous les Arénavirus du nouveau monde et ainsi être préparé pour lutter contre l'émergence possible de l'un de ces virus à fort potentiel épidémique. En effet, étant donné la faible fréquence des épidémies occasionnées par chacun de ces virus et le faible nombre de cas impliqués, il n'est pas raisonnable de développer des vaccins individuels contre chacun d'entre eux. La seule méthode rationnelle et pragmatique qui permet d'envisager un développement industriel d'un tel vaccin est de proposer un candidat qui permet de protéger contre l'ensemble des fièvres hémorragiques causées par les Arénavirus en Amérique du Sud. De plus, le large spectre de ce vaccin permettra de conférer une protection contre d'éventuels Arénavirus émergents, étant donné les protections croisées attendues.

Nuisances prévues :

12 macaques cynomolgus seront inclus dans ce protocole : 4 groupes de 3 animaux ; 6 animaux seront infectés par le virus Machupo et 6 avec le virus Guanarito et pour chacun des virus, 3 animaux auront été vaccinés et 3 resteront non-vaccinés. Aucun effet n'est attendu pour les 6 animaux vaccinés alors que les 6 animaux contrôles devraient présenter les symptômes décrits chez les humains suite à l'infection par ces virus.

Pour Machupo, d'après notre expérience précédente, une période critique est à prévoir entre J9 et J13 suite à l'apparition de symptômes. Des effets similaires sont attendus pour les contrôles infectés avec le virus Guanarito mais la littérature ne donne pas d'éléments à ce sujet. Les animaux seront observés quotidiennement et scorés selon une grille éprouvée lors de précédents projets, si un score de 15 ou un des points limites fixés au protocole est atteint les animaux seront immédiatement mis à mort.

Application de la règle des trois R :

Remplacement : L'immunogénicité de cette plateforme vaccinale a déjà été testée et validée in vitro. Cependant, la protection acquise grâce à ce vaccin ne peut être démontrée qu'in vivo ainsi que l'absence d'effets adverses liés à l'utilisation d'un vaccin multivalent. De plus, aucun modèle rongeur ne serait pertinent dans ce contexte, les rongeurs étant les réservoirs de ces virus, ils ne développent pas de pathologie comparable à celle observée chez l'humain, à l'exception de rongeurs immuno-déficients qui ne sont pas pertinents non plus dans le cadre d'une étude sur la réponse immune.

Réduction : L'immunogénicité de notre construction vaccinale a été testée in vitro et avec succès sur des cellules immunitaires. Son efficacité a ensuite été démontrée contre le virus Lassa en parallèle d'une autre construction vaccinale, le nombre d'animaux nécessaires a ainsi été optimisé car les animaux contrôles ont permis de tester plusieurs vaccins en parallèle.

Ce projet-ci a été prévu avec le minimum d'animaux indispensables pour conclure quant à l'efficacité du vaccin :

- 6 animaux non-vaccinés pour être challengés avec deux virus phylogénétiquement éloignés, soit 3 animaux 'contrôles' par virus

- 6 animaux vaccinés, soit 3 animaux challengés par virus, ce qui est le minimum pour réaliser des études statistiques sur les paramètres mesurés.

Des groupes de 3 animaux sont le strict minimum indispensable pour réaliser des tests statistiques à partir de nos résultats.

Raffinement : Afin d'assurer au mieux le bien-être des animaux, ils seront hébergés en volière par groupes de 3 dans un milieu enrichi avec des dispositifs permettant aux animaux de mettre en avant le plus possible un comportement naturel (perchoir, hamac, jeu, diversification alimentaire...).

Un scoring (éprouvé sur d'autres protocoles primates avec le virus Machupo) quotidien sera réalisé dès le J0 post infection, et des points limites ont été définis à l'avance (hypothermie, coma post anesthésie). Cela permettra de mettre fin à la procédure expérimentale pour les animaux qui atteindraient l'un des points limites fixés ou un score supérieur à 15 points. Par ailleurs, l'enregistrement permanent de la température grâce à des systèmes implantés permet une

meilleure analyse de la pathologie. Les animaux sont également visibles de l'extérieur du laboratoire grâce aux caméras permettant ainsi un contrôle visuel en dehors des horaires de présence du personnel dans le laboratoire.

17937 Avant toute commercialisation d'un médicament humain et vétérinaire/produit chimique/vaccin, il faut évaluer ses effets indésirables à des doses élevées. Les études toxicologiques ont pour but la détection de ces effets après administration unique puis répétée. La réglementation internationale requiert l'utilisation en recherche biomédicale d'une espèce non rongeur et rongeur. Chez ces mammifères (rats, souris, cochon d'Inde, Hamster. . .), on évalue les effets après un (effets aigus) ou plusieurs jours de traitement dont la durée varie en fonction de celle souhaitée/possible chez l'Homme. Pour les produits chimiques, le niveau de danger et de risque peut être associé directement aux résultats de ces études.

Ce projet (pour lequel il n'existe pas d'alternative in vitro) se résume en l'administration unique ou répétée (quotidiennement) d'un produit pharmaceutique/chimique chez le rongeur pour une durée de 1 jour à 1 année. La voie d'administration est celle utilisée chez l'homme (orale, nourriture, sous cutanée, intramusculaire, intraveineuse, intra articulaire, dermale...) pour les médicaments, ou la voie de contact possible pour les produits chimiques. Dans certaines études cutanées, les animaux peuvent être sensibilisés par l'application d'un patch. Des points limites sont définis de façon à éviter tout inconfort ou souffrance prolongée. Si nécessaire, un vétérinaire peut intervenir, mais si la souffrance est jugée trop importante et si aucun soin ne peut être apporté, il sera euthanasié selon une procédure éthiquement acceptable.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet peut être estimé à 40000 sur 3 ans. Il doit permettre d'obtenir des résultats représentatifs, prédictifs d'une toxicité, et exploitables statistiquement pour atteindre les objectifs des études. Le nombre d'animaux est déterminé a minima afin d'obtenir des résultats robustes statistiquement et ainsi atteindre les objectifs de l'étude. Parfois, des animaux suivent une phase sans traitement à l'issue d'une période de traitement afin d'évaluer la réversibilité des effets, et/ou font l'objet de prélèvements sanguins pour définir le profil cinétique de la molécule/métabolites.

Si nécessaire, l'administration du composé à tester est pratiquée sous anesthésie générale pour permettre une injection en toute sécurité et sans douleur (par exemple voie intra articulaire). Des souris transgéniques peuvent être utilisées.

L'hébergement (en groupe par défaut) des animaux en cages est conforme à la Directive 2010/63 avec enrichissement.

Les paramètres vivo sont enregistrés méthodiquement (par exemple les signes cliniques, poids corporel, consommation alimentaire, ophtalmologie) et des analyses hématobiochimiques et urinaires sont réalisées. Des prélèvements sanguins permettent d'établir un profil toxicocinétique. Après euthanasie, l'étude histopathologique (examen macroscopique et microscopique, pesée des organes majeurs) permet d'identifier une toxicité d'organes.

17938 La fréquence et le rythme cardiaque sont des facteurs très importants pour la qualité de la vie et la santé humaine. Définies comme des dysfonctions du rythme cardiaque, les arythmies sont des maladies très répandues avec des degrés de sévérité et gravité très variable, pouvant aller jusqu'à la mort subite. Parmi les arythmies les plus répandues, nous trouvons la bradycardie. Cette pathologie se caractérise par une fréquence cardiaque trop basse (avec risque de syncope) pour répondre à la nécessité physiologique de l'organisme notamment face à l'effort. Un état de fatigue chronique, des vertiges et des palpitations sont les symptômes invalidants de la bradycardie. Elle est plus répandue chez la population âgée, mais peut aussi affecter des jeunes individus. La seule thérapie actuellement disponible consiste en la pose irréversible d'un pace-maker électronique. Cette thérapie présente de nombreux inconvénients avec l'augmentation massive du nombre de patients traités, notamment à cause du vieillissement de la population. Ces inconvénients sont notamment une implantation irréversible, des coûts importants et une amélioration de la qualité mais pas de l'espérance de vie. Dans un avenir proche, il sera donc de plus en plus important de disposer des nouvelles stratégies thérapeutiques, tout particulièrement, des thérapies cellulaires basées sur

les cellules souches et des thérapies pharmacologiques. L'objectif étant d'améliorer la fréquence cardiaque et de retarder voir remplacer les pace-makers électroniques.

Notre projet vise à mieux comprendre le rôle physiologique de 4 gènes codant pour des canaux ioniques impliqués dans la genèse et la régulation de la fréquence cardiaque. Ces 4 canaux ioniques sont à l'origine de la rythmicité et contrôlent négativement la fréquence cardiaque sous l'action du nerf vague. Ils sont donc des candidats intéressants pour évaluer leurs intérêts en tant que nouvelles cibles thérapeutiques dans la prise en charge de la bradycardie. Ils pourraient même être à la base du développement de nouveaux pace-makers dits « biologiques » basés sur les cellules souches.

En utilisant des modèles de souris génétiquement modifiées pour différentes combinaisons de ces 4 canaux (17 lignées différentes), nous allons étudier la génération et la régulation de fréquence cardiaque. Cette étude se fera par l'enregistrement d'électrocardiogramme à l'aide de la télémétrie sur ces souris après différents traitements pharmacologiques connus pour réguler la fréquence et le rythme cardiaque.

Pour ce projet nous utiliserons 560 souris au total et nous appliquerons la règle des 3R notamment de la façon suivante :

Remplacement : La fréquence et les arythmies cardiaques sont des phénomènes complexes résultant des interactions entre les cardiomyocytes, dont l'activité électrique est normale ou altérée, les fibroblastes cardiaques (70% des cellules cardiaques) et le système nerveux autonome. Ce niveau d'intégration ne peut être obtenu que sur un modèle animal complexe. Dans le choix de ce modèle animal, la souris permet de répondre au mieux à nos questions sans avoir recours à des modèles plus proches de l'homme. Ainsi sans appliquer strictement la règle de remplacement nous avons choisis un modèle le plus acceptable pour nous apporter des résultats exploitables et transposables chez l'homme.

Réduction : Pour avoir une mesure fiable et statistiquement significative du paramètre de fréquence cardiaque, le nombre minimum d'animaux par lignée a été déterminé en se basant sur notre expérience, sur des analyses statistiques et sur les données bibliographiques. De plus, nous utiliserons à la fois les mâles et les femelles ce qui permet d'exploiter l'ensemble des animaux produits et la télémétrie permet que chaque souris utilisée est son propre contrôle statistique. Une rationalisation sur la production des génotypes nécessaires sera une partie importante de nos schémas d'accouplements pour la production de nos lots.

Raffinement. Toutes les lignées de souris que nous utiliserons ne présentent aucun signe de douleur dans nos conditions d'élevage (cages avec enrichissement selon la réglementation et notre SBEA). Afin d'étudier la fréquence cardiaque, nous avons choisi d'utiliser la télémétrie. Cette technique est simple à mettre en place et peu invasive ce qui n'interfère pas avec le comportement et réduit drastiquement la manipulation de l'animal. La chirurgie nécessaire pour l'enregistrement télémétrique de l'électrocardiogramme sera réalisée sous anesthésie avec une prise en charge analgésique adaptée à chaque étape avant, pendant et après la chirurgie. De plus les animaux ayant des implants seront hébergés avec d'autres souris non implantées (pour éviter toute interférence) ce qui permet de ne pas les isoler et ainsi réduire leur stress.

17939 Les Métalloprotéases Matricielles ou MMP, au nombre de 23 chez l'homme, appartiennent à la grande famille des protéases contenant plus de 500 membres. Les MMP, à l'instar de l'ensemble des protéases, catalysent la coupure d'une liaison au sein des protéines (protéolyse d'une liaison peptidique), conduisant à leur dégradation. Agissant essentiellement à l'extérieur de la cellule, les MMP sont ainsi capables de dégrader collectivement l'ensemble des composants de la matrice extracellulaire tels que le collagène et l'élastine. Il est aujourd'hui avéré que ces enzymes sont impliquées dans un grand nombre de processus biologiques qui vont bien au-delà du simple remodelage de la matrice extracellulaire. Elles jouent en effet un rôle clé dans l'implantation des embryons, durant les étapes de cicatrisation et d'ossification et lors du contrôle de la réponse immunitaire. Une activité protéolytique aberrante et non contrôlée des MMP est par ailleurs associée à i) de nombreuses pathologies chroniques à composante inflammatoire telles que

l'asthme, l'emphysème, les maladies pulmonaires obstructives chroniques, l'athérosclérose et l'arthrite rhumatoïde ainsi ii) qu'à la progression tumorale et la prolifération métastatique. Dans l'ensemble de ces processus physiopathologiques, le rôle des MMP demeure néanmoins difficile à appréhender en raison de leur intégration dans de multiples réseaux de protéases et de leur propension à dégrader une grande diversité de substrats peptidiques.

S'intéresser aux MMP comme cibles thérapeutiques pertinentes nécessite notamment d'identifier de façon non ambiguë quelles sont les MMP surexprimées au sein du tissu pathologique et quelles sont celles qui supportent effectivement le développement de la pathologie. Cette tâche est d'autant plus complexe que ces critères peuvent évoluer selon le stade de la pathologie. Les MMP sont également considérées comme des bio marqueurs et dans certaines situations comme des marqueurs spécifiques d'un stade particulier d'une pathologie.

En raison de sa similitude anatomique forte permettant une extrapolation aux conditions d'utilisation en pratique clinique chez l'homme, le rongeur est un modèle mammifère dont le profil pharmacologique permet une utilisation préclinique. Dans cet optique, nous proposons de développer plusieurs modèles murins au sein desquelles des MMP sont surexprimées : i) un modèle d'athérosclérose, ii) un modèle de maladies pulmonaires obstructives chroniques, iii) un modèle de péritonite et iv) un modèle métastatique de cancer du sein.

Dans le cadre de ce projet, nous proposons d'évaluer in vivo dans ces différents modèles, d'une part des petites molécules chimiques (sondes chimiques) permettant la détection sensible et spécifiques des MMP et d'autre part des anticorps dirigés contre les MMP et fonctionnalisés avec un cytotoxique. Si elles s'avèrent efficaces à détecter la présence d'une ou plusieurs MMP dans un fluide ou au sein d'un tissu pathologique, ces sondes chimiques constitueront la première étape vers le développement d'outils diagnostiques innovants. En parallèle, l'évaluation des anticorps conjugués à un cytotoxique permettra de proposer de nouvelles pistes thérapeutiques, notamment dans le traitement du cancer du sein.

Ce projet prévoit le recours à 612 animaux sur cinq ans. Ces animaux seront spécialement élevés à cette fin et proviendront d'élevages autorisés. Ce nombre a été réduit au minimum tout en gardant la puissance statistique nécessaire à l'obtention de résultats exploitables.

Bien que les méthodes expérimentales aient été choisies pour éviter toute souffrance aux animaux lors de leur mise en œuvre, l'application de critères d'arrêts et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe, selon les règles en vigueur dans l'animalerie, permettront de garantir leur bien-être. Leur état de santé sera surveillé tout au long de ces projets, ce qui permettra au vétérinaire de l'installation d'intervenir immédiatement et de manière appropriée si nécessaire.

17940 Le syndrome de la défaillance multiviscérale (SDMV), fréquemment rencontré en réanimation, est caractérisé par la défaillance simultanée ou consécutive d'au moins deux organes. C'est la conséquence ultime d'un grand nombre d'affections médicales ou chirurgicales entraînant des lésions tissulaires, comme les états de choc d'origine infectieuse, l'arrêt cardiaque, ou les suites d'interventions chirurgicales cardiovasculaires ou digestives majeures. Plus de la moitié des patients atteints de ce syndrome décèdent à l'heure actuelle. Toutefois, sa prise en charge est actuellement limitée au soutien pharmacologique ou mécanique des organes sans traitement de la cause sous-jacente. Dans un projet antérieur, le laboratoire a montré que l'utilisation d'un gaz noble, l'Argon, pouvait induire des effets protecteurs pour le rein et le foie dans un modèle de SDMV. L'intérêt de l'utilisation de ce gaz sur la scène clinique est très.

Afin de pouvoir mettre en place un essai clinique chez l'homme, les évaluations de la toxicité et du devenir dans l'organisme de l'Argon dans des modèles animaux sont indispensables afin de déterminer les doses utilisables et les effets potentiels du médicament.

Dans ce projet, nous utiliserons 18 rats sur une période de 6 mois. Du sang sera prélevé pour doser l'Argon, sans risque de douleur pour les animaux à ce moment compte tenu de l'anesthésie. Ces données ne peuvent pas être obtenues in vitro (absence de Remplacement possible). Le nombre d'animaux minimal a été déterminé afin de limiter autant que possible l'usage d'animaux

(Réduction). Les animaux seront sous anesthésie générale pendant toute la procédure (Raffinement).

17941 Le cancer de la prostate est le type de cancer le plus fréquent chez les hommes. Les différents traitements utilisés pour traiter ce type de cancer sont la chirurgie, la radiothérapie, l'hormonothérapie, et la chimiothérapie. Malgré ces nombreuses possibilités thérapeutiques, ce cancer reste la troisième cause de décès par tumeur chez l'homme (8 700 décès par an, selon la Haute Autorité de santé). Il est donc important de continuer à développer de nouveaux traitements. Dans ce contexte, nous avons obtenu in vitro des résultats très encourageants avec un nouveau composé chimique (appelé A196) en combinaison avec l'étoposide, une drogue conventionnelle validée en clinique pour le traitement du cancer. Il est maintenant nécessaire d'utiliser des souris pour (i) déterminer pour la première fois les doses maximum et limite tolérées du composé A196 in vivo et (ii) valider son effet thérapeutique seul et en combinaison avec l'étoposide sur des cellules cancéreuses humaines après greffes de manière sous-cutanée de souris mâles NOD/SCID. C'est l'objectif du projet associé à cette demande d'autorisation expérimentale.

La règle des trois R sera appliquée sur la base de nos expériences in vitro préalable (mesure d'efficacité de la drogue, des effets sur la survie des cellules) et en se basant sur des études antérieures pour des composés chimiques du même type que le composé A196. Cela nous permet ainsi de choisir avec soin le modèle murin approprié (souris mâle NOD/SCID), de déterminer le nombre minimum d'animaux dans chaque groupe expérimental, de ne réaliser que les expériences nécessaires, et d'optimiser l'utilisation des animaux en respectant les points limites adaptés à ce type d'expérimentation (surveillance quotidienne, évitement du stress et de la douleur animale, évaluation par grille de scoring et limitation du volume tumoral pour les animaux greffés). Afin de tenir compte des variabilités inter-animales et obtenir des résultats statistiques, ce projet nécessitera un nombre de 336 souris mâles NOD/SCID sur une durée de 36 mois.

17942 Ce projet s'inscrit dans le cadre d'essais précliniques destinés à évaluer le profil toxicologique de molécules auxquelles l'homme pourrait être exposé. Plus spécifiquement, ce projet a pour objectif d'isoler à partir de rat des cellules (hépatiques) ou organes (en particulier des organes endocriniens). Ceux-ci seront utilisés pour réaliser des cultures de cellules primaires destinés à cribler un grand nombre de composés au travers de tests toxicologiques in vitro.

Ce projet est prévu pour une durée de 5 ans et repose sur l'utilisation de rats. Ces animaux seront maintenus en acclimatation sans traitement. A l'issue de cette période, une procédure chirurgicale sera réalisée pour récupérer les cellules (ex : cellules hépatiques) ou organes d'intérêt (ex : glandes surrénales, testicules, ovaires...)

Pour l'isolement des ovaires, une synchronisation sexuelle des rates pourra être effectuée au préalable par administration d'un agent gonadotrope de référence.

Pour l'isolement des hépatocytes, une perfusion du foie sera réalisée sous anesthésie générale.

Cette procédure présente un bénéfice certain puisque l'utilisation de ces animaux permet de générer des cultures primaires et de tester par la suite un grand nombre de composés in vitro, l'objectif étant ainsi d'exclure rapidement les composés présentant un profil défavorable et d'éviter de les tester inutilement chez l'animal. Des tests in vitro peuvent être réalisées à partir de lignées cellulaires ; toutefois, ces cellules transformées peuvent conduire à des biais dans l'évaluation toxicologique.

Au total, ce projet prévoit 1200 animaux sur 5 ans, soit 240 rats par an. Cet effectif a été défini sur la base du nombre de composés à tester dans les essais de criblage et du nombre d'animaux nécessaires pour réaliser une culture cellulaire. Afin de réduire le nombre d'animaux, dans la mesure du possible, plusieurs organes seront collectés sur les mêmes animaux.

Les procédures (surveillance clinique, anesthésie, perfusion) seront effectuées par du personnel qualifié et expérimenté. Des points limites appropriés et validés par le comité d'éthique et la SBEA seront mis en place en vue dans chaque procédure.

17943 Malgré l'amélioration de la prise en charge chirurgicale et médicamenteuse des patients souffrant d'un infarctus du myocarde, les conséquences à plus long terme de l'infarctus sur la fonction du coeur demeurent considérables et la mortalité reste élevée chez ces patients. La compréhension des mécanismes limitant ou favorisant l'atteinte cardiaque constitue donc un enjeu thérapeutique et sociétal majeur.

Notre projet a pour but d'étudier, chez la souris, l'implication des cellules Natural Killer (NK) dans la réparation du coeur après un infarctus du myocarde. Ces modèles murins sont une étape indispensable dans la compréhension des mécanismes survenant au cours de l'infarctus du myocarde. En effet, ces événements sont des phénomènes complexes, que des modèles in vitro ne pourraient pas permettre de recréer. Ces modèles murins nous permettront notamment d'appréhender les multiples interactions entre différentes cellules, mais également entre différents organes, qui sont mises en jeu au cours des phénomènes de réparation tissulaire consécutifs à une atteinte cardiaque. Ce projet comporte 4 procédures qui impliqueront 900 souris au total sur une durée de 5 ans. Des souris génétiquement déficientes en cellules NK, dont le phénotype n'est pas dommageable, nous permettront d'analyser spécifiquement le rôle de ces cellules. Une procédure de reconstitution en cellules NK sera faite par une injection intraveineuse de cellules purifiées sous anesthésie générale 3 jours avant l'infarctus du myocarde. Enfin, une autre stratégie expérimentale complémentaire sera la déplétion en cellules NK chez des souris adultes immuno-compétentes par injection intrapéritonéale d'anticorps déplaçant le jour de l'infarctus du myocarde. Tous les animaux subiront un infarctus du myocarde par ligature coronaire. L'analyse consistera à étudier la fonction cardiaque par échocardiographie, le remodelage cardiaque et la réponse inflammatoire sur des tissus prélevés après mise à mort. Ce programme de recherche est développé dans le respect des règles éthiques des 3R:

1/ Remplacement : La culture cellulaire nous permet de tester nos hypothèses mécanistiques mais la complexité du coeur et de la maladie ischémique cardiaque nécessite l'utilisation d'un modèle animal.

2/ Réduction : Le nombre d'animaux utilisé sera réduit par l'utilisation de tests statistiques déterminant la taille minimale des groupes expérimentaux et permettant d'obtenir des résultats statistiquement interprétables pour atteindre l'objectif scientifique du projet.

3/ Raffinement : la souffrance animale sera réduite au maximum par le raffinement des méthodes expérimentales notamment l'utilisation d'anesthésie et d'analgésique adaptée durant les procédures, une surveillance régulière et l'établissement de points limites adéquats.

17944 Objectif du projet : Evaluer dans un modèle induit, les propriétés pharmacologiques et l'efficacité de molécules administrées par voie topique ou systémique (voies entérale ou parentérale) chez la souris dans le cadre du traitement de la dermatite atopique.

La dermatite atopique (DA) est une maladie inflammatoire de la peau touchant 10 à 20% de la population dans les pays développés, et son apparition est plus fréquente dans la petite enfance. Cette pathologie caractérisée par des lésions cutanées inflammatoires, des démangeaisons et une peau sèche (xérose) a un impact sévère sur la qualité de vie. Les traitements de première intention comprennent les glucocorticoïdes topiques ou les inhibiteurs de la réponse immunitaire type calcineurine, alors que les immunosuppresseurs systémiques sont utilisés pour les cas plus graves. L'efficacité et les effets indésirables de ces traitements actuellement disponibles n'étant pas toujours satisfaisants, de nouveaux traitements plus sûrs et plus efficaces continuent à être développés.

Avantages: l'ensemble des modèles expérimentaux utilisés dans ce projet est documenté de façon extensive dans la littérature scientifique et est déjà mis en œuvre au sein de nombreux laboratoires nationaux et internationaux. Nos données générés sur ces modèles contribueront à la fois à la validation de l'efficacité préclinique de nouvelles molécules à visée thérapeutique et l'étude des mécanismes d'action de médicaments actuellement utilisés, mais aussi permettront d'enrichir la caractérisation et la compréhension de ces modèles tant d'un point de vue anatomique que fonctionnel.

Domages escomptés: afin de mimer et d'induire un état inflammatoire et prurigineux similaire à celui retrouvé dans la DA, il est possible d'utiliser des agents exogènes (chimiques, biologiques) appliqués sur la peau ou injectés dans la peau. Cet état inflammatoire retrouvé chez des animaux exposés à des agents exogènes est susceptible d'entraîner un certain niveau d'inconfort pour les animaux (par exemple: démangeaisons, sensation de chaleur au niveau de la peau) qui est déjà identifié dans la littérature. Cet inconfort sera maîtrisé par le choix des doses du stimulus utilisé et par le recours à un produit analgésique si en adéquation avec le but de l'étude ou par un arrêt du traitement. Dans le cas où ces effets seraient importants des points limites stricts seront appliqués. Le bien-être des animaux ainsi « induit » sera attentivement suivi durant toute la durée de la phase expérimentale grâce à des fiches d'observation/points limites adaptés. Des procédures de prise en charge adaptées seront également mises en place. Des points limites préalablement définis permettront d'assurer un suivi de l'état général des animaux et de mettre en place des interventions précoces et adaptées en cas de souffrance animale.

Le port d'une collerette est recommandé pour l'application topique d'un produit (ceci afin d'éviter l'ingestion après léchage de la zone traitée). Cette collerette peut limiter l'accès à la nourriture et à l'eau de boisson ; le cas échéant, de la nourriture humidifiée serait mise directement dans la cage afin de limiter une éventuelle perte de poids. Une surveillance quotidienne sera également faite dans ce cas-là.

Méthodes alternatives (principe de remplacement): l'utilisation d'animaux vivants est justifiée par le fait que les modèles décrits dans ce projet visent à étudier les effets de molécules afin de prédire leur efficacité clinique. Même si des tests in vitro peuvent être réalisés au préalable afin de mettre en évidence les propriétés des molécules testées, ces propriétés devront être confirmées in vivo dans des modèles animaux (étude du comportement de grattage, de l'évolution d'un érythème, de l'infiltration cutanée de cellules immunitaires par exemple). L'utilisation d'animaux (souris principalement) est donc indispensable.

Nombre et type d'animaux; conditions d'hébergement et de soins (principe de réduction et principe de raffinement):

-Choix des espèces: des souris seront utilisées car les modèles expérimentaux décrits dans ce projet ont été caractérisés de façon extensive dans la littérature scientifique chez cette espèce.

-Nombre d'animaux: le nombre d'animaux utilisés dans ce projet a été réduit à son minimum sans compromettre les objectifs du projet. Selon les méthodes d'analyses utilisées et compte-tenu des variations inter individuelles anticipées, un maximum de 10 animaux par groupe sera nécessaire pour permettre une analyse robuste des résultats générés.

Sur une période de 5 ans, et pour les 4 procédures décrites, un maximum de 18 550 animaux (dont 1050 surnuméraires) sera utilisé pour la réalisation des procédures expérimentales, la formation et/ou le maintien des compétences techniques. Des études statistiques seront réalisées après chaque étude ceci afin de nous permettre de réduire le nombre d'animaux par groupe expérimental, tout en gardant la puissance et la robustesse du modèle.

-Conditions d'hébergement et de soins:

Les conditions d'hébergement et de soins utilisés ont été choisies et conçues de manière à réduire au maximum toute douleur, souffrance, angoisse ou dommages durables que pourraient ressentir les animaux, en conformité avec les législations françaises et européennes.

Les rongeurs sont hébergés collectivement lors de la réception et de la période d'acclimatation. En début d'étude, ils seront hébergés individuellement pour éviter les risques de bagarres pouvant entraîner des lésions cutanées, et le léchage entre individu des produits lorsqu'ils sont appliqués directement sur la peau. Cependant ils garderont un contact visuel et olfactif entre eux.

Si l'animal devait porter un dispositif de protection (collerette ; gilet de protection...), une période d'adaptation d'au moins 5 jours sera mise en place avant le début de l'étude et une attention particulière sera apportée sur l'état de santé général de l'animal, en particulier sur le poids. Ces animaux seront mis en cage individuelle permettant un contact visuel, auditif et olfactif.

L'hébergement est enrichi par des techniques adaptées aux besoins spécifiques et individuels des animaux leur permettant de reproduire au mieux leur comportement naturel (ex : maisonnette ou ouate dans la cage).

Le contrôle des animaux sera assuré quotidiennement et des points limites ont été établis afin d'anticiper toute dégradation de l'état de santé général des animaux et, le cas échéant, d'appliquer des protocoles de soins adaptés.

17945 Ce projet regroupe une partie des études de recherche et développement qui seront conduites chez l'animal en vue de déterminer les paramètres pharmaco- et toxicocinétiques (PK et TK) d'un produit et/ou d'identifier le métabolisme in vivo.

Ces études peuvent avoir plusieurs objectifs :

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

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

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

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

Selon le nombre de candidats médicaments qui atteindront l'étape de validation « in vivo », un maximum de 500 rats, 1000 souris, 40 lapins ou de 20 chiens sera utilisé chaque année (dont des animaux ré-utilisés; donc un total maximum en 5 ans de 2500 rats, 5000 souris, 200 lapins, 100 chiens).

17946 Pendant la gestation, l'oxygénation de l'embryon se fait via le sang de la mère. Non fonctionnels les poumons sont contournés grâce à une perforation créée naturellement au niveau du septum interauriculaire, appelé foramen ovale. Une fois que le bébé est né et s'oxygène naturellement, la pression créée dans l'oreille gauche combinée à des signaux cellulaires spécifiques permet la fermeture de la fossa dans un délai de 2 ans.

Cependant, chez 1 individu sur 4, le foramen ovale ne se ferme pas, ce qui est appelé Foramen Ovale Perméable (FOP). Le FOP pourrait être asymptomatique, cependant, de fortes corrélations

ont été rapportées avec certains accidents vasculaires cérébraux (AVC). En effet, un FOP fournit un portail entre le côté droit et le côté gauche du cœur, ce qui peut permettre à un thrombus de passer sur le côté gauche de la circulation, provoquant potentiellement un AVC.

Jusqu'à présent, plusieurs traitements à base d'anticoagulants ou anti-plaquettaires ont été testés cliniquement pour réduire le risque d'AVC pour les patients avec FOP, mais la fermeture du FOP s'est avérée plus efficace.

Des dispositifs de fermeture constitués d'un squelette métallique ont été développés et testés cliniquement au cours des 20 dernières années et ont prouvé l'efficacité de la fermeture du FOP sur la récurrence d'AVC. Néanmoins, des événements indésirables tels que thrombose, embolie particulaire ou encore de la fibrillation auriculaire ont été rapportés dus à l'érosion du métal, dislocation, malpositionnement de l'appareil.

Pour contourner ces événements indésirables et améliorer le recouvrement du dispositif de fermeture par le tissu cardiaque environnant, nous proposons un patch de fermeture innovant sans métal et biocompatible.

Pour ce projet, nous proposons d'utiliser le modèle connu de défaut septal artificiel chez le porc et le mouton et d'implanter sur la perforation créée notre implant. La technique permettant la réalisation d'un défaut artificiel est une technique qui a déjà été pratiquée par l'équipe portant le projet lors de remplacement de valves cardiaques. Des cardiologues interventionnels extérieurs, spécialistes de la fermeture de FOP, participeront également aux campagnes de tests et apporteront des conseils avisés sur les étapes d'implantations. Les modèles porcins et ovins sont des modèles animaux bien connus dans la recherche translationnelle en chirurgie cardiovasculaire en raison de leur étroite corrélation avec l'anatomie et la physiologie humaines. De plus, les modèles porcins sont dotés d'un système de coagulation plus rapide et les ovins d'un système de conduction plus sensible que chez l'homme, ce qui permettra de défier nos conditions d'implantation. Notre projet a été pensé consciencieusement afin d'appliquer la règle des 3R.

(1) Remplacer :

Malgré une batterie de tests mécaniques et l'évaluation de biocompatibilité in vitro sur cellules, la procédure qui permet d'évaluer les performances du système de délivrance et les propriétés d'adhésions de l'implant en conditions physiologiques et sur cœur battant, ne peuvent être reproduites in vitro, ni sur organe explanté. Tester les diverses itérations de notre dispositif médical nécessite inévitablement l'approche in vivo sur larges animaux.

(2) Réduire :

Afin de limiter le nombre d'animaux impliqués dans ce projet, nous avons présélectionné grâce à une batterie de tests mécaniques et grâce à l'évaluation de biocompatibilité les itérations du système de délivrance et d'implants les plus optimales. De plus, afin de réduire le nombre d'animaux, nous avons choisi d'utiliser le modèle de défaut septal artificiel car, en effet, la prévalence de FOP naturellement chez le porc et le mouton étant d'environ 1 sur 10, ce projet nous aurait demandé un nombre d'animaux conséquent à pré-screener. Les procédures expérimentales de ce projet ont été consciencieusement pensées et élaborées afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en permettant d'obtenir des résultats statistiquement satisfaisants : par campagne de test, deux versions du système de délivrance seront testées en combinaisons avec trois versions d'implant sur six porcs au total puis les quatre meilleures combinaisons seront testées sur quatre moutons. Cinq campagnes de tests seront planifiées sur l'année, soit un total de trente porcs et vingt moutons. Enfin, les animaux seront sélectionnés sans distinction de sexe mais de poids (>100kg) pour une meilleure corrélation de taille de cœur avec l'homme.

(3) Raffinement :

Les procédures expérimentales de ce projet ont été consciencieusement pensées et élaborées pour réduire au maximum la souffrance des animaux pendant leur hébergement et les procédures chirurgicales. En effet, un suivi quotidien des animaux sera réalisé dès leur arrivée : une évaluation de l'état de santé sera faite selon des points limites bien définis (liés à leur comportement, leur nutrition, leur poids et leurs déjections) puis enregistrée dans un registre de suivi. En préparation des procédures chirurgicales, les animaux seront anesthésiés généralement et une prophylaxie

antalgique leur sera appliquée avant et pendant tout acte chirurgical. Au cours des procédures chirurgicales, les animaux seront constamment monitorés et leur état de santé sera évalué selon des points limites bien définis (liés à leurs fréquences cardiaques et respiratoires, leurs pressions artérielles, l'oxymétrie, et leur température).

Ce présent projet nous permettra d'avancer dans la conception de notre dispositif médical de fermeture du FOP et de valider la combinaison optimale du système de délivrance avec l'implant. Ce projet sera à la base de notre prochaine étude pré-clinique chronique.

17947 La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie qui touche 0,5-1% de la population mondiale, à raison de trois femmes pour un homme. Elle se caractérise par une inflammation des articulations ainsi qu'une perte osseuse. Plusieurs traitements de la PR existent à ce jour, dont le méthotrexate (MTX) qui agit par réduction de l'inflammation articulaire lorsqu'il est administré à faible dose hebdomadairement. Ce traitement a montré des effets bénéfiques chez des patients atteints de PR, avec une progression de la maladie moins sévère. De plus, alors que le MTX était incriminé dans l'apparition d'une fibrose pulmonaire, les dernières études suggèrent que le MTX la prévienne. Cependant, ce traitement peut induire des effets indésirables chez certains de ces patients, tels que des nausées jusqu'à des vomissements dans certains cas. Afin de réduire l'apparition de ces effets indésirables, l'acide folique est utilisé en supplément du MTX. L'acide folique agit par action antagoniste du MTX, réduisant ainsi sa toxicité sur l'organisme. Il est généralement administré quotidiennement 1 à 2 jour(s) après l'injection du MTX, afin que ce dernier ait bien été absorbé dans la circulation systémique. Ce protocole de traitement a montré des effets bénéfiques chez les patients atteints de PR, mais ce schéma reste compliqué avec un mésusage important. L'objectif principal de ce projet est de déterminer si l'efficacité du traitement de la PR et la toxicité liée au MTX sont modifiées après l'administration concomitante du MTX et de l'acide folique, l'hypothèse étant que ce protocole de traitement concomitant ait un effet protecteur supplémentaire contre la toxicité du MTX sans influencer sur l'efficacité du traitement. De plus, ce projet permettra de mesurer l'impact du MTX avec ou sans supplémentation d'acide folique sur l'apparition de la fibrose pulmonaire liée à la PR.

L'utilisation d'animaux est nécessaire pour la réalisation de ce projet car il permettra d'une part la validation préclinique d'un protocole de traitement MTX-acide folique avant de pouvoir être ultérieurement testé chez l'Homme, et d'autre part la validation d'une histologie ostéoarticulaire dynamique in vivo pendant la cinétique de développement de l'arthrite. Le modèle choisi est l'arthrite induite par adjuvant (AIA) chez le rat, pour sa bonne ressemblance en termes de physiologie avec la PR développée chez l'Homme. Le nombre d'animaux minimum pour la réalisation de ce projet est de 72, ce qui représente le nombre nécessaire d'animaux pour une analyse statistique correcte. De plus, plusieurs étapes de l'expérimentation ont été raffinées afin de gérer au mieux la douleur des animaux. L'injection d'adjuvant sera réalisée sous anesthésie gazeuse. Le suivi clinique de chaque animal sera réalisé grâce à des indicateurs systémiques et locaux reconnus dans l'arthrite. Un suivi quotidien des animaux sera réalisé, avec des points limites mis en place qui permettront d'exclure l'animal de l'étude s'il présente des signes manifestes de souffrance ou une perte de poids excessive ($\geq 20\%$ du poids initial). Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité par du personnel qualifié afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. Par ailleurs, les animaux sont hébergés dans un environnement enrichi (copeaux, tunnel transparent rouge, bâtonnets à ronger). L'eau et la nourriture sont mises à disposition ad libitum et de la musique est diffusée en salle d'hébergement pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux. Enfin, l'arthrite étant invalidante pour l'animal, les moyens d'accès à la nourriture et à l'eau ont été adaptés.

17948 La bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) est une maladie pulmonaire chronique qui se caractérise par une obstruction progressive et permanente des voies aériennes et des poumons, entraînant une gêne respiratoire. Elle est la conséquence d'expositions répétées à des particules ou des gaz nocifs (tabagisme en particulier) et représente la 3ème cause de mortalité dans le monde. Les lésions pulmonaires associées à la pathologie sont relativement bien connues avec

notamment l'emphysème pulmonaire caractérisé par la destruction de la paroi des alvéoles (site des échanges air/sang) amenant à une insuffisance respiratoire parfois mortelle. L'atteinte pulmonaire et les comorbidités ont un impact sur la capacité d'exercice des patients. Le réentraînement à l'effort est à la base de la prise en charge de cette pathologie qui consiste en une réhabilitation respiratoire. Chez le patient BPCO, l'effet bénéfique de l'exercice n'est pas toujours observé en particulier sur le plan cardiovasculaire. Une des causes potentielles de cette non réponse à l'exercice serait une dysfonction vasculaire et en particulier endothéliale. Les cellules endothéliales qui forment les capillaires et tapissent la paroi des vaisseaux sanguins voient leur fonction altérée chez les patients BPCO.

Le projet qui vise à identifier les mécanismes moléculaires sous tendant cette dysfonction endothéliale permettrait de comprendre les défauts de réponse chez les patients BPCO et d'améliorer leur prise en charge thérapeutique.

Il n'existe pas de modèle alternatif permettant d'étudier cette pathologie et les effets de l'exercice. Par contre, il existe un modèle animal murin d'emphysème pulmonaire. Il est obtenu en instillant dans les bronches une enzyme qui détruit progressivement les alvéoles pulmonaires (l'élastase), et une endotoxine bactérienne (lipopolysaccharide ou LPS) qui induit une inflammation. Ce modèle rat élastase-LPS reproduit les altérations pulmonaires majeures observées chez le patient BPCO et leurs conséquences systémiques. Il est en place dans notre laboratoire.

L'étude menée selon les recommandations institutionnelles en vigueur sera réalisée en deux temps et permettra (1) de caractériser la dysfonction endothéliale dans ce modèle animal de BPCO (2) d'évaluer les effets de l'exercice sur cette dysfonction.

Nous respecterons le principe des 3 R.

-Remplacement : Si une alternative est identifiée pendant la réalisation de nos travaux, nous remplacerons notre stratégie immédiatement.

-Réduire : Le nombre total d'animaux utilisés dans ce projet a été réduit à son minimum (240 rats sur 5 ans) pour obtenir des résultats statistiquement fiables permettant de répondre aux objectifs du projet. Nous avons organisé au mieux les protocoles permettant l'acquisition de données in vivo et in vitro en parallèle sur les mêmes animaux afin d'apparier les mesures, diminuer les groupes et optimiser les interprétations. Nous réaliserons un maximum de mesures non invasives sur le même animal et avant/après exercice. Nous utiliserons de façon optimale les tissus des animaux au moment du sacrifice.

-Raffiner : Tout au long du protocole, les procédures seront réalisées dans un souci de bien-être animal afin de limiter le stress et la souffrance et de réduire au strict minimum la détresse imposée aux animaux. Les procédures invasives seront réalisées sous anesthésie générale avec traitement analgésique en soin pré- per- et post-opératoire (buprénorphine) afin d'éviter la génération de douleur et d'angoisse. Des points limites ont été définis et ils seront appréciés avec une grille d'évaluation des signes de douleurs et de détresse cardiorespiratoire lors des visites quotidiennes et lors du soin par du personnel qualifié. Les animaux, hébergés en portoir ventilé dans le respect de la réglementation concernant les effectifs par cage et l'utilisation d'enrichissement, ont un accès libre à la nourriture et l'eau pendant la durée du protocole.

17949 L'objectif de ce projet de recherche est d'évaluer la bonne intégration et la transparence au sein de la cornée de lapin de lentilles de stroma cornéen humain lyophilisés.

La cornée est la membrane transparente située en avant de l'œil. Elle est constituée de plusieurs couches :

L'épithélium qui constitue la couche la plus externe, la membrane de Bowman, le stroma, la membrane de Descemet et l'endothélium (la couche la plus interne).

Lorsqu'elle devient opaque ou trop déformée, l'œil devient non voyant et il est nécessaire de réaliser une greffe de cornée, soit sur toute son épaisseur, soit sur une partie de son épaisseur. Habituellement, son remplacement est réalisé à l'aide d'un greffon cornéen provenant d'un donneur humain lors d'une allogreffe de cornée.

Les greffons cornéens sont actuellement conservés dans des milieux de conservation à +31°C pour une durée limitée de 34 jours maximum. Ce mode de conservation est contraignant et la pénurie de greffons devant l'urgence de certaines greffes, limite la diffusion : nous souhaitons développer de ce fait une autre technique de conservation : la lyophilisation.

Le but de notre projet est d'évaluer la possibilité de remplacer une partie du stroma cornéen par des lentilles de stroma lyophilisés, provenant de greffons cornéens d'un donneur humain ou récupérées lors d'interventions de chirurgie réfractive de la myopie : SMILE (Small Incision Lenticule Extraction). Ces greffons lyophilisés permettraient la réalisation de greffe de cornée lamellaire antérieure.

Le mode de conservation actuel de la cornée, en France est l'organoculture, ce qui en limite la diffusion à l'inverse de la lyophilisation que nous souhaitons développer.

L'évaluation de l'intégration des lentilles de stroma se fera sur 12 lapins.

Dans le cadre de la règle des 3Rs :

Réduction : Chaque lapin sera opéré des deux yeux. Cette intervention n'est pas cécitante, elle est régulièrement pratiquée en médecine humaine et totalement indolore en post opératoire ce qui nous permet de réduire de moitié le nombre d'animaux utilisés :

- L'œil droit recevra un lentille dans l'épaisseur du stroma cornéen (INLAY)
- L'œil gauche recevra un lentille à la surface du stroma cornéen (OVERLAY)

Le nombre de lapins utilisé fait référence aux études antérieures et est nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement fiables et interprétables. Nous utiliserons un test de Wilcoxon ou un test Q de Cochran pour l'interprétation de statistique de nos résultats.

Remplacement : la technique de lyophilisation de des cornées a été mise au point dans notre laboratoire et testée dans de nombreuses conditions in vitro.

Aujourd'hui, nous devons confirmer la bonne intégration et la transparence des greffons stromaux lyophilisés sur la cornée animale avant de pouvoir l'utiliser chez l'homme. La dimension et la composition de la cornée du lapin est proche de celle de l'homme, cela permet une insertion plus facile par le chirurgien. De plus, le stroma cornéen sera préalablement décellularisé pour faciliter l'intégration dans la cornée du lapin.

Raffinement : L'ensemble des procédures seront effectuées sous sédation profonde monitorée, couplée à une anesthésie locale médiée par un collyre ophtalmique. Les temps opératoires seront très courts maximum 10 minutes par œil et pratiqué par un chirurgien qualifié. Afin de garantir une parfaite transposition chez l'humain les soins post opératoire seront les mêmes qu'en médecine traditionnelle :

-Injection sous conjonctivale d'anti-inflammatoire en fin d'intervention.

-Pommade ophtalmique deux fois par jour jusqu'à cicatrisation totale soit 5 à 7 jours. Chaque semaine, des photos seront réalisées sur les yeux afin de suivre la bonne intégration du greffon cornéen. A 3 mois post-greffe les cornées seront prélevées pour analyses histologiques.

La manipulation des lapins sera facilitée par des séances d'entraînement récompensée (Fruity bites) durant les deux semaines d'acclimatation pré-opératoire. Des Bunny Block, des briquettes de bois et de luzerne seront disposés dans la cage de façon alterné afin d'assurer l'enrichissement du milieu et de la musique douce sera diffusée quotidiennement.

Les points limites seront déterminés en se basant sur le Rabbit Grimace Scale et essentiellement sur l'Orbital tightening.

17950 L'accident vasculaire cérébral (AVC) est une pathologie neurologique survenant après l'occlusion d'une artère irriguant le cerveau. Cette pathologie est la 3ème cause de mortalité et la première cause de handicap acquis chez l'adulte dans le monde. En France, cent trente mille nouveaux cas sont répertoriés par an. L'AVC pose donc un problème majeur tant dans le domaine de la santé publique que sur le plan humain. Actuellement, la prise en charge des patients à la phase aiguë de l'infarctus cérébral est réalisée par l'injection intraveineuse de l'activateur tissulaire du

plasminogène (tPA) associée ou non à la thrombectomie. Toutefois, seule une faible proportion des patients (<10%) peut être traitée du fait des effets secondaires de l'injection de tPA et de la relative difficulté d'accès à la thrombectomie. Ainsi, il paraît indispensable de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques innovantes visant à traiter efficacement cette pathologie.

L'objectif de ce projet est de tester quatre stratégies thérapeutiques par 2 voies d'administrations différentes afin d'étudier la diminution des volumes lésionnels ainsi que l'augmentation de la récupération fonctionnelle après AVC. Pour cela, ces stratégies thérapeutiques seront étudiées à l'aide d'un modèle d'ischémie-reperfusion. Ainsi, l'AVC sera induit sur des souris Swiss (*Mus musculus*) mâles âgées de 10 semaines et des souris C57BL6J mâles du même âge, en utilisant le modèle d'ischémie reperfusion dont le principe repose sur l'insertion d'un filament dans la carotide interne de l'animal. Ce modèle est aujourd'hui très bien caractérisé chez la souris et toutes les procédures seront organisées afin de se conformer à la règle des 3Rs, ainsi toutes les manipulations douloureuses seront réalisées sous anesthésie générale avec couverture analgésique pour éviter toutes douleurs, souffrances et angoisses. De plus, les données de la littérature ainsi qu'une étude de puissance statistique en amont permettent de nous assurer que nous utiliserons le nombre minimal d'animaux pour pouvoir conclure d'un effet ou non des stratégies thérapeutiques. Le suivi de la récupération fonctionnelle pour chaque traitement sera réalisé sur 2 modes d'administration différents pour 10 animaux par méthodes d'administration et par doses (+ 10%). Soit un total de 704 souris pour l'étude complète (352 souris SWISS et 352 souris C57BL6J).

Cette étude, ayant recours à l'expérimentation animale, prend en compte le bien-être animal et les pratiques éthiques, et répond à la règle des 3Rs. Ce projet correspond à l'étape de validation *in vivo* qui fait suite aux nombreuses validations réalisées *in vitro*, et ne nous permet pas d'utiliser d'autres moyens que de tester ces stratégies thérapeutiques chez l'animal. L'ensemble des connaissances et des acquis dont nous disposons dans la littérature font que la souris est un modèle préférentiel pour mener à bien ce projet. En effet, la souris est une des espèces animales la plus étudiée dans le domaine de l'AVC ce qui permettra une analyse comparative et critique des résultats obtenus.

Les expériences seront réalisées par du personnel qualifié en respectant les règles de bonnes pratiques de laboratoire pour le respect des animaux, tout en veillant à ne pas dépasser les points limites fixés au préalable. Le bien-être des animaux sera suivi bi-quotidiennement par du personnel qualifié 5j/7 et quotidiennement pendant les week-ends et jours fériés et cela pendant toute la durée du projet. Les animaux seront hébergés dans des cages standards répondant aux normes européennes actuelles (Directive 2010/63/UE). Pour éviter de stresser les animaux, les cages seront isolées de tout bruit extérieur et l'accès à l'eau et à la nourriture sera *ad libitum*. Enfin, une importance particulière sera apportée au bien-être des animaux. Tout sera mis en œuvre pour réduire l'angoisse, la souffrance et la douleur de chaque animal, pouvant être occasionnées pendant le projet. Les principes éthiques et les standards de raffinement seront utilisés jusqu'à la mise à mort de l'animal.

17951 Ce projet est un avenant à un projet précédemment autorisé et pour lequel nous avons choisi de changer de modèle.

Une transition nutritionnelle s'est opérée dans les pays industrialisés ces 50 dernières années, avec une consommation plus élevée d'aliments riches en graisses saturées et en sucres rapides, laquelle joue un rôle central dans l'épidémie d'obésité et de maladies chroniques associées (stéatose hépatique, insulino-résistance).

Ce projet vise à explorer chez la souris obèse et diabétique l'impact d'un régime alimentaire enrichi en molécule de lipides (FAHFAs) naturellement présent dans les aliments et dans l'organisme et pour lesquels il a été très récemment montré des effets potentiellement bénéfiques sur certaines complications liées à l'obésité.

Nous avons choisi pour cette étude le modèle souris db/db car il présente des symptômes similaires à ceux qui définissent le syndrome métabolique chez l'Homme et qu'il s'agit d'un modèle d'obésité et de diabète de type 2. 40 souris mâles seront utilisées dans ce projet. Elles recevront leurs régimes respectifs (régime standard enrichi ou non en FAHFAs) pour une période de 6 semaines. Nous

explorerons différents paramètres métaboliques associés à l'obésité dans le foie et le muscle des souris étudiées.

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

- « Remplacer » les modèles animaux :

Il n'existe pas de modèle cellulaire reproduisant nos procédures expérimentales puisqu'il s'agit d'analyses nutritionnelles et métaboliques.

- « Réduire » le nombre d'animaux en expérimentation

Pour nos expérimentations, nous avons prévu le nombre nécessaire d'animaux (40 souris mâles) pour garder une puissance statistique dans le traitement de nos résultats.

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

Nous allons porter une attention particulière au bien-être de nos animaux. Les régimes nutritionnels proposés n'induisent pas de pathologie majeure. Par contre, les souris db/db sont obèses et diabétiques et présentent un phénotype dommageable à partir de la 10ème semaine et il y a un risque de mortalité à partir de la 12ème semaine. Nous avons donc fixé la fin de notre étude à 12 semaines d'âge. Pour optimiser l'expérimentation et réduire les dommages potentiels, les animaux sont hébergés par 2 et la litière, abondante et absorbante, est changée tous les deux jours. L'accès à l'eau et à une nourriture adéquate est vérifié tous les jours. De plus les suivis quotidiens des animaux permettent d'identifier des signes de souffrance caractérisés par l'état du pelage, le comportement de la souris (agressivité / apathie), cris, mobilité, alimentation... En cas de souffrance, les animaux seront euthanasiés.

17952 *Echinococcus multilocularis* est un ver parasite principalement retrouvé dans l'hémisphère nord, en Europe Centrale, Alaska, Chine et Japon. Les vers adultes vivent dans les intestins de leurs hôtes définitifs, majoritairement les renards, mais également les chiens et les chats. Les vers adultes produisent des œufs infectieux, qui sont rejetés avec les fécès. Naturellement, l'hôte intermédiaire, telle que la souris, s'infecte en ingérant des œufs. Le parasite atteint alors les intestins, traverse la barrière intestinale et se dissémine via la circulation sanguine ou lymphatique, se retrouvant majoritairement au niveau du foie où il se développe sous sa forme larvaire. Lorsque le rongeur infecté est ingéré par un hôte définitif, le ver adulte se développe alors au niveau de ses intestins.

L'œuf peut être ingéré accidentellement par l'homme lors de la consommation d'aliments ou d'eau souillés par des déjections contenant des œufs infectieux. La croissance et la prolifération du parasite sous sa forme larvaire au niveau hépatique induit une échinococcose alvéolaire (EA), qui est une pathologie chronique. C'est la pathologie la plus létale parmi toutes les infections impliquant des vers. A l'heure actuelle, la seule méthode curative pour cette pathologie est la chirurgie par résection du tissu parasitaire. Cette chirurgie, possible dans seulement 30% des cas, s'accompagne d'un traitement médicamenteux sur de longues périodes. Pour les patients inopérables, les traitements médicamenteux n'étant pas parasiticide, il est souvent prescrit à vie. Ces traitements sont responsables de nombreux effets secondaires (hépatotoxicité notamment) conduisant les patients à observer des pauses thérapeutiques permettant ainsi à la maladie de reprendre sa progression. Devant ce manque de solution thérapeutique, la recherche de molécules efficaces est nécessaire et urgente pour traiter les personnes atteintes d'EA.

Afin de cribler et de tester de nouvelles stratégies thérapeutiques, un système de culture in vitro du stade larvaire a été développé depuis plusieurs années (Brehm et Spiliotis, 2008) avec différents tests fonctionnels qui ont par la suite été mis en place (Hemphill et al. , 2014; Stadelmann et al. , 2010, 2016). Cependant comme la biologie et le cycle de vie du parasite sont très complexes, la culture in vitro ne se suffit pas à elle-même pour maintenir dans le temps le parasite et dépend également du matériel parasitaire récupéré à partir d'hôtes intermédiaires infectés, telles que les souris. Ainsi, la culture in vitro est également basée sur un cycle de maintien du parasite in vivo. La culture in vitro permettant la multiplication du matériel parasitaire d'environ 40 x en moyenne, réduit

considérablement le besoin d'expérimentation animale et permet la mise en place d'expériences de criblage à grand échelle qui ne seraient pas possibles dans le modèle in vivo.

Nos différentes expérimentations suivront le même schéma expérimental. Des souris, cinq par lot et tous les 2 mois (la durée d'infection sera fonction de l'évolution des lésions parasitaires), seront infectées par le parasite *E. multilocularis* récupéré auprès de nos collaborateurs suisses (Pr. Dr. Britta Lundström-Stadelmann). Un total de 150 animaux sera utilisé dans ce protocole sur 5 ans. Les souris infectées ne développeront aucun signe clinique d'évolution de la maladie jusqu'à l'obtention de kystes péritonéaux de taille croissante (kyste visible à 6-8 semaines). Lorsque ces kystes atteignent environ 20 grammes (correspondant à la prise de poids de l'animal en 8 à 10 semaines après infection), l'animal sera euthanasié, ces lésions parasitaires seront récupérées, une partie infime permettra le passage à un autre lot d'animaux et la partie principale servira à la mise en culture in vitro afin d'effectuer nos tests de criblage d'efficacité de nos candidats thérapeutiques. Les seules manipulations réalisées sur l'animal vivant correspondront aux pesées et à l'inoculation inaugurale par voie intrapéritonéale. Ces manipulations seront faites afin d'éviter au maximum le stress et la douleur des animaux. Si, malgré ces précautions, l'animal présente avant sa mise à mort programmée une complication infectieuse inattendue (Points limites : croissance trop rapide des kystes, douleurs digestives inattendues, perte de poids significatives sur plusieurs mesures), l'animal sera euthanasié prématurément afin de lui éviter toute souffrance inutile.

Les animaux seront hébergés dans une structure agréée qui tient compte de l'éthique animale et assure l'élevage et le suivi quotidien des animaux dans les meilleures conditions de bien-être conformément à la législation.

Notre projet a été établi en respectant la règle des 3R :

Remplacer : les modèles de culture in vitro du parasite ne suffisent pas à maintenir dans le temps le parasite pour réaliser les tests de criblage d'efficacité de nos candidats thérapeutiques in vitro. Il est donc indispensable de maintenir la souche parasitaire dans un cycle biologique in vivo à minima afin de mener à bien nos projets de recherche.

Réduire : Le nombre d'animaux a été réduit au strict minimum nécessaire pour permettre in vivo un maintien et une amplification du matériel parasitaire utilisable par la suite dans nos tests in vitro

Raffiner : Les animaux sont hébergés en groupes sociaux et bénéficient d'un enrichissement adapté. Les souris infectées seront surveillées à différents temps afin de vérifier qu'aucun signe de souffrance n'apparaît.

Notre objectif est de maintenir la souche parasitaire in vivo afin de disposer à façon de matériel parasitaire pour mener à bien nos projets de recherche in vitro sur la recherche de nouvelles molécules thérapeutiques contre cette pathologie infectieuse souvent mortelle.

17953 Selon l'Organisation mondiale de la santé, l'incidence des cancers de la peau a fortement augmenté au cours de ces dernières décennies, en particulier le mélanome.

A l'heure actuelle le diagnostic du mélanome est réalisé en utilisant la règle ABCDE pour « Asymétrie, Bordure, Couleur, Diamètre, Evolution ». Cette méthode est basée sur l'aspect visuel, permettant ainsi aux dermatologues de détecter environ 80% des mélanomes. Cependant 20% des mélanomes ne sont pas détectés et continuent d'évoluer, pouvant conduire à une phase métastatique.

Une détection précoce de ce dernier permettrait de garantir une meilleure prise en charge des patients. Par conséquent, le développement de technologies innovantes s'avère nécessaires.

Ce projet vise à contribuer à la détection précoce du mélanome par le biais d'une nouvelle méthode d'imagerie polarisée (l'Analyse du Speckle Dynamique Polarisé). Cette méthode non invasive, basée sur les propriétés polarimétriques de la lumière, optimise la détection des signaux rétrodiffusés par la peau et le derme. Elle constitue une approche différente et novatrice par rapport aux autres instruments optiques disponibles actuellement. Elle permettrait l'étude de la néoangiogenèse tumorale mais également l'évaluation de nouvelles thérapies antitumorales, comme l'électrochimiothérapie.

Dans une étude préliminaire, nous avons défini des paramètres de détection optique permettant la visualisation de la vascularisation chez un très petit nombre d'animaux.

A présent, nous souhaitons optimiser les paramètres de détection optique en fonction de la quantité de mélanine et de l'agressivité des tumeurs, afin d'une part de visualiser la néoangiogenèse tumorale et d'autre part de mesurer l'effet de l'électrochimiothérapie sur la microvascularisation tumorale.

L'électrochimiothérapie (ECT) est une méthode physique qui consiste en l'application d'un champ électrique externe à l'aide de 2 électrodes qui perméabilise les cellules du tissu ciblé (entre les électrodes) facilitant ainsi l'entrée de molécules anticancéreuses. Ces molécules hydrophiles, bléomycine ou cis-pt, ne passent pas facilement la membrane plasmique et à doses efficaces, elles présentent de nombreux effets secondaires. Grâce au ciblage que permet l'électrochimiothérapie, par une perméabilisation des membranes plasmiques, une dose plus faible permet d'obtenir une meilleure efficacité et moins d'effets secondaires.

Concernant la règle des 3Rs :

1 / Remplacer : Ce projet ne peut être remplacé par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information.

En effet, nous souhaitons identifier et détailler l'apparition de néovascularisation tumorale à l'aide d'une technique d'imagerie optique innovante.

L'étude ne peut donc se faire qu'in vivo, dans un modèle de tumeur de la peau.

2 / Réduire : Ce projet, avec ces différentes étapes, nécessite l'utilisation de 540 souris. Le nombre d'animaux utilisés dans le projet est nécessaire pour obtenir dans chaque groupe étudié un nombre d'individus suffisants pour réaliser les tests statistiques indispensables. La technique d'imagerie non invasive va permettre le suivi dans le temps d'un même animal. Ceci réduit considérablement le nombre d'animaux nécessaires à l'étude. Différentes parties du projet sont regroupées afin de réduire le nombre de groupes d'animaux.

3 / Raffiner : Les conditions d'hébergement et les méthodes expérimentales utilisées sont les plus appropriées pour réduire au maximum l'angoisse des animaux.

17954 La tuberculose demeure un problème majeur de santé publique et constitue un frein au développement économique. Au-delà de la souffrance humaine, cette infection prélève un lourd tribut sur les budgets individuels et gouvernementaux. Les microorganismes responsables de ces infections sont des bactéries du genre *Mycobacterium* et sont rassemblés sous le nom de complexe de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Les données épidémiologiques pour cette maladie sont édifiantes : 1/4 de la population mondiale est infecté et le taux de mortalité chez les adultes est plus élevé que celui causé par le SIDA, le paludisme et toutes les autres infections réunies. Des thérapies existent mais sont souvent tenues en échec par leur coût, leurs effets secondaires et l'apparition de souches résistantes. De même, un vaccin vivant, *Mycobacterium bovis* BCG, est disponible mais son efficacité est extrêmement variable en fonction des populations vaccinées. Il est donc urgent de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques mais le support cognitif requis reste très limité. Dans ce contexte, notre objectif est d'apporter de nouvelles connaissances sur les facteurs produits par les bacilles de la tuberculose ou les adaptations métaboliques nécessaires pour se maintenir et se transmettre chez l'homme. Le présent projet s'inscrit dans ce cadre. Dans ce projet, nous cherchons à caractériser l'interaction hôte/pathogène dans différents modèles murins présentant des sensibilités différentes à l'infection (BALB/c ou C3HeB/FeJ) avec des souches sauvages et mutantes de Mtb exprimant différents allèles d'un régulateur de l'expression génique afin de comprendre l'impact des mutations. Dans l'ensemble de ces études, les animaux infectés sont utilisés pour déterminer des paramètres de virulence des souches (charges bactériennes, histologie) ainsi que des paramètres immunologiques (moléculaires et cellulaires) de réponse à l'infection.

Le nombre maximal d'animaux utilisés sera de 710 souris se répartissant 280 souris BALB/c et 430 souris C3HeB/FeJ. Afin de s'inscrire dans la logique des 3R, nous avons intégré 3 étapes dans notre raisonnement:

1) Remplacer : Différents modèles cellulaires ou animaux sont utilisés par les équipes travaillant sur la tuberculose. Malheureusement les modèles cellulaires ne permettent pas à l'heure actuelle de rendre compte de la totalité des étapes de l'infection d'un hôte par les mycobactéries pathogènes. Ainsi il n'existe aucun modèle cellulaire pertinent pour l'étude des phases tardives de la tuberculose telles que la persistance ou la transmission. Le modèle animal est donc incontournable à l'heure actuelle. Dans ce contexte, le modèle animal le plus couramment utilisé est le modèle souris. Ce modèle reproduit notamment au niveau immunologique bon nombre des observations faites chez l'homme.

2) Réduire : Les différentes phases des projets (clairement identifiées dans les procédures détaillées) seront suivies de décisions de poursuite ou d'arrêt de l'étude en fonction des résultats. Nos expériences antérieures nous ont fourni des indications sur la taille des lots d'animaux à respecter pour obtenir en première intention des résultats statistiquement significatifs. Toutes les expériences impliquant des animaux font l'objet d'un protocole expérimental écrit et validé par le responsable de l'animalerie. Nous utilisons des lots d'animaux homogènes pour réduire la variabilité. Enfin, nous essayons d'analyser plusieurs paramètres sur un même lot d'animaux (par exemple : préparation d'ARN, cytométrie de flux et charges bactériennes).

3) Raffiner : Dans toutes les expériences, les souches de souris ont été choisies en fonction de l'objectif de l'expérimentation (détaillé dans le descriptif de la procédure expérimentale). L'état sanitaire et le bien-être des animaux sont évalués tout le long de l'expérience par des personnels formés et des points limites ont été définis. La souffrance et/ou le stress animal sont présents à deux niveaux dans nos expériences : i) lors de l'anesthésie et de l'infection des animaux, et ii) lors de l'inflammation pulmonaire chronique et des dommages tissulaires induits par l'infection mais où nous mettons en place des points limites précoces pour suivre les animaux et intervenir rapidement. Ces deux niveaux de douleurs font l'objet d'une prise en charge spécifique indiquée dans les procédures respectives et déjà appliquées dans nos projets antérieurs.

17955 Les recherches archéozoologiques ont documentées la présence de naissances d'automne dans les élevages ovins au Néolithique (-7000 AV JC). Ceci peut être la conséquence de deux situations : (1) il existe des ovulations spontanées au printemps et des fécondations ont lieu alors que les béliers sont présents toute l'année dans le troupeau, ou bien (2) l'éleveur sépare les deux sexes puis ré-introduit volontairement les béliers ("effet mâle" ou effet bélier) pour une lutte de printemps. La deuxième situation signifierait un état assez avancé des connaissances et la mise en œuvre d'innovations associées à l'élevage ovin à cette période par les éleveurs du Néolithique.

L'objet du présent protocole est de tester si des brebis Lacaune (a) en présence de béliers, ovulent spontanément au printemps et si oui dans quelles proportions et (b) quelle est l'efficacité d'un effet bélier au printemps en termes d'ovulations.

A cette fin, cette expérience utilisera 45 brebis Lacaune et 5 béliers vasectomisés.

Sur le plan des 3 R, les précautions suivantes seront prises :

- remplacement : aucune méthode ne permet à l'heure actuelle d'étudier une réponse physiologique intégrée comme l'effet mâle par des méthodes substitutives in vitro ou de modélisation.

- réduction : le nombre d'animaux a été réduit au maximum compte tenu des techniques utilisées.

- raffinement : les animaux seront hébergés dans leur lieu d'élevage en groupes sociaux sur paille. Pour réduire la douleur lors de la prise de sang et limiter l'angoisse des animaux, les brebis sont entraînées à coopérer. Ainsi un travail au préalable d'habituation au couloir de circulation et à la contention est réalisé. La contention est faite par une personne habilitée, que les brebis connaissent. Si un des points limites est observé sur une brebis : baisse de l'ingestion, réticence au déplacement, incapacité à se déplacer, interactions sociales altérées (brebis à l'écart) la prise de sang ne se fera pas.

17956 L'aquaculture française représente un secteur économique important. La France est l'un des principaux producteurs de truites arc-en-ciel en Europe avec une production de 38 000 tonnes et un chiffre d'affaires de 120 millions d'euros par an. Les virus aquatiques sont responsables des maladies piscicoles les plus importantes. Ils induisent des pertes économiques sévères chez les producteurs de truites arc-en-ciel et de carpe. Au-delà de ces aspects financiers, les virus nuisent au bien-être et à la santé des poissons et impactent l'écosystème. Il est donc urgent de mettre au point des méthodes efficaces pour lutter contre ces agents pathogènes. Aujourd'hui, la vaccination constitue la méthode de prophylaxie sanitaire (processus visant à prévenir l'apparition, la propagation ou l'aggravation d'une maladie) la plus efficace contre les maladies virales. Ce projet a pour finalité de lutter contre ces maladies en définissant les facteurs de virulence (molécule produite par un virus qui contribue au caractère pathogène) de plusieurs virus reconnus comme majeurs par l'organisation mondiale de la santé animale (OIE) et en développant des stratégies vaccinales efficaces et sans danger pour les animaux et l'environnement.

L'étude des maladies infectieuses des poissons repose sur la caractérisation de l'agent pathogène et de ses interactions avec l'hôte, analysées par une combinaison d'approches complémentaires menées *in vitro* en culture cellulaire et *in vivo* chez l'animal. La complexité des mécanismes engagés dans les relations hôte-pathogène nécessite la reproduction expérimentale des maladies. Cela permet d'étudier les effets cliniques et la virulence des virus, d'établir des critères d'appréciation quantitative de la maladie et de pouvoir ainsi comparer les souches virales en termes de sévérité des symptômes induits. C'est sur le même principe que sont réalisés les essais vaccinaux impliquant l'appréciation précise des effets protecteurs induits par les vaccins. Nous avons donc développé des modèles d'administrations par bain et/ou injection sur de très jeunes alevins (stade le plus sensible aux infections virales). Ces modèles ont été rigoureusement standardisés et peuvent être de ce fait employés avec des économies de moyens en animaux, répondant ainsi aux exigences de réduction de leur utilisation. Les conditions d'hébergement des poissons prennent en compte leur bien-être : température et oxygénation de l'eau, circulation d'eau leur permettant de nager correctement, respect des densités d'animaux par aquarium... Nous étudions des virus largement représentés dans les élevages français (rhabdovirus, alphavirus...) en appliquant des protocoles qui permettent d'étudier leur voie d'entrée, leur virulence et aussi de valider des vaccins potentiels. L'administration par bain est privilégiée. L'intérêt du bain est son aspect pratique limitant le stress des animaux par l'absence de manipulation et permet une administration du virus dans les conditions les plus proches de l'infection naturelle. Les administrations sont réalisées par injection lorsqu'il est important de contrôler précisément la dose d'agent pathogène administrée à chaque poisson et de synchroniser l'infection. Tous les poissons reçoivent la même dose de virus au même temps, ce qui est plus difficile à maîtriser dans le cas d'une administration par bain. La manipulation des animaux se fait sous anesthésie afin de limiter leur stress. Les protocoles ainsi définis peuvent être associés à des traitements vaccinaux ou immunisants (processus visant à induire une protection antivirale chez l'animal traité) et/ou à des prélèvements de matériel biologique réalisés après euthanasie des animaux pour caractérisation au laboratoire. En plus des deux espèces à valeur agronomique (truite et carpe), le modèle poisson zèbre sera également utilisé pour affiner nos connaissances dans les interactions hôte-virus. Ce modèle offre de nombreux outils de génomique et de nombreuses lignées transgéniques non disponibles chez la truite et la carpe et permettra l'étude approfondie de l'immunité antivirale.

Ce projet se décline en trois procédures et le total des animaux utilisés sera de 15 000 poissons (truite, carpe et poisson zèbre) maximum sur 5 ans. Cela correspond au test annuel d'une trentaine de souches virales ou candidats vaccins dérivés des 4 virus les plus problématiques en France et en Europe. La répartition entre espèces est la suivante : 60 % de truite, 20 % de carpe et 20 % de poisson zèbre. Le nombre de poissons par groupe est de 50 pour les administrations par bain et de 30 pour les administrations par injection. Ce nombre a été calculé afin de prendre en considération la variabilité génétique généralement observée sur ce type de modèle animal et la très petite taille des alevins (1 à 5 cm) afin d'effectuer les prélèvements en quantités suffisantes pour les analyser et de valoriser scientifiquement les résultats. L'état de santé des animaux sera suivi 2 fois par jour pendant 10 à 60 jours selon le virus étudié. Ce suivi sera associé à des prélèvements de matériel

biologique effectués après euthanasie des animaux pour caractérisation au laboratoire. Des critères d'arrêt ont été définis : nage erratique et non réponse à des stimuli externes. Ce projet s'inscrit dans une démarche compatible avec la règle des 3R : 1) nous veillons à réduire les effectifs de poissons autant que possible pour obtenir des résultats significatifs, en tenant compte des mortalités estimées, et nous effectuons les expériences dans un environnement optimal pour les animaux. 2) les procédures décrites sont complémentaires aux expériences sur des lignées cellulaires (in vitro) car elles visent à comprendre les interactions hôte-virus dans leur intégralité (virulence, réponse immunitaire, résistance à l'infection...). 3) les animaux sont gardés en lots, aucun animal ne sera isolé ce qui est très important pour le bien-être des poissons. La présence de congénères constitue un élément important d'enrichissement du milieu, car c'est la seule possibilité dont nous disposons, l'ajout d'objet dans les aquariums pouvant provoquer des blessures et rendre les observations des animaux très difficiles.

17957 Ce projet a pour but d'évaluer le potentiel thérapeutique des cellules foetales du mésencéphale ventral pour le traitement de la maladie de Parkinson. La maladie de Parkinson est une maladie du cerveau qui se traduit par des troubles moteurs dus à la mort progressive et accélérée de cellules appelées neurones dopaminergiques dans une région précise du cerveau : la substance noire. Ces neurones localisés dans la substance noire envoient des projections vers le striatum (autre région du cerveau spécialisée dans la fonction motrice). Une des approches thérapeutiques expérimentales de la maladie de Parkinson consiste à greffer des neurones foetaux dopaminergiques dans le striatum. Chez les patients parkinsoniens, des essais cliniques de transplantation de neuroblastes provenant de fœtus humains, ont abouti à certaines améliorations motrices, mais n'ont pas encore atteint un niveau justifiant leur utilisation en routine. En effet, cette approche pose un problème, le striatum n'est pas la structure cérébrale dans laquelle se trouvent normalement les neurones dopaminergiques. Dans la perspective de développer une approche thérapeutique visant à restaurer les neurones dopaminergiques dans leur structure d'origine, l'objectif de notre projet sera d'évaluer le bénéfice de la greffe dans la substance noire (intranigrale) par rapport à la greffe dans le striatum (intrastriatiale) de neurones dopaminergiques dans un modèle murin de la maladie de Parkinson. Ce modèle est très largement caractérisé dans la littérature et est maîtrisé au sein du laboratoire. Deux sources de cellules génétiquement modifiées seront utilisées, une qui permettra de distinguer toutes les cellules greffées (neurones et cellules gliales) et une autre qui permettra de distinguer uniquement les neurones dopaminergiques.

Un protocole complet nécessite l'utilisation de 310 souris. La règle des 3R a été prise en considération. De nos jours, il n'est pas encore possible de modéliser un cerveau de mammifère in vitro, qui nous permettrait d'étudier la transplantation et donc de remplacer cette étude par des expériences in vitro. Nous avons réduit au maximum le nombre d'animaux nécessaires en expérimentation tout en s'assurant d'en avoir le nombre suffisant pour avoir une étude interprétable sur le plan statistique. Enfin, la notion de raffinement a été appréhendée à travers les conditions d'expérimentation qui sont optimisées (sédation et analgésie pour toute manipulation douloureuse ou stressante) afin de s'assurer du bien-être des animaux tout au long des procédures expérimentales.

17958 Les contraintes hydriques de l'environnement devraient favoriser l'évolution de stratégies de conservation de l'eau et d'optimisation de son utilisation. Ces adaptations impliquent principalement des mécanismes de réduction des pertes hydriques cutanées et/ou respiratoires mais aussi des modifications du métabolisme. Les capacités d'acclimatation des pertes hydriques ont déjà été mises en évidence chez certaines espèces d'amphibiens. Cependant, peu d'études ont jusqu'à présent comparé les différents mécanismes de pertes hydriques chez les rainettes qui sont des amphibiens arboricoles, fortement exposés à la dessiccation.

Nous échantillonnerons 3 espèces proches (rainette verte, rainette ibérique et rainette méridionale) qui coexistent dans le Sud Ouest. Ces trois espèces diffèrent dans leur répartition et semblent réagir différemment aux conséquences du réchauffement climatique. La morphologie, les pertes hydriques totales et cutanées, le métabolisme au repos seront caractérisés dans un contexte comparatif.

Nous échantillonnerons 4 populations de chaque espèce en capturant un nombre limité mais homogène d'individus dans chaque population (10 mâles adultes maximum). L'effectif maximal d'individus sera donc 120 individus (10 individus x 4 populations x 3 espèces). Les animaux seront transportés et maintenus en captivité dans des conditions optimales et enrichies de dispositifs d'abris et de thermorégulation. Nos protocoles de mesures seront faiblement invasifs et les animaux seront tous relâchés sur le terrain après une période de captivité maximale de 18 jours. Les rainettes sont particulièrement pertinentes pour tester nos hypothèses et caractériser des adaptations écophysiologiques face aux changements climatiques (pertes hydriques cutanées, métabolisme).

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

- Remplacement: ce projet fait appel à des études sur organisme entier. Les questions étudiées concernent spécifiquement les rainettes. Un remplacement n'est donc pas envisageable
- Réduction: nous avons réduit au maximum les effectifs par populations (10 individus) pour pouvoir détecter des effets interprétables statistiquement.
- Raffinement: Aucun marquage individuel ne sera pratiqué, les animaux seront identifiés par des photographies et isolés individuellement pendant le séjour en captivité. Les conditions de captivité (température, hygrométrie) seront optimisées avec un enrichissement du milieu (différents abris, substrats) répondant aux besoins de l'espèce.

17959 De nombreuses études scientifiques ont constaté le déclin des populations d'oiseaux dans les zones agricoles. Parmi de nombreuses hypothèses, l'exposition à des pesticides a été suggérée comme un des phénomènes pouvant expliquer ce déclin. Bien que l'on sache actuellement qu'une exposition à des taux élevés de pesticides peuvent avoir des effets toxiques et mortels chez les organismes, peu de choses sont connues quant aux effets de doses environnementales faibles comme celles retrouvées dans de nombreuses cultures. Nous souhaitons donc tester expérimentalement l'effet d'une exposition à des doses environnementales de fongicides (triazoles) sur la reproduction des moineaux domestiques, et le développement de leurs poussins (morphologie, physiologie, survie). Nous allons pour cela exposer expérimentalement via l'eau de boisson durant l'ensemble de la saison de reproduction (5 mois) des couples de moineaux domestiques captifs (maintenus en volières) à des doses de triazoles similaires à celles retrouvées dans les agroécosystèmes avoisinants (1mg/L). La moitié des couples captifs seront gardés dans trois volières avec de l'eau de boisson contenant des triazoles (N = 15 couples) tandis que l'autre moitié des couples captifs seront gardés dans trois autres volières avec de l'eau de boisson sans triazoles (N=15 couples). Nous effectuerons alors un suivi régulier des nichoirs pour mesurer les dates d'entrée en reproduction, les tailles de pontes et les tailles de nichées (à l'envol). De plus, nous examinerons la croissance des poussins (N = 150 poussins, en se basant sur une moyenne de 5 poussins par couple) grâce à des relevés morphologiques (tarse, masse corporelle). Cette étude concernera donc 210 oiseaux: 60 adultes et 150 poussins. L'effet sur la physiologie des poussins sera évalué grâce à deux prélèvements sanguins réalisés le 12ème et le 30ème jour après éclosion. L'effet sur la physiologie des adultes sera évalué grâce à deux prélèvements sanguins réalisés avant et après la reproduction. Grâce à cette approche expérimentale, ce projet scientifique tend à mieux comprendre 1) les conséquences d'une pollution aux triazoles sur la capacité des moineaux à se reproduire (date de ponte, nombre d'oeufs, nombre de poussins produits); 2) l'effet d'une exposition aux triazoles sur le développement des poussins de Moineaux domestiques (croissance morphologique, condition corporelle, longueur des télomères) ; 3) l'effet d'une exposition aux triazoles sur la physiologie des adultes reproducteurs. Au maximum, la taille d'échantillon pour cette étude sera de 60 adultes et de 150 poussins. La règle des 3R a été prise en compte de la façon suivante : le Remplacement n'est pas possible car les expériences ciblent spécifiquement cette espèce qui est l'une des espèces sauvages les plus appropriées pour étudier cette problématique (retrouvée dans les agroécosystèmes). La Réduction a été prise en compte en limitant au minimum le nombre d'animaux employés (30 couples reproducteurs seulement), ce qui est possible grâce à l'utilisation d'une approche expérimentale puissante statistiquement. Également, les prélèvements sanguins ainsi que les mesures morphologiques seront réalisés en nombres limités tout en permettant des analyses statistiques robustes. Enfin, le Raffinement

comprendra l'enrichissement des volières avec notamment la mise en place de refuges, de végétation et d'abris, et en assurant un environnement sociale approprié pour cette espèce.

17960 Intitulé du projet : Effets de l'électrostimulation neuromusculaire sur la régulation du programme myogénique des cellules souches musculaires

Durée du projet : 24 mois

Mots clés : cellules souches musculaire, force musculaire, accrétion de noyaux, hypertrophie, entraînement.

Finalité du projet : recherche fondamentale

Objectifs et bénéfices escomptés du projet

L'électrostimulation neuromusculaire (ESNM), technique consistant à appliquer des stimulations électriques par l'intermédiaire d'électrodes disposées à la surface du muscle afin de générer une contraction musculaire involontaire, est couramment utilisées chez l'Homme pour augmenter la force et la masse musculaire dans des contextes pathologiques ou chez l'individu indemne de pathologie (e. g. , athlètes de haut niveau). Plus particulièrement, ces effets bénéfiques pourraient s'expliquer par une augmentation du nombre de noyaux (ou accrétion de noyaux) au sein de la myofibre. Nous avons pour hypothèse que cette accrétion de noyaux pourrait être liée à la fusion des cellules souches musculaires (ou cellules satellites) avec les myofibres existantes. L'objectif de ce projet de recherche fondamentale est d'étudier comment l'ESNM régule le programme myogénique des cellules souches musculaires dans un modèle murin indemne de pathologie (i. e. , animaux sains). Ce projet permettra à court terme de mieux comprendre le rôle des cellules souches musculaires dans le maintien du bon fonctionnement du muscle strié squelettique et à long terme de proposer des protocoles efficaces de reconditionnement musculaire dans des pathologies pour lesquelles l'activité physique volontaire est difficilement réalisable (e. g. , patients atteints de cancer, d'insuffisance cardiaque ou respiratoire...).

Nuisances prévues :

Les animaux seront soumis à des protocoles d'ESNM réalisés sous anesthésie générale. Brièvement, les animaux anesthésiés sont placés sur une couverture chauffante pour les maintenir à température physiologique. Le pied de l'animal est positionné sur une pédale qui permet d'enregistrer la force produite par les muscles du mollet en réponse à des stimulations électriques. Celles-ci sont délivrées de manière non-invasive à l'aide de deux électrodes positionnées à la surface des muscles du mollet, la première étant située juste au-dessus du tendon d'Achille, la seconde étant positionnée sous le genou. Ce dispositif expérimental s'apparente aux électrostimulateurs utilisés chez l'Homme et disponibles commercialement. Chaque séance d'ESNM comprend 80 stimulations (ou contractions musculaires) d'une durée de 2 secondes et séparées par une période de repos de 8 secondes. La force produite lors de chaque contraction correspond à environ 15-25% de la force maximale de sorte que l'intensité de l'exercice peut être considérée comme légère-moderée. La durée d'une séance d'ESNM sera d'environ 20 minutes. Le protocole d'ESNM le plus long s'étalera sur un maximum de 14 semaines à raison d'un maximum de 3 séances par semaine.

Notre expérience montre que les protocoles d'ESNM n'induisent aucune altération de la fonction et de la structure musculaire (pas de déchirure ou de crampe) ainsi qu'aucun changement de mobilité, d'activité et de comportement des animaux. Aussi, les anesthésies répétées à l'isoflurane liées aux protocoles d'ESNM n'induisent pas de troubles anxieux ou de modifications du comportement, de l'activité et de la mobilité des animaux. Les animaux ne présentent aucun signe de prostration ou d'amaigrissement et sont en mesure de se mouvoir, de s'alimenter et de s'hydrater normalement dès leur réveil et dans les jours suivant la séance d'ESNM. Nous nous attendons à ce que la force et la musculaire soient augmentées par les protocoles d'ESNM reproduisant ainsi les effets bénéfiques de protocoles de musculation réalisés chez l'Homme.

Nous prévoyons d'utiliser un maximum de 72 souris et nous estimons le degré de gravité de notre procédure expérimentale comme modérée. L'ensemble des animaux sera mis à mort afin de réaliser des analyses biologiques post-mortem (histologie).

Application de la règle des « trois R »

1. Remplacement

Pour ce projet, les modèles animaux sont indispensables car la procédure implique un exercice d'ESNM qui est impossible à reproduire *in vitro*. Aussi, les études de physiologie nécessitent l'utilisation de modèles animaux car seule l'analyse du tissu, voire de l'organisme entier permet d'identifier le réel impact de ces interactions moléculaires et cellulaires sur la fonction de l'organe.

2. Réduction

Nous utilisons un dispositif expérimental totalement non-invasif qui permet de réaliser des protocoles d'ESNM (et d'enregistrer la force musculaire de manière concomitante) sur les mêmes animaux rendant les préparations chirurgicales totalement obsolètes (et réduisant ainsi le nombre d'animaux utilisés). Des banques biologiques informatisées issues des expérimentations limitent l'utilisation de nouveaux animaux car elles permettent les études histologiques pour plusieurs analyses. Des prélèvements multiples sont réalisés après euthanasie sur le même individu pour des tests parallèles.

3. Raffinement

Les protocoles les moins invasifs et les moins douloureux possibles sont privilégiés. Les procédures expérimentales utilisées incluent un recours systématique à l'anesthésie générale profonde lors de l'ESNM. Des mesures sont prises pour améliorer les conditions d'élevage afin d'enrichir l'environnement des souris. Aussi, un suivi quotidien des animaux permet d'éviter toute souffrance inutile et de prendre les mesures adéquates dans le cas d'un éventuel phénotype dommageable.

Nous utilisons une lignée de souris transgéniques qui permet le traçage des cellules souches musculaires par un marqueur fluorescent. Nous travaillons sur des animaux adultes. Les animaux seront utilisés entre 10 et 24 semaines d'âge en fonction de la durée des protocoles d'ESNM.

17961 Le cerveau est un organe extrêmement complexe dont le fonctionnement fin est encore loin d'être compris. Les recherches sur le cerveau sont essentielles sur le plan fondamental, pour comprendre les processus cognitifs, de mémorisation, d'émotions, et sur le plan médical, pour mieux comprendre la physiopathologie des maladies neurodégénératives ou psychiatriques. On sait que ceux-ci siègent au moins en partie dans le cortex préfrontal et qu'ils sollicitent des processus cognitifs tels que l'attention sélective, la mémoire de travail, le traitement de séquences abstraites et la perception consciente. Notre projet vise à comprendre l'organisation des microcircuits neuronaux des régions impliquées, ainsi que les interactions dynamiques entre elles en utilisant des méthodes de pointe en électrophysiologie et bio-imagerie. Ces méthodes permettent d'acquérir des données sur les "corrélats neuronaux de la conscience", c'est-à-dire les changements neuronaux qui se produisent lorsque l'on prend conscience de quelque chose dans le monde extérieur.

Les activités cérébrales étudiées dans ce projet ne sont pas suffisamment bien comprises pour être reproduites *in silico*. Il est donc nécessaire de recourir à un modèle animal, ici le primate non humain (PNH). Le PNH est le modèle animal qui se prête le mieux à ces recherches grâce à ses similitudes génétiques et cérébrales très fortes avec l'Homme. De par ses capacités cognitives avancées, les PNHs peuvent être entraînés à réaliser des tâches cognitives complexes, qui sont spécifiquement affectées lors de maladies mentales comme la schizophrénie et l'autisme.

Pour les expériences électrophysiologiques, nous utiliserons de petits faisceaux de fils métalliques implanté de manière chronique dans le cerveau pour enregistrer directement des neurones. Des techniques similaires sont utilisées à très petite échelle chez des patients atteints d'épilepsie. Le principal avantage de cette technique est de visualiser l'activité globale de populations neuronales composées de centaines de neurones, et de pouvoir faire le lien avec le niveau anatomique de ceux-ci, en visualisant la forme et le type cellulaire des neurones. De nombreux tests chez l'animal

sont nécessaires afin de s'assurer de l'innocuité de cette technique avant de pouvoir envisager un passage chez l'Homme. Les animaux seront soit impliqués dans des tâches comportementales actives, soit dans des expériences sous anesthésie générale afin de déterminer le rôle de la conscience dans le traitement cérébral de l'information sensorielle. Enfin, nous pourrions faire la comparaison entre les mécanismes neuronaux de la cognition du PNH et de l'homme grâce à des enregistrements par magnétoencéphalographie (MEG) chez des sujets sains.

Ce projet implique 21 animaux, tous issus d'un élevage agréé et dédié aux études scientifiques. Des expériences préliminaires, des tests statistiques, ainsi que l'étude de la littérature ont permis de réduire ce nombre au minimum nécessaire pour obtenir des résultats exploitables.

Le projet implique l'étude des fonctions cognitives supérieures, de ce fait les tâches comportementales sont difficiles et nécessitent que les animaux soient à l'aise et concentrés. Ces tâches sont conçues pour maintenir l'attention des animaux et satisfaire la curiosité de ces animaux intelligents. Tous les implants chirurgicaux sont chroniques et doivent avoir un effet très limité sur le bien-être des animaux afin qu'ils puissent travailler sur ces tâches difficiles. De plus, quand cela est possible, les animaux seront hébergés en groupe afin de conserver un contact social proche de celui de qu'ils ont dans la nature, et une large variété d'enrichissements auditifs, visuels, tactiles, et alimentaires sont mis à leur disposition, pour garder les animaux curieux et flexibles sur le plan cognitif. Finalement, l'état de santé des animaux sera contrôlé de manière régulière avec une attention particulière portée au bien-être animal, socialement et cognitivement, socialement et cognitivement. Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par un vétérinaire avant d'être réalisés par un médecin hospitalier spécialement formé. Les paramètres physiologiques (pouls, fréquence respiratoire, tension, etc.) seront suivis continuellement pendant les examens. Le modèle primate a un statut unique en neurosciences car il nous permet d'étudier précisément les corrélats neuronaux de fonctions cognitives supérieures, comme l'attention sélective, la mémoire de travail, le traitement de séquences abstraites et la perception consciente. Des études précédentes de notre laboratoire mettent en évidence le rôle du cortex préfrontal, ainsi que les aires sensorielles primaires.

L'étude de l'activité cérébrale sera réalisée sur des primates non-humains (PNH) soit impliqués dans des tâches comportementales actives, soit sous anesthésie générale afin de déterminer le rôle de la conscience dans le traitement cérébral de l'information sensorielle. Enfin, nous pouvons effectuer une comparaison de ces mécanismes neuronaux de la cognition entre PNH et humains grâce à des enregistrements par magnétoencéphalographie chez des sujets humains.

Le PNH est le modèle animal qui se prête le mieux à ces recherches grâce à ses similitudes génétiques et cérébrales très fortes avec l'homme. De par ses capacités cognitives avancées, les PNHs peuvent être entraînés à réaliser des tâches cognitives complexes qui sont affectées lors de maladies mentales comme la schizophrénie et l'autisme. Les singes macaques sont également le modèle le plus utilisé en neurosciences, ce qui permettra des comparaisons avec d'autres études dans le monde.

Ce projet implique 21 animaux, tous issus d'un élevage autorisé et dédié aux études scientifiques. Des expériences préliminaires, des tests statistiques, ainsi que l'étude de la littérature ont permis de réduire ce nombre au minimum nécessaire pour obtenir des résultats exploitables.

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

17962 Les anticoagulants oraux sont des médicaments indispensables dans le traitement des phlébites et embolies pulmonaires, ainsi que dans la prévention des accidents vasculaires cérébraux dans certaines pathologies. Depuis 5 ans, de nouveaux anticoagulants oraux (NACO) sont apparus sur le marché. Ils peuvent, comme les autres anticoagulants, être à l'origine de complications

hémorragiques parfois graves. Ces anticoagulants oraux ont l'inconvénient, du moins actuel, de ne pas disposer d'antagonistes en cas de complications hémorragiques graves, d'être « nouveaux » avec un recul faible sur les effets à long terme, de ne pas disposer de dosage biologique attestant une prise correcte et d'être sensiblement plus coûteux. De plus les anticoagulants oraux directs ne peuvent être donnés pour certaines populations à risque (patients âgés, insuffisants rénaux et hépatiques, patients polymédiqués). Les RGTA (Regenerating Agents) comprennent OTR4120, OTR4132 et d'autres formes actuellement en cours de développement, sont des polymères de glucose modifiés obtenus par synthèse chimique. OTR4132 et OTR4120 sont des dérivés du dextrane avec carboxyméthyl structurellement définies et des groupes sulfates. L'activité anticoagulante de l'OTR4120 et de l'OTR4132 ont été mise en évidence in vitro et à des fortes doses par voie orale et intrapéritonéale chez la souris. Le passage de ces médicaments par voie orale est une étape importante dans la production de ces médicaments pour le traitement des maladies cardiovasculaires. Pour la cinétique avec 13 points (0, 5, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 24h, 3j, 7j et 30j. Pour chaque formulation : $13 \times 5 = 65$ souris pour 2 formulations (OTR4120 et OTR4132) $2 \times 65 = 130$ souris. Objectif de cette étude: nous souhaitons compléter et valider notre étude pharmacocinétique des RGTA. Comme les résultats de l'activité anticoagulante sont satisfaisants, nous compléterons l'étude par injection intraveineuse du médicament chez la souris. L'administration d'un médicament par deux voies d'administration est exigée pour toute étude pharmacocinétique d'un médicament d'où la nécessité de faire ce travail. Pour cette étude, nous respecterons au mieux la règle des 3R : - Remplacement : Alors que nous avons déjà mis en évidence l'activité anticoagulante de RGTA in vitro et in vivo, nous avons besoin d'avoir des données pharmacocinétiques pour compléter notre étude à des doses spécifiques de RGTA compatibles avec une utilisation clinique afin de développer une forme orale de RGTA en vue d'une utilisation thérapeutique. De telles études nécessitent l'utilisation de modèles animaux. - Réduction : Pour chaque condition expérimentale, un nombre minimal de souris sera utilisé afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. - Raffinement : le sang sera prélevé pour étudier tous les paramètres hématologiques et biochimiques constants. Nous prélevons aussi les organes pour étudier la distribution du produit et calculer les paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques chez l'animal. Les animaux anesthésiés et analgésiés seront sacrifiés immédiatement après prélèvement, réduisant ainsi la souffrance animale. Notons que dans nos études antérieures, aucune toxicité n'a été observée sur des animaux auxquels des RGTA ont été administrés aux doses que nous utiliserons.

17963 La contamination par des polluants peut avoir de nombreux effets délétères sur la physiologie et le comportement des individus et se répercuter à l'échelle de la population.

Le comportement reproducteur est particulièrement intéressant de ce point de vue. En tant que comportement, il intègre des processus physiologiques sensoriels, cognitifs, moteurs, et est donc très sensible à la perturbation de ces processus par la contamination, y compris à faible dose. Par ailleurs, la reproduction est une fonction fondamentale du vivant, et son altération au niveau individuel impacte fortement la démographie et l'évolution des populations. Enfin, parce que la reproduction implique des interactions entre individus, l'altération du comportement reproducteur d'un individu par les contaminants peut impacter la reproduction des autres individus, même non contaminés. Les anxiolytiques, qui agissent sur le stress, sont susceptibles d'interférer avec le comportement reproducteur car l'investissement énergétique important et les nombreuses interactions sociales sont sources d'un fort stress pour toutes les espèces animales. Chez certaines espèces comme les lamproies, le stress lié à la reproduction est si élevé qu'il mène à la mort des géniteurs juste après la reproduction. Pourtant, les effets directs et indirects des anxiolytiques sur le comportement reproducteur n'est pas bien connu, encore moins pour les espèces mourant de stress à l'issue de la reproduction. L'enjeu écologique est grand car les anxiolytiques sont fréquemment retrouvés dans les rivières, du fait de leur utilisation massive par certaines populations humaines et l'efficacité limitée de leur traitement par des stations d'épuration.

Ce projet a pour objectif de tester l'effet d'une contamination de lamproies de Planer par une dose réaliste ($5\mu\text{g/L}$) d'oxazepam (anxiolytique de la famille des benzodiazépines) sur leur métabolisme,

leur niveau de stress et leur comportement reproducteur. Les lamproies de Planer passent toute leur vie en rivière où elles sont susceptibles d'être exposées à la contamination ; elles se reproduisent au printemps et meurent après quelques jours d'activité sexuelle, suite au stress extrême. Leur abondance dans les rivières, leur petite taille et la brièveté de leur saison de reproduction rendent aisée leur capture et l'observation de leur comportement reproducteur en aquarium.

Le principe général de l'expérience consiste à capturer des individus en milieu naturel (il n'existe pas d'élevage), en exposer une partie à 5µg/L d'oxazepam par balnéation pendant une semaine, puis comparer tout au long de la saison de reproduction (trois semaines au maximum), leur niveau de stress (dosages moléculaires) et leur comportement reproducteur (en aquarium) à ceux d'individus non contaminés. Le comportement reproducteur sera observé en continu dans 10 groupes de 8 individus (4 mâles + 4 femelles). Deux types de groupes seront réalisés : d'une part, cinq groupes témoins seront constitués d'individus non contaminés ; d'autre part, cinq groupes seront composés de deux mâles et deux femelles contaminés et deux mâles et deux femelles non contaminés. Afin de noter le comportement au niveau individuel, chaque lamproie sera marquée, sous anesthésie (30mg/L de benzocaïne) par injection de deux points d'élastomère coloré à la base de la nageoire dorsale. Ce dispositif permettra de comparer le comportement reproducteur d'individus contaminés et non contaminés situés dans un même groupe, et de comparer la structure de groupes contenant des individus contaminés ou pas. L'effet de l'oxazepam sur le stress au début de la reproduction sera évalué en dosant le contaminant et les hormones de stress dans les tissus de 10 individus contaminés et 10 individus témoins à la fin de la semaine de balnéation. Pour ce dosage, ces 20 individus seront anesthésiés puis euthanasiés par surdose de benzocaïne. Pour évaluer l'effet de l'oxazepam sur niveau de stress atteint en fin de reproduction, les individus dont le comportement reproducteur aura été observé et qui montreront des signes d'agonie (nage déséquilibrée, immobilité prolongée accompagnée d'hyperventilation) seront également anesthésiés puis euthanasiés pour doser l'oxazepam et les hormones de stress dans leurs tissus. Au total, ce projet implique 100 individus : 80 pour l'observation du comportement et du stress en fin de reproduction, et 20 pour la quantification du stress avant la reproduction.

Notre approche expérimentale sur la physiologie et le comportement des lamproies ne peut pas être remplacée par une approche exclusivement numérique ou in vitro car elle concerne les individus entiers, qui interagissent. Par ailleurs, le projet portant spécifiquement sur la lamproie de Planer, pour laquelle il n'existe pas d'élevage, nous devons travailler avec des individus capturés dans le milieu naturel. Deux stratégies sont adoptées pour réduire le nombre d'individus utilisés : d'une part, chaque individu fera l'objet de multiples observations à la fois au niveau comportemental, biochimique et physiologique. D'autre part, pour l'observation du comportement les 40 individus du lot témoin correspondront au lot témoin d'une autre expérience menée en parallèle. Concernant le raffinement, les aquariums seront alimentés en eau de la rivière d'origine et enrichis (tuiles pour se cacher, cailloux pour se reproduire) afin de limiter le stress. Dans la nature, l'accumulation de stress lié à l'investissement énergétique dans la reproduction est telle que les lamproies meurent systématiquement après leur unique saison de reproduction, parfois après plusieurs jours d'agonie. Dans notre dispositif expérimental, nous observerons au moins trois fois par jour les individus pour détecter les premiers signes comportementaux d'agonie (nage déséquilibrée, immobilité prolongée accompagnée d'hyperventilation) et anesthésier puis euthanasier les animaux.

17964 Les papillomavirus humains (HPV), récemment caractérisés comme des virus du microbiome humain cutané et muqueux, sont majoritairement associés à des infections asymptomatiques. Cependant dans certains contextes qui dépendent à la fois de l'hôte, du type d'HPV infectant, et de mécanismes encore méconnus, les HPV sont responsables de lésions qui peuvent régresser (i. e. verrues) ou évoluer en dysplasie et en cancers quand elles ne sont pas contrôlées par l'hôte. Ainsi le cancer du col de l'utérus qui est le troisième cancer féminin dans le monde, responsable de plus de 200 000 décès annuels, est causé par certains types d'HPV. Les HPV sont des virus qui infectent sélectivement les cellules humaines de la peau et des muqueuses (kératinocytes) et dont le cycle de vie productif est strictement dépendant du développement et de la différenciation des épithéliums

humains, rendant la mise en place de modèles d'étude particulièrement complexe. Les HPV ne peuvent être ainsi cultivés in vitro que dans des épithéliums pluristratifiés humains, cultures délicates que notre laboratoire met en œuvre. Cependant dans cet unique modèle d'étude des interactions entre HPV et son hôte humain, seul le rôle des cellules cibles de l'infection (kératinocytes) est pris en compte. Afin de considérer également le rôle du système immunitaire, nous proposons de réaliser un modèle de souris doublement humanisées pour la peau et le système immunitaire. Nous grefferons des équivalents cutanés humains ou 3D-OEC qui proviennent de cultures organotypiques 3D de kératinocytes humains primaires.

Dans le cadre de ce projet, nous avons et allons appliquer la règle des 3R.

1) Remplacer : nous avons réalisé une étude complète du cycle réplicatif d'HPV in vitro et avons testé l'enrichissement des cultures 3D-OEC en cellules immunitaires. C'est forts de cette expertise et en maîtrisant l'ensemble des paramètres de ces cultures que nous allons travailler.

2) Réduire : pour réduire le nombre d'animaux requis pour notre projet, nous allons dans un premier temps optimiser la procédure de greffe de peau, portant ou non HPV, chez des animaux immunodéficients (IDEF), chez lesquels nous n'aurons pas de risque de rejet du greffon et pourrons analyser les éventuels effets de la réplication d'HPV sur la prise du greffon. Dans un second temps, la procédure sera transposée chez des animaux ayant un système immunitaire humanisé (HIS), chez lesquels la prise de greffe et la colonisation du greffon par des cellules immunitaires humaines seront analysées pour des greffons porteurs ou non d'HPV.

3) Raffiner : des greffons générés à partir des mêmes kératinocytes, porteurs ou non d'HPV, seront comparés dans nos expériences. Cet appariement permettra de réduire les biais liés au donneur de kératinocytes, et donc de réduire le nombre d'animaux nécessaires.

Grâce à la mise en place de ces protocoles optimisés, et en tenant compte du nombre minimum de souris requises pour obtenir des données statistiquement exploitables, le nombre total de souris utilisées pour ce projet sera de 125.

17965 L'apprentissage du langage oral humain repose sur l'existence d'un retour sensoriel en temps réel, principalement auditif mais aussi proprioceptif et visuel. L'acquisition des représentations phonologiques pendant l'enfance et leur maintien à l'âge adulte est dépendant du retour auditif permettant un rétrocontrôle. En effet, la dégradation progressive des représentations motrices phonologiques chez l'adulte devenu sourd après l'apprentissage de la parole est avérée, conduisant à une dysphonie caractéristique et à une baisse de l'intelligibilité de la parole. L'hypothèse actuelle est qu'un retour auditif, au moins partiel, est nécessaire pour contrôler de façon fine l'activité motrice de l'appareil vocal et ainsi moduler la hauteur et la durée des phonèmes ou des syllabes. Cependant, cette idée n'est soutenue que par des preuves indirectes fondées sur des études de cas chez le sujet humain et des études de surdité provoquée chez l'oiseau qui ne testent pas cette hypothèse en particulier.

Hormis l'espèce humaine, ce comportement ne se retrouve que chez peu de mammifères mais est en revanche plus commun chez les oiseaux, en particulier les oiseaux chanteurs. Les oiseaux chanteurs possèdent un réseau de structures cérébrales impliquées dans l'apprentissage, la perception et la production du chant. Ils sont actuellement considérés comme un modèle animal d'étude des bases neurales du langage ; leurs vocalisations présentant des points communs avec la parole humaine et les structures cérébrales impliquées dans ce comportement partagent de nombreuses similitudes notamment moléculaires et cellulaires.

Les oiseaux chanteurs sont capables d'apprendre leur chant en imitant le chant d'un congénère (un tuteur) qu'ils ont mémorisé sous la forme d'un modèle auditif. La question de savoir s'ils ont d'autres moyens d'apprendre un chant n'a été que peu explorée. Nous émettons l'hypothèse que le besoin d'information fiable sur leur chant est plus fort que le désir d'apprendre un chant particulier, c'est pourquoi les oiseaux devraient être capables d'apprendre un chant sans jamais entendre un chant de tuteur au cours de leur vie. En outre, nous soupçonnons que ce besoin de percevoir un retour d'information est également présent chez les apprenants dits non vocaux, de sorte que ceux-ci peuvent être manipulés pour apprendre une vocalisation, à condition qu'elle réponde à ce besoin.

Pour répondre à ces questions, nous rendrons sourds des diamants mandarins (jeunes mâles élevés en absence d'un tuteur adulte ou femelles adultes) et testerons s'ils peuvent modifier leurs vocalisations grâce à des stimuli lumineux complexes contingents à des paramètres acoustiques des vocalisations qu'ils produisent. Nos études préalables ont permis d'établir une méthode optimale pour rendre les oiseaux sourds ce qui contribue à limiter le nombre d'animaux à utiliser dans nos expériences. Nos expérimentations impliqueront donc de rendre sourd au maximum 80 oiseaux qui seront répartis dans 4 groupes d'étude différents. A ces individus, s'ajoutent 75 femelles liées à l'élevage des jeunes mâles mais pour lesquelles aucune procédure invasive ne sera menée. Utiliser des oiseaux chanteurs nous permet d'isoler l'audition impliquées dans le contrôle vocal via l'ablation de la cochlée afin de les rendre sourds. Une perte de l'audition instantanée et complète est rare chez le sujet humain adulte rendant impossible l'acquisition d'enregistrements vocaux avant et après une surdité. L'utilisation d'un modèle animal est essentielle pour pallier à ces limites expérimentales.

Les expérimentations s'étaleront sur cinq années et seront conduites sur un petit nombre d'oiseaux à la fois, ce qui permettra de ne collecter que le nombre de données nécessaires pour obtenir suffisamment de puissance statistique pour les résultats.

L'étude du contrôle vocal des oiseaux nécessite qu'ils soient dans les meilleures conditions et nos travaux récents ont mis en lumière des indicateurs de bien-être chez les oiseaux, notamment sur la quantité de vocalisations produites lors d'une journée. Les oiseaux seront maintenus en isolement social pendant la durée des expérimentations mais mis régulièrement au contact de congénères, afin de limiter le stress lié à l'isolement. Leur milieu de vie sera enrichi et les oiseaux seront contrôlés au quotidien afin d'évaluer les niveaux potentiels de douleur et de souffrance. Un antalgique sera administré lors des anesthésies générales et tant que des signes extérieurs de douleur seront observés. Enfin, la décision du devenir des animaux à la fin des expérimentations, notamment la possibilité d'héberger les oiseaux sourds dans des cages séparées de congénères entendants, sera soumise à avis du vétérinaire référent.

17966 La production de viande de volaille a augmenté dans le monde entier depuis 1961 et d'après la FAO, on s'attend à ce que la viande de volaille devienne bientôt la principale source de protéines. L'efficacité de la croissance des poulets de chair a augmenté au cours des dernières décennies grâce à la sélection génétique et à l'amélioration de la nutrition. Cependant, cette production est confrontée à de nouveaux défis, notamment : le changement climatique, une demande croissante de viande ainsi que des exigences sociétales sur le bien-être des animaux (Mottet et Tempio, 2017). Le stress thermique chez le poulet est un sujet de plus en plus récurrent ces dernières années à cause de l'augmentation de la fréquence, de la sévérité et de la durée des épisodes de canicule dues au changement climatique, ainsi que le développement croissant d'élevages dans des zones équatoriales. Ce stress a un impact économique important sur la rentabilité de l'élevage suite à l'augmentation de la mortalité, la réduction des performances et la baisse de la qualité de la viande. Sont également affectés la santé et le bien-être des animaux. Les poulets sont très sensibles à la chaleur du fait de leur température corporelle élevée et l'absence de certains systèmes de régulation. Ils ne possèdent pas de glandes sudoripares et sont couverts des plumes. Ainsi les poulets élevés en conditions chaudes dissipent difficilement la chaleur vers leur environnement. Ils manifestent des changements comportementaux qui se caractérisent par une diminution de l'ingéré et une hyperventilation. Cela se traduit au niveau physiologique par des modifications métaboliques, hormonales et du système immunitaire qui se répercutent sur la qualité de la viande après l'abattage.

Le stress oxydatif est l'un des facteurs majeurs du stress thermique qui se reflète par une augmentation de la production de radicaux libres. Ces entités vont réagir avec leur environnement et rompre de nombreuses molécules biologiques (structurelles et fonctionnelles) : protéines, ADN, lipides, tout en induisant la production d'autres radicaux libres (réaction en chaîne). Si ce mécanisme délétère n'est pas rapidement contrôlé, le stress oxydatif va conduire à des dysfonctionnements cellulaires qui vont accentuer l'effet du stress thermique. Outre la santé globale de l'animal et son statut immunitaire, le stress oxydatif peut indirectement affecter la qualité de la

viande avant l'abattage. En effet, les agents oxydants présents dans la viande affectent l'intégrité des tissus, induisant une perte d'eau par les cellules graisseuses et musculaires, et un changement de la couleur de la viande.

L'utilisation d'additifs alimentaires peut permettre d'améliorer et renforcer les défenses cellulaires des poulets et réduire l'impact du stress thermique sur la santé et les performances zootechniques des animaux, autrement dit, augmenter la résistance des poulets au stress. La méthionine et le sélénium sont des précurseurs de composés antioxydants permettant d'augmenter le potentiel redox des animaux. Ces additifs existent sous plusieurs formes sur le marché dont les effets varient suivant leur forme.

L'objectif du projet est d'étudier l'interaction entre les sources de méthionine et les sources de sélénium sur les performances, les paramètres redox, et la qualité de la viande des poulets élevés avec des températures assimilables à un climat tropical.

A chaque essai (procédure) 1728 poussins seront élevés en groupe dans 96 parquets sur litière de copeaux de 1j à 42j d'âge.

Cette procédure pourra être répétée 5 fois sur une période de 5 ans

Tout au long de l'expérimentation, l'application de la règle des 3R sera prise en compte :

Remplacer : Ce type d'étude nécessite l'utilisation d'animaux vivants puisqu'à l'heure actuelle, aucun modèle in vitro ou in silico n'est capable de représenter la complexité des mécanismes physiopathologiques de stress thermique.

Réduire : Le nombre d'animaux a été réduit à son minimum. Il est nécessaire et suffisant pour pouvoir tirer des conclusions significatives en tenant compte de nos expériences précédentes et la variabilité interindividuelle en termes de poids et d'indice de consommation au moment de la procédure expérimentale.

Raffiner :

Les poussins seront élevés en groupe dans des parquets durant toute l'expérience.

Des enrichissements appropriés du milieu de vie seront mis en place : litière copeaux, cycle lumineux adapté.

La durée de stress thermique sera limitée à 2 semaines pour la moitié des animaux et à 3 semaines pour l'autre moitié.

L'induction du stress animal est réduite grâce aux différentes conclusions que nous pourrions tirer de cette expérience, en évaluant l'effet des additifs sur des performances zootechniques et les paramètres sanguins, mais aussi, elle nous permettra de focaliser sur la qualité de la viande;

17967 Le diabète de type 2 (DT2) est l'une des maladies majeures du XXI^e siècle, reconnue comme une priorité urgente et un enjeu majeur de santé publique. Affectant actuellement environ 8% de la population mondiale, le DT2 croît à un rythme épidémique et le nombre de patients atteints devrait dépasser 500 millions dans les années à venir. La mortalité et morbidité associées à cette maladie entraînent des coûts exorbitants de santé pour ces patients qui ont été estimés en 2013 à 500 milliards de dollars dans le monde. A ce jour cependant, malgré un arsenal thérapeutique existant assez important, le traitement de cette maladie chronique complexe est loin d'être optimal car une majorité de patients diabétiques de type 2 reste mal maîtrisée dans le temps. De plus, comme pour tous les médicaments, le traitement du diabète s'accompagne souvent d'effets secondaires. Il est donc urgent de trouver de nouvelles stratégies thérapeutiques pour guérir cette maladie ou pour améliorer l'efficacité et réduire la survenue d'effets secondaires des traitements existants.

L'objectif de ce projet est donc en collaboration avec différents partenaires industriels d'étudier les effets antidiabétiques de nouvelles molécules ou alicaments en cours de développement, dans un modèle de souris rendues obèses et diabétiques par une diète riche en lipides et en sucrose (HFHSD) pendant 16 semaines. Nous étudierons en première intention les effets curatifs de ces molécules/aliments afin de déterminer si elles peuvent améliorer les troubles de l'homéostasie glucidique lorsqu'elles sont administrées chez des souris HFHSD depuis 10 semaines et pendant les 6 dernières semaines de diète. Pour celles ayant un effet positive, nous étudierons leurs

potentiels effets préventifs afin de déterminer si elles peuvent prévenir les troubles de l'homéostasie glucidique lorsqu'elles sont administrées dès le début et en parallèle de la diète HFHSD sur une durée de 16 semaines. Ces molécules/aliments seront administrées par gavage et comparées à un agent antidiabétique de référence.

Cette étude comporte donc deux procédures expérimentales et utilise un nombre maximum de 840 souris sur une durée de 5 ans. Ce chiffre estimé à minima permettra de satisfaire les analyses statistiques et de réaliser l'ensemble des analyses métaboliques et moléculaires. Les questions inhérentes à ce projet ne permettent pas le remplacement du modèle animal puisqu'il s'agit de valider *in vivo* de nouvelles molécules antidiabétiques. Cependant, conformément à la règle des 3R, des engagements pour réduire et raffiner au mieux le modèle animal seront suivis. Ainsi, chaque souris sera suivie individuellement grâce à des tests métaboliques individuels afin de collecter le plus de données biologiques, et limiter ainsi la quantité de souris au nombre minimum pour assurer des analyses statistiques. De plus, nous regrouperons systématiquement 5 molécules/aliments dans un même protocole afin d'éviter de refaire les groupes de souris contrôles. Afin d'améliorer le bien-être animal, la surveillance des souris s'effectuera tous les 1 ou 2 jours suivant les périodes (pendant ou en dehors des périodes de gavage respectivement) pour identifier et limiter au maximum tout risque de souffrance ou de mal-être. Seule une personne expérimentée réalisera les gavages quotidiens. Lors des expériences, les souris seront anesthésiées afin de limiter le stress des animaux.

17968 Les cellules Natural Killer (NK) sont des cellules de la première ligne de défense immunitaire. Elles ont principalement un rôle antiviral et anti-tumoral. Elles acquièrent en effet au cours de leur développement des fonctions leur permettant de reconnaître et d'éliminer les cellules reconnues comme anormales (cellules infectées ou cancéreuses). Les cellules NK se développent dans la moelle osseuse où elles rencontrent différentes molécules solubles ou fixées sur les cellules environnantes. Elles rejoignent ensuite la circulation et peuvent alors patrouiller l'organisme afin de détecter et d'éliminer les cellules anormales après une courte phase d'activation. Récemment, il a été montré que le métabolisme des cellules NK influençait leur différenciation et leur activation. Les gènes du métabolisme général sont bien identifiés et comprennent des gènes codant des protéines effectrices (comme les enzymes métaboliques) ou des régulateurs du métabolisme. Cependant, les gènes du métabolisme impliqués dans le développement et l'activation des cellules NK restent à découvrir.

L'objectif de cette étude est d'identifier ces gènes et de comprendre leur rôle, un objectif de portée fondamentale. La durée de l'étude est fixée à 5 ans.

Nous utiliserons la souris comme modèle expérimental, ce modèle est en effet assez proche de l'homme pour obtenir des résultats pertinents pour la compréhension de la physiologie humaine. Afin d'identifier les gènes du métabolisme impliqués dans la biologie des cellules NK, deux approches complémentaires seront utilisées : la première basée sur l'ablation et la seconde sur la surexpression d'une série de gènes candidats. Pour cela, la moelle osseuse (contenant les précurseurs des cellules NK) de souris transgéniques sera modifiée *in vitro* à l'aide de vecteurs de thérapie génique permettant d'inactiver ou de surexprimer des gènes ciblés. De plus, ces vecteurs permettent l'expression d'une protéine fluorescente marquant ainsi les cellules ciblées avec succès. La moelle osseuse infectée sera ensuite greffée à des souris receveuses afin de permettre la différenciation et l'activation *in vivo* des cellules NK. L'impact des modifications réalisées sera alors mesuré de différentes manières. En plus de son rôle dans la production de connaissances fondamentales, les résultats obtenus grâce à ce projet pourraient ouvrir la voie à des thérapies ciblant les cellules NK dans le cadre de diverses pathologies (cancers, infections virales).

Les protocoles proposés répondent à la règle des 3R (Réduire, Raffiner et Remplacer). Ce type de projet ne peut être mené sans utiliser d'animaux car le système immunitaire dont font partie intégrante les cellules NK est extrêmement complexe avec une multitude de cellules constamment en mouvement et organisées en un réseau tridimensionnel impossible à reproduire *in vitro*. Afin de réduire le nombre de souris utilisées, ce nombre a été calculé afin que les résultats aient une valeur statistique malgré les variations entre les animaux, tout en évitant les mises à mort inutiles. D'autre

part, les techniques d'analyses utilisées permettront l'analyse fine d'un grand nombre de paramètres en parallèle sur chaque animal. Le nombre d'animaux est donc estimé à 220 souris. Tout au long du projet, les conditions d'élevage, d'hébergement et de soins seront adaptées aux besoins des animaux. Lorsque la greffe réussit, les procédures utilisées dans ce projet n'occasionnent qu'une douleur et une angoisse minimales pour les animaux. Des points limites précis (perte de poids, comportement notamment) ont cependant été définis afin d'intervenir si besoin, en cas de non-prise de greffe notamment. Certaines étapes de la procédure se dérouleront d'autre part sous anesthésie afin de minimiser le stress imposé à l'animal.

17969 Les lymphocytes T sont des cellules du système immunitaire qui présentent des fonctions « tueuses » puissantes et leur capacité à reconnaître et tuer spécifiquement des cellules tumorales est un enjeu majeur. Depuis quelques années une nouvelle stratégie, CAR-T (Chimeric Antigen Receptor) est développée : elle vise à modifier génétiquement les lymphocytes T pour leur faire exprimer une molécule (récepteur) reconnaissant spécifiquement une cellule tumorale.

La plupart des protocoles de thérapie cellulaire impliquent aujourd'hui la manipulation génétique des cellules T du patient et leur réinjection chez ce même patient, on parle alors de la transplantation autologue.

Ce projet innovant vise à créer une plateforme cellulaire à des fins d'une transplantation universelle, dite allogénique (production des cellules indépendamment du patient-receveur à traiter). Pour le faire, on peut utiliser les lymphocytes T dits « précoces ». Ces cellules sont obtenues *in vitro* à partir de cellules souches hématopoïétiques du sang de cordon ombilical, à l'origine de l'ensemble des cellules sanguines.

Ce projet vise à mettre en place un modèle murin préclinique de souris humanisées pour valider l'injection des cellules T humaines « précoces » modifiées pour exprimer un récepteur chimérique.

Les souris, dépourvues de système immunitaire, sont greffées avec des cellules humaines pour leur fournir un système immunitaire humain. Les cellules T « précoces » seront ensuite injectées pour suivre leur devenir, localisation anatomique, fonctionnalité et efficacité à détruire les cellules cibles d'intérêt. Les cellules T précoces auront été au préalable modifiées par thérapie génique pour exprimer le récepteur artificiel leur permettant de ne s'attaquer qu'aux cellules cibles.

Remplacer : Les cellules T génétiquement modifiées ont été caractérisées *in vitro*. Cependant, la réponse immunitaire est un phénomène biologique complexe faisant intervenir de multiples types cellulaires et une organisation unique ce qui rend impossible une étude complète dans des tests *in vitro* (interaction avec d'autres cellules, tissus etc.), c'est pour cette raison que le modèle expérimental chez la souris est indispensable et ne peut pas être remplacé avant d'envisager une application clinique. De plus, la souris humanisée pour le système immunitaire est un modèle permettant de travailler avec des cellules humaines directement applicables ensuite en essai clinique.

Raffiner : Le suivi individuel régulier de chaque souris permettra d'identifier l'apparition de signes évocateurs de mal-être ou de souffrance des animaux étudiés (prostration, perte de poids, perte de poils, modification de certains paramètres sanguins) qui entraînerait une fin d'expérimentation immédiate. Les souris seront anesthésiées pour les injections de cellules. Certains signes cliniques et paramètres sanguins spécifiques à la thérapie CAR-T seront suivis chaque semaine en plus des signes généraux évoqués précédemment. De plus, ce projet fait suite à une étude bibliographique afin de raffiner au maximum les expériences, nombre de cellules à injecter, cinétique d'observation et de prélèvement.

Réduire : le nombre d'animaux par groupe a été réduit au minimum sans toutefois compromettre l'analyse statistique des résultats. Nous utiliserons 112 souris.

17970 Les recherches sur le cerveau sont essentielles sur le plan fondamental, pour comprendre les processus cognitifs, comme la perception consciente, l'attention sélective, la mémoire de travail et la compréhension de modèles abstraits. Il s'agit de fonctions cognitives connues pour être affectées de manière sélective dans la schizophrénie, l'autisme et le TDAH (trouble de déficit de l'attention).

Les mécanismes neuraux qui sous-tendent les fonctions cognitives impliquent la dynamique des réseaux de neurones connectés à plusieurs régions du cerveau. Ils nécessitent des processus d'apprentissage complexes qui ont lieu pendant que les individus interagissent avec leur environnement, en particulier grâce aux informations visuelles et auditives. Ces processus d'interaction avec l'environnement sont présents chez tous animaux, à divers degrés. Les neurones sont organisés en réseaux et communiquent entre eux via des signaux d'inhibition ou d'activation, formant des microcircuits. Notre projet d'étude des fonctions cognitives du cortex de souris par technique bio-imagerie, vise à comprendre l'organisation de ces microcircuits neuronaux dans des régions cérébrales d'intérêt (cortex pré-frontal, aires sensorielles primaires), ainsi que les interactions dynamiques entre elles : inhibition et activation de chacun des neurones du micro réseau en réponse à une stimulation extérieure (auditive, visuelle). Seules des méthodes d'imagerie de pointe peuvent atteindre une résolution spatiale ($< 1\mu\text{m}$) et temporelle (msec) permettant d'analyser le fonctionnement d'un neurone unique. L'IRM n'a qu'une résolution de l'ordre de plusieurs μm et de la seconde. L'utilisation de la bio-imagerie multi photonique, qui nécessite la pose chirurgicale d'une fenêtre d'observation (implant d'imagerie), permet d'avoir un accès direct au cerveau en fonctionnement, via l'utilisation de virus fluorescents. Les virus utilisés sont de classe 1 (non pathogènes), implantés dans une zone corticale ils permettent de visualiser in vivo les neurones les ayant incorporés. Plusieurs types de virus et de fluorescence seront testés durant les sous-projets. Le modèle rongeur est particulièrement bien adapté à cette technologie (taille du cerveau, connaissances existantes, épaisseur du crâne ...).

Des rongeurs nés et élevés dans des établissements agréés à des fins scientifiques, seront utilisés. Les modèles in-vitro ne permettent pas de mimer le fonctionnement des réseaux neuronaux d'un organisme entier, et ne peuvent donc pas remplacer les modèles animaux. Des expériences préliminaires, des tests statistiques, ainsi que l'étude de la littérature ont permis de réduire le nombre des animaux au minimum nécessaire pour obtenir des résultats exploitables. Nous prévoyons de réaliser un total de 30 sous-projets, fois 30 animaux, 900 animaux au total, sur 5 ans. Les différentes conditions opératoires (séquences de stimulations visuelles ou auditives, point d'implantation du virus, structure corticale visée, techniques de visualisation de l'activité neuronale ...) ont été définies avec précisions pour chacun des sous-projets.

Des séquences de stimulations visuelles et auditives seront appliquées pour détecter et analyser le comportement du cerveau face à ces changements de l'environnement extérieur. L'implant d'imagerie doit donc être positionné sous l'objectif du microscope de façon stable, nécessitant une contention de l'animal vigile. Ces expériences pourront être répétées plusieurs fois sur chaque animal, réduisant le nombre d'animaux impliqués, ainsi que le stress grâce à une habituation poussée de l'animal au contexte expérimental, et une surveillance constante des animaux délimitées par des points d'arrêts précis.

Tous les animaux sont hébergés en petit groupe. Un enrichissement du milieu de vie est systématiquement ajouté dans chaque cage afin de diversifier les interactions de l'animal. Pour éviter toute douleur ou souffrance de l'animal, des protocoles analgésiques et anesthésiques sont mis en place après avis vétérinaire.

17971 L'expansion des hémisphères cérébraux (néocortex) est la clé de voute de l'évolution des fonctions cognitives chez les mammifères. De nombreuses pathologies peuvent affecter ce développement optimum. Parmi celles-ci, les microcéphalies affectent 2-3% de la population mondiale et découlent souvent de l'exposition de l'embryon à des conditions de grossesse défavorables. Il existe cependant des formes congénitales (MCPH) extrêmement rares mais qui représentent des outils de choix pour étudier les mécanismes moléculaires sous-jacents. Les patients MCPH sont porteurs de mutations dans l'un des 12 gènes (MCPH1-12) responsables de la maladie et présentent principalement une petite tête et un déficit intellectuel. Ces pathologies sont désormais diagnostiquées de plus en plus tôt, mais il n'existe à ce jour aucune approche thérapeutique. En utilisant les souris déficientes en neuropeptide VIP (peptide vasoactif intestinal) qui ont un cerveau de petite taille et peu de protéines MCPH1, nous avons l'occasion unique d'étudier les interactions étroites entre les facteurs environnementaux extrinsèques et la production maternelle de VIP

pendant la période cruciale du développement des fonctions corticales. Cette approche devrait permettre de déterminer de façon précise l'incidence respective de différents stress sur la formation du cerveau. Les résultats de cette étude devraient permettre de 1-améliorer notre compréhension des facteurs responsables de l'apparition de microcéphalie et des déficits intellectuels et ainsi 2-proposer des stratégies de protection. Ce projet utilisera un maximum de 2000 femelles et 5000 descendants de tout sexe sur 5 ans. Le nombre de souris a été calculé au plus juste selon la règle des 3Rs.

REDUCTION: Ainsi les animaux témoins seront utilisés dans plusieurs séries d'expériences pour en limiter le nombre (étude longitudinale). Le projet repose essentiellement sur l'utilisation de souris femelles dans des accouplements datés (constatés par la méthode indolore du bouchon vaginal) pour générer des embryons, des fœtus et de jeunes souriceaux et étudier la croissance de leur cerveau et leurs capacités intellectuelles. Par ailleurs l'ordre des expériences a été affiné et les cages de reproduction seront gérées avec soin pour ne collecter que les échantillons nécessaires à la constitution des groupes expérimentaux sans générer des reproductions inutiles.

REMPLACEMENT Enfin certains résultats *in vivo* (obtenus sur les stades embryonnaires précoces) seront confirmés à partir de culture de cellules souches neurales réalisées en routine au laboratoire afin de remplacer au maximum les expériences *in vivo* par des tests *in vitro*.

RAFFINEMENT : Les procédures invasives seront réalisées sous anesthésie et analgésie. La température corporelle des animaux sera maintenue grâce à un tapis chauffant thermostaté. L'état de santé des animaux sera évalué grâce à une grille de scoring et des points limites ont été établis conduisant à l'interruption des procédures limitant ainsi la souffrance animale.

17972 La latéralité est la prévalence d'un côté du corps sur l'autre, que ce soit pour percevoir et traiter des informations ou pour produire des comportements. Elle existe chez quasiment toutes les espèces animales étudiées jusqu'à maintenant, des invertébrés comme les abeilles aux vertébrés comme les humains. La latéralité peut s'exprimer à l'échelle individuelle (auquel cas chaque individu peut avoir une préférence pour le côté droit ou pour le côté gauche, sans que cette préférence soit nécessairement la même que celle de ses congénères) ou bien à l'échelle de la population (auquel cas la majorité des individus montrent une préférence pour le même côté). L'exemple le plus frappant de latéralité à l'échelle de la population est la latéralité manuelle chez les êtres humains : plus de 90% des personnes montrent une préférence pour la main droite. De nombreuses études se sont penchées sur les avantages que peuvent avoir les animaux à être latéralisés. Il a été démontré chez plusieurs espèces que plus les individus sont latéralisés plus ils sont performants dans des tâches nécessitant d'être attentif à deux choses à la fois. Pourtant, chez toutes les espèces latéralisées, une partie des individus ne l'est pas. Si de tels individus se maintiennent dans les populations c'est probablement que l'absence de latéralisation leur apporte certains avantages. Notre hypothèse est que ces individus seraient plus flexibles et donc plus rapides à s'adapter à des changements tels que par exemple une inversion de consigne lors d'un test d'apprentissage. Nous testerons cette hypothèse sur des poussins domestiques, espèce largement utilisée dans les études sur la latéralisation. Latéralité et socialité pouvant être liées, nous poserons aussi la question de la plasticité en contexte social afin de savoir si l'absence de latéralisation peut avantager ou au contraire défavoriser l'adaptation des individus dans ce contexte. Notre étude repose sur l'observation comportementale des animaux et n'implique donc aucune méthode invasive. Etant donné que nous nous intéressons au comportement, nous ne pouvons pas éviter l'utilisation d'animaux vivants (principe de remplacement). Nous utiliserons 100 poussins dont 80 seront répartis en deux lots de 40 poussins (un lot fortement latéralisé et un lot faiblement latéralisé). Les 20 poussins supplémentaires serviront à remplacer les poussins que nous serions amenés à retirer de l'expérience. Certains d'entre eux serviront également de stimulus pour les poussins expérimentaux. Le nombre de poussins dans chaque lot est le minimum requis pour obtenir une puissance statistique suffisante (principe de réduction). Un suivi journalier permettra de veiller au bon état de santé des animaux tout au long de l'expérimentation (principe de raffinement). Tout sera fait pour les maintenir en bonne santé (aménagement des cages, nourriture et eau à volonté,

température et éclairage adaptés). Ils seront maintenus en vie et proposés à l'adoption à la fin de l'expérience.

17973 D'origine infectieuse ou liées à la consommation excessive d'alcool ou de régime alimentaire riche en graisses, les maladies du foie deviennent souvent chroniques avec un risque de développement de cancer du foie grave et préoccupant en terme de santé publique. Afin d'améliorer la connaissance de ces maladies, notre équipe se consacre à la caractérisation des facteurs moléculaires et cellulaires impliqués dans le développement et la régulation de ces maladies du foie que l'on appelle hépatites. Des collaborateurs ont identifié l'importance d'un facteur de régulation de la réponse inflammatoire, l'IL-18 BP, dans différentes maladies inflammatoires et dans l'hépatite virale chez l'homme. Une équipe a généré des souris déficientes pour le gène codant ce facteur IL-18BP et notre projet collaboratif est soumettre ces souris à une hépatite en comparant des modèles différents impliquant des causes variées pour comprendre le rôle de ce facteur. Précisément, les animaux seront exposés à (1) une surcharge médicamenteuse (paracétamol), (2) un agent toxique chimique pour le foie (tétrachlorure de Carbone CCl₄), (3) des agents activateurs des cellules immunitaires. Les organes prélevés (foie, rate, rein et cerveau) seront analysés par différentes méthodes pour quantifier l'atteinte hépatique et l'avancée des processus de défense immunitaire du foie. Le nombre de souris engagées dans ces expériences est évalué au nombre de 252, nous avons pensé ces protocoles en suivant la règle des 3 R « Remplacer, Réduire, Raffiner » :

- Il n'existe aucun moyen de remplacer de telles études qui englobent l'ensemble de l'organisme dans sa réponse physiopathologique, seule l'expérimentation animale permet un suivi complet de la maladie depuis ses phases les plus précoces et permet d'étudier la réponse physiologique d'un individu déficient pour une molécule d'intérêt pour évaluer son rôle.

- Nous avons réduit le nombre de souris à celui requis pour obtenir une validation statistique des résultats ; et nous avons envisagé plusieurs mesures sur les échantillons prélevés au niveau de l'organe touché par la maladie pour ainsi récolter un maximum d'informations qui viendront compléter celles déjà obtenues, nous avons aussi envisagé de prélever 3 autres organes permettant de suivre le fonctionnement général du système immunitaire.

- Nous avons raffiné le protocole en prenant soin de prévoir en amont la répartition des groupes de souris pour les garder en communauté, un facteur important pour garantir leur bien-être d'animaux sociaux.

Ce travail permettra de préciser le rôle du facteur IL-18 BP dans la mise en place de la maladie « hépatite » chez la souris, en prenant en compte les mécanismes variés de son développement en fonction de son étiologie. A terme, les données de ce travail pourraient permettre de développer de nouvelles stratégies de traitement des maladies du foie.

17974 La maladie de Crohn est une maladie inflammatoire dont les principales localisations sont l'intestin grêle, le côlon, l'anus et le périnée. L'incidence de la maladie est en augmentation dans les pays industrialisés depuis les années 1950. 1 patient sur 2 présentera une lésion anopérinéale (LAP) après 20 ans d'évolution de sa maladie.

On distingue les LAP primaires (ulcérations cutanées, fissures cutanées) des LAP secondaires (fistules simples ou complexes correspondant à des tunnels qui se forment naturellement entre le rectum et le périnée afin d'évacuer les abcès). Les LAP secondaires sont plus fréquentes et graves, avec à long terme un risque de destruction du sphincter anal, d'incontinence, de stomie définitive (anus artificiel) et de cancer du canal anal. Le traitement actuel est médio- chirurgical associant le traitement de fond de la maladie de Crohn et un traitement chirurgical local de la fistule afin d'obtenir sa fermeture. La récurrence est très fréquente (>50%) aboutissant à une infection du trajet et une destruction du sphincter anal nécessitant une stomie définitive.

La recherche actuelle se concentre sur le développement de traitements locaux des LAP utilisant des médicaments anti-inflammatoires et des cellules souches régénératives (dans le but de fermer le trajet fistuleux et réduire son inflammation). Ces traitements et leur optimisation, bien qu'encourageants, sont limités par le défaut de modèle animal suffisamment proche de la pathologie

pour tester leur efficacité avant toute utilisation chez l'homme et par la difficulté de contrôler parfaitement le devenir des cellules souches après leur administration (risque de dissémination). Aussi de nouveaux traitements plus convaincants et sûres assurant la cicatrisation/fermeture du trajet fistuleux sont attendus.

L'objectif principal de notre travail est de tester différents traitements innovants dans le but d'obtenir une cicatrisation complète et durable d'une fistule sur un nouveau modèle expérimental de LAP chez le rat récemment valide dans la littérature. Parmi ces traitements, l'utilisation locale de 2 colles nano particulières (appelées CNP dont l'innocuité chez le rat a été démontrée) de propriétés physico-chimiques différentes (CNP1 et CNP2) ou l'utilisation de radiofréquences.

Ce projet se déroulera sur une période de cinq années et nécessitera un effectif de 110 rats âgés de 7-8 semaines provenant d'un fournisseur agréé.

Les analyses statistiques nous permettront de définir le retentissement clinique des traitements et de sélectionner le meilleur d'entre eux pour une application future chez l'homme.

Notre approche expérimentale est en adéquation avec les 3R :

- Remplacer : il est impossible d'évaluer l'effet de traitements novateurs sur les LAP sur un modèle in vitro ou in silico. Aucun modèle cellulaire ne permet de reproduire la complexité d'une LAP. Seul le modèle animal permet de conduire ce projet. Le rat est le plus petit animal adapté à ce travail notamment pour l'observation des fistules et l'évaluation du traitement par imagerie IRM, avec une littérature validant ce choix.

- Réduire : L'effectif proposé tient compte du calcul statistique prévisionnel permettant d'obtenir le nombre d'animaux nécessaire et suffisant pour démontrer une différence significative. Pour éviter un groupe contrôle supplémentaire, chaque rat sera porteur de 2 trajets fistuleux comme fréquemment observé chez les patients : un trajet recevra le traitement étudié et l'autre une injection de sérum physiologique.

- Raffiner : Les rats seront surveillés quotidiennement pendant toute la durée du protocole par du personnel compétent. Les mesures nécessaires à la prise en charge de la douleur seront adaptées en fonction de l'état des animaux (analgésie et suivi des signes de mieux/mal être avant et après le traitement). Les effets du traitement seront contrôlés par une surveillance selon un score standardisé. Ce score (prenant en compte la variation du poids de l'animal, son apparence externe, les signes cliniques mesurables et le changement de comportement) correspond à une grille d'évaluation clinique permettant de prendre des mesures progressives (points limites) en fonction de l'élévation du score (augmentation de la fréquence des observations, administration de solution saline pour lutter contre la déshydratation, administration d'antalgiques pouvant être renouvelé toutes les 12h). L'environnement des animaux sera enrichi afin de leur permettre d'avoir un comportement le plus naturel possible (cotons, bois, cycle jour/nuit).

17975 Une des manifestations possibles du changement climatique est le raccourcissement du printemps, avec un réchauffement plus rapide amenant à un été plus précoce. Or, la température contrôle la distribution temporelle des événements majeurs de la vie de nombreux organismes (éclosion, débourrement des bourgeons, reproduction) se déclenchent à une température donnée, ou plutôt une gamme de température si chaque individu a une sensibilité légèrement différente des autres. Donc si le printemps s'accélère, la gamme de température sera couverte en moins de temps, conduisant possiblement à la synchronie des individus au sein d'une population. Ce projet vise à étudier comment la vitesse de réchauffement printanier influence la synchronie de reproduction et la structure du système d'appariement chez la lamproie de Planer, une espèce se reproduisant au début du printemps. En soumettant des lots de lamproies à un réchauffement de l'eau soit rapide soit lent (relativement aux gammes observées en milieu naturel), on s'attend à ce que les individus des lots soumis à un réchauffement rapide aient une reproduction plus synchronisée, par individu (durée d'activité plus courte) et entre individus (activité simultanée des individus). Dans ce cas, on peut supposer qu'il soit difficile pour certains individus de monopoliser l'accès aux partenaires sexuels, donc que le succès d'appariement soit réparti plus équitablement entre individus. Le protocole consiste à capturer des lamproies en rivière à la fin de l'hiver, des les maintenir dans des

aquariums dont la température augmentera soit lentement (0.02°C/j) soit rapidement (0.06°C/j), de contrôler régulièrement le développement de caractères sexuels secondaires et d'observer les accouplements entre mâles et femelles individuellement marqués. Ces vitesses de hausse de température sont dans la gamme de ce qui a été observé dans une rivière abritant la population de lamproie de Planer au cours des 35 dernières années. A l'issue de la reproduction, une partie des oeufs seront incubés pour estimer ultérieurement le succès reproducteur relatif de chaque géniteur par analyses génétiques.

L'absence d'élevage de lamproie nous pousse à capturer des individus en milieu naturel, et l'étude portant sur le comportement de groupes d'individus, les alternatives à l'expérimentation animale (culture cellulaire, modèle numérique) ne sont pas possibles. Pour atteindre une puissance statistique satisfaisante, sept groupes de quatre mâles et quatre femelles seront constitués pour chacun des deux niveaux de traitement, amenant à 112 individus. Chaque groupe de huit individus sera maintenu et observé dans un aquarium de 40 litres alimenté en eau de rivière thermorégulée et aérée (bulleur) et aménagé avec du substrat de reproduction (gravier) et des abris (tuiles). Le marquage permettant la reconnaissance individuelle consistera en l'injection sous-cutanée d'un élastomère visible, sous anesthésie (30 mg/l de benzocaïne, 3 minutes). Les caractères sexuels secondaires (papille urogénitale, nageoires) sont facilement visibles et leur examen visuel tous les deux jours ne nécessitera pas de manipulation. Dans la nature comme en captivité, les lamproies meurent quelques jours après leur dernier accouplement. Cette mort naturelle permettra d'utiliser les individus morts pour d'autres expériences liées au contenu énergétique et à la contamination des tissus par des polluants. Enfin, afin de limiter le nombre d'individus concernés par les expériences dans notre groupe de recherche, un des deux niveaux de traitement servira de témoin pour une autre expérience (décrite dans une autre saisine) visant à tester l'effet de polluants sur le comportement reproducteur.

17976 L'inflammation est une réaction de défense de l'organisme qui cherche à neutraliser et éliminer un stimulus d'agression extérieure puis à restaurer l'intégrité du tissu atteint. Ce processus implique la participation des cellules du système immunitaire. Dans les maladies neuro-inflammatoires, on suspecte qu'une inflammation périphérique d'un organe « barrière » (comme le poumon), par le biais d'une agression environnementale, puisse impacter l'histoire de la maladie neurologique elle-même. Le poumon est un organe particulièrement exposé à l'environnement. Les études chez l'homme permettent d'affirmer que l'exposition au tabac, aux solvants organiques ou que les infections des voies aériennes sont associées à une aggravation de maladies neuro-inflammatoires ou neuro-dégénératives telles que la sclérose en plaques. Cependant, cette association est mal comprise.

L'imagerie moléculaire est un outil de dépistage très spécifique de l'inflammation. En effet, son intérêt pour prédire et imager les poussées de sclérose en plaques sur des modèles expérimentaux a déjà été démontré. Cet outil permettrait de prouver qu'il existe une association entre une inflammation pulmonaire (quel que soit la pathologie inflammatoire humaine) et le déclenchement de la maladie neuro-inflammatoire et, de mieux prédire quand la maladie neuro-inflammatoire risque de se manifester afin de mieux guider la thérapeutique, par exemple à la phase aigüe ou lorsque celle-ci est pauci-symptomatique.

De précédents travaux au sein du laboratoire ont montré que cette technique peut être appliquée sur un modèle d'inflammation pulmonaire induite par un agent pathogène environnemental. Il est cependant nécessaire de confirmer la spécificité de ces résultats à l'aide d'un second modèle qui existe déjà dans la littérature. Il s'agit du modèle d'hypertension artérielle pulmonaire (htap) induite par la monocrotaline. L'hypertension artérielle pulmonaire est une maladie de l'artère pulmonaire entraînant une inflammation importante. Son dépistage chez l'homme est difficile car il nécessite l'introduction d'un capteur de pression qu'il faut positionner dans l'artère du poumon. Cette maladie peut être induite chez le rat par l'administration d'un agent qui s'appelle la monocrotaline.

Le but de cette étude est donc de voir si l'imagerie moléculaire permettrait de détecter l'inflammation pulmonaire suite à l'induction d'une htap par la monocrotaline chez les rats. Ceci permettrait ainsi

de confirmer nos précédents résultats obtenus sur l'inflammation pulmonaire et de prouver la validité de l'imagerie moléculaire dans les inflammations pulmonaires.

Cette étude basée sur l'expérimentation animale prend en compte le bien-être animal et les pratiques éthiques, et répond à la règle des 3 R (remplacer, réduire, raffiner) comme décrit ci-dessous. Notre projet ne nous permet pas d'utiliser d'autres moyens que l'expérimentation animale. Les principes éthiques et les standards de raffinement sont utilisés de la naissance à la mort de l'animal. Les animaux sont hébergés dans des cages standards aux normes européennes. Le bien-être des animaux est contrôlé 7j/7 par du personnel qualifié. Cette surveillance quotidienne et hebdomadaire permet de détecter tous signes cliniques de souffrance (douleur, perte de poids ...) et d'agir rapidement pour mettre fin à cette détresse. L'expérience de l'équipe de recherche sur l'inflammation permet d'appliquer au quotidien le raffinement des conditions de manipulation de ces animaux. De plus, le nombre d'animaux a été réduit en prenant en compte les tests de puissance statistiques réalisés. Enfin, l'utilisation de méthodes d'imagerie in vivo non invasives telle que l'IRM permet de réduire et de raffiner l'utilisation des animaux.

En prenant en compte ces recommandations, un total de 50 rats sera utilisé lors de ce projet.

17977 Le cancer du poumon ou cancer bronchique se développe le plus souvent à partir des cellules des bronches. On distingue deux grands types de cancers bronchiques : les cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC) et les cancers bronchiques à petites cellules (CBPC). Ils représentent respectivement environ 80 % et 20 % de ces cancers.

Actuellement, trois types de traitements sont utilisés dans la prise en charge des cancers bronchiques : la chirurgie, la radiothérapie et des traitements médicaux (chimiothérapie et thérapies ciblées). Pour les cancers bronchiques la chimiothérapie associée ou non à une radiothérapie représente le traitement de choix.

Cependant, le cancer du poumon est aujourd'hui la première cause de décès par cancer en France et dans le monde (survie globale de 14 % à 5 ans et 9 % à 10 ans). Aussi, la recherche s'oriente vers de nouvelles stratégies thérapeutiques.

L'évaluation de l'effet de nouvelles thérapeutiques nécessite le développement de procédures in vitro. Néanmoins, les cellules tumorales se comportent différemment in vitro et in vivo en termes de croissance, de dissémination, de résistance aux traitements, etc. Aussi, l'évaluation du bénéfice de nouvelles thérapeutiques requière le développement de modèles précliniques intégrant l'ensemble de la biologie d'un organisme vivant.

Dans ce contexte nous avons fait un premier projet (validé précédemment par le comité d'éthique) qui vise à mettre en place différents modèles tumoraux pertinents chez la souris et notamment de cancers du poumon.

Ce projet fait donc suite à ces travaux et vise à évaluer l'efficacité de nouveaux traitements thérapeutiques (protocole de radiothérapie innovant, chimiothérapie, etc. .) dans les modèles de cancer du poumon préalablement établis et caractérisés, qu'ils soient à petites cellules ou non et implanté en sous cutanée ou en orthotopique (dans le poumon).

Ces modèles porteront sur l'implantation de cellules humaines dans des souris immunodéficientes (Nude, NOD-SCID, NSG) (xénogreffe).

Le suivi de la croissance tumorale sera réalisé par mesures physiques directes et par des méthodes non invasives (eg. Bioluminescence, IRM).

Ce projet nécessitera l'utilisation de 1000 animaux.

Au regard de la règle des 3R

Remplacer : L'objectif de ce projet est d'évaluer in vivo l'efficacité de nouvelles stratégies thérapeutiques qui auront été préalablement validées in vitro.

Réduire : De nombreux laboratoires internationaux ont déjà développé des modèles tumoraux. Aussi, nous nous baserons sur leurs différents travaux afin de bénéficier de leur expérience. Par ailleurs, notre plus-value porte sur l'utilisation de cellules tumorales dites « primaires » (très proche de la maladie humaine) et également de modèle orthotopiques peu répandus.

Enfin, les lots utilisés seront de 7 souris, ce qui est suffisant pour avoir une bonne idée de d'un effet thérapeutique intéressant (tests statistiques) et qui est très souvent utilisé dans diverses publications scientifiques.

Raffiner : Pour limiter toute souffrance animale inutile, les cellules tumorales utilisées (testées in vitro) seront dans un premier temps implantées en sc afin de vérifier d'un premier effet thérapeutique du traitement testé. Cela préservera des injections orthotopiques bien évidemment invasives.

Les techniques de suivi non-invasif (Bioluminescence, IRM) et le suivi longitudinal qui en découle permettront également de faire un suivi cinétique non douloureux, de réduire le nombre d'animaux utilisé, et est tout à fait pertinent quant à la mise en place et à la caractérisation des modèles tumoraux.

17978 L'exposition aux rayonnements ionisants à la suite d'un accident d'irradiation (accident dans une centrale nucléaire, manipulation d'une source radioactive...) ou d'un acte de malveillance peut engendrer des conséquences graves sur la santé des personnes impactées. En effet, l'irradiation d'une large surface du corps, à des doses d'irradiation moyennes à fortes, induit des lésions irréversibles regroupées sous le nom de syndrome aigu d'irradiation (SAI). Ce syndrome inclut des atteintes du compartiment sanguin, du système digestif, du système neuro-vasculaire et de la peau. A l'heure actuelle, les traitements ciblent préférentiellement le compartiment sanguin, et la prise en charge du syndrome gastro-intestinal (SGI) ne reste que symptomatique, alors que les diarrhées associées à ce syndrome peuvent engager le pronostic vital.

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

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

Pour l'ensemble du projet, le nombre estimé d'animaux est de 550 souris. Le nombre de souris choisi pour ce protocole est nécessaire et suffisant pour exploiter d'un point de vue statistique les résultats obtenus.

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

17979 L'alimentation est essentielle à la survie mais est aussi source de plaisir. La libération de dopamine (DA) au niveau du circuit neuronal dit « de la récompense » est un mécanisme clé dans le plaisir pour la nourriture. Ce circuit est aussi la cible par laquelle les drogues exercent leur propriété addictive. Si le cerveau utilise essentiellement des sucres pour subvenir à ses besoins énergétiques on trouve à la surface des neurones dopaminergiques des enzymes capables d'hydrolyser une forme de lipide apportée par l'alimentation : les triglycérides (TG). De plus, l'obésité qui se caractérise souvent par une prise dérégulée d'aliments est associée à la fois à une perturbation des signaux dopaminergiques et à une forte concentration en TG dans le sang ce qui suggèrent que les TG pourraient directement induire cette perturbation en agissant sur les neurones à DA.

Notre projet vise 1)-à caractériser les adaptations moléculaires au sein du système de la récompense lors d'une hypertriglycéridémie, 2)-explorer le rôle d'un facteur qui est, chez l'homme comme chez l'animal, impliqué dans ce processus 3)- identifier les acteurs moléculaires impliqués dans ces mécanismes.

Les modifications comportementales étudiées, liées à des modifications cérébrales complexes, ne peuvent être étudiées que dans un circuit intégré chez l'animal. La souris possède des structures cérébrales impliquées dans les phénomènes de récompense, proches de celles de l'homme et de nombreuses lignées murines génétiquement modifiées sont disponibles permettant de cibler spécifiquement une population neuronale d'intérêt.

Ce projet met en jeu des procédures chirurgicales permettant des injections vasculaires et intracérébrales de substances lipidiques et de marqueurs de localisation cellulaire, l'administration intrapéritonéale de substance à action psychotrope, et des tests comportementaux permettant une évaluation des fonctions émotionnelles des souris. Les prélèvements de tissu cible (cerveau) pour analyses moléculaires et histochimiques seront effectués en post mortem.

La règle des trois R sera respectée, le nombre d'animaux sera réduit au minimum en optimisant au maximum les groupes expérimentaux (réutilisation des animaux dans différentes procédures n'entraînant pas de douleur ou de stress) et en raffinant les procédures pour réduire au minimum la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux. Nous effectuerons lorsque nécessaire l'administration d'analgésique lors des procédures, ainsi que d'antalgique en post opératoire, si besoin. Les gestes chirurgicaux seront effectués sous anesthésie générale et analgésie pré, per et postopératoire. Les cages sont agrémentées d'un nid végétal et d'objets pour le confort de l'animal, et quelques croquettes seront mises à même le sol pour éviter les douleurs de tension au niveau de la suture les premiers jours après l'opération.

Un total de 1940 souris génétiquement modifiées sera utilisé pendant les 5 ans d'étude du projet. Le bien-être animal est pour nous primordial vis-à-vis de l'animal mais aussi de nos expérimentations, les résultats de comportement ne peuvent être valable que si l'animal est bien portant.

Des points limites spécifique d'évaluation de la douleur à chaque procédure sera mise en place. L'atteinte d'un de ces points limites entrainera la mise à mort anticipée de l'animal concerné. Enfin, cette étude ne peut être remplacée par d'autre moyen, comme la culture cellulaire, car nous regardons le comportement et le métabolisme de l'animal.

L'ambition de ce projet est de développer de nouvelles stratégies pour prévenir ou corriger les troubles alimentaires associés aux nourritures riches et à l'obésité.

17980 Le foie est un organe majeur dans la régulation du métabolisme. Chez l'Homme comme chez la souris, il stocke des nutriments sous diverses formes et joue un rôle de tampon dans la régulation de l'homéostasie énergétique. Les individus obèses ont tendance à développer un diabète de type II associé à une résistance à l'insuline. Le diabète et ses complications posent un problème majeur de santé publique. Afin de mieux comprendre les mécanismes liés au développement d'un diabète nous nous sommes intéressés à étudier les fonctions de la signalisation de l'insuline dans le foie chez des souris mâles et femelles. Pour cela, nous utiliserons des souris mutantes qui présentent une absence de la signalisation de l'insuline dans le foie suite à la délétion d'un gène en comparaison d'animaux contrôles ne présentant aucune mutation. Le phénotype des souris mutantes se traduit par une augmentation de glucose et d'insuline dans le sang, sans atteintes sévères vis-à-vis du comportement et de la morphologie de l'animal. Afin d'étudier les effets sexes observés en clinique et préclinique sur la voie de l'insuline, des injections de glucose et d'insuline permettront de déterminer finement l'origine de ces différences. La réponse au jeûne sera également étudiée en administrant un médicament pharmacologique permettant de mimer sa physiologie. Il a été mis en évidence que le rythme circadien (horloge biologique de l'organisme) est primordial dans le maintien de l'équilibre du métabolisme énergétique, puisqu'un dérèglement chronique de cette horloge au niveau du foie peut entraîner le développement d'un diabète de type 2. Afin de déterminer l'importance de la voie de l'insuline dans ce processus, nous étudierons chez

les souris mâles et femelles le rythme circadien hépatique en jouant sur les paramètres de prise alimentaire (régime sain ou riche en graisse), période à laquelle l'insuline est sécrétée dans l'organisme. L'évaluation de la tolérance au glucose (critère d'un désordre métabolique) sera évaluée par l'administration de glucose chez ces souris. Les animaux feront l'objet de procédures de degré léger ou modéré uniquement et cumuleront deux procédures au maximum au cours de la période d'étude. L'utilisation de l'animal entier est incontournable car le projet porte sur le dialogue entre plusieurs organes dans la régulation des voies métaboliques. De plus, la souris est un modèle de choix car adapté aux mécanismes que nous étudions et qui nous permet de déléter une protéine d'intérêt dans un organe en particulier. Ainsi nous ne pouvons pas utiliser de méthodes alternatives de remplacement pour cette étude.

Nous utiliserons uniquement des souris à l'âge adultes. Nous prévoyons d'utiliser, à raison de 12 animaux par groupe et par sexe, et au vu du nombre d'études à mener, 1776 animaux sur les 5 années du projet. Basé sur les données de la littérature et des expériences antérieures du laboratoire, ce nombre d'animaux est le nombre minimum nécessaire mais indispensable afin d'obtenir des résultats exploitables.

Les souris sont élevées au sein de l'animalerie et nous veillerons à leur bien-être que ce soit avant et pendant les études expérimentales en leur assurant les meilleures conditions d'hébergement, dans un environnement contrôlé (luminosité, température, enrichissements (maisonnette, feuilles de celluloses)). Une surveillance quotidienne par le personnel soignant et/ou l'expérimentateur sera effectué tout au long de la vie des animaux. En situation de stress et de douleur, des critères d'arrêt (perte de poids, blessure) sont établis. Si un point limite est atteint (perte de poids, dépression, etc. .), l'animal sera retiré de l'étude pour être soigné ou euthanasié si le retour à la normale n'est pas possible.

17981 *Dermanyssus gallinae* (Acari: Mesostigmata), le pou rouge des poules, est un acarien qui se nourrit du sang des oiseaux et infeste la majorité des élevage de poules en Europe et dans d'autres zones du monde (Brésil, Chine, Australie ...). Responsable de dégâts directs (stress entraînant une baisse de rendement, déclin des œufs tachés par les acariens) et indirects (transmission de salmonelles, allergies chez le personnel), il doit être combattu, mais s'avère largement récalcitrant aux moyens de lutte conventionnels. En effet, comme il ne vit pas sur l'hôte, mais passe l'essentiel de sa vie caché dans des interstices divers (perchoirs, pondoirs...) et en particulier sous les fientes de poule séchées, son contrôle par l'application de produits pulvérisés est généralement peu efficace. Non seulement traiter directement les animaux n'est pas approprié, mais encore les traitements classiques par pulvérisation dans le bâtiment ne touchent qu'une infime partie de la population et sont souvent d'une efficacité limitée.

Face à l'expansion actuelle de l'acarien et dans un objectif de réduction des traitements synthétiques (acaricides), le développement de moyens de lutte alternatifs est un enjeu majeur. C'est dans ce contexte que s'inscrit notre projet : il vise à développer la lutte contre l'acarien par manipulation des émissions chimiques provenant de la poule et/ou de ses fientes. Partant du principe que rendre la poule inappétante pour l'acarien (et/ou les fientes sèches inhospitalières) contribuerait fortement à limiter les populations du parasite, nous collaborons avec une société qui développe des additifs alimentaires à base de composés d'origine végétale. Après ingestion par la poule de l'un de ces additifs, nos travaux ont montré que des molécules volatiles contenues dans l'additif étaient émises directement par le corps de la poule et/ou par ses fientes et qu'au moins certaines d'entre elles sont répulsives vis-à-vis du pou rouge. Nous cherchons maintenant à affiner notre compréhension du mode d'action de cet additif anti-pou rouge en caractérisant les gradients d'odeur à proximité de la poule et leur effet sur le comportement de l'acarien. Afin d'évaluer avec robustesse l'effet des changements induits chez la poule sur le comportement de l'acarien et leur répercussion sur la dynamique démographique de celui-ci, nous envisageons d'impliquer au total 210 poules dans les expérimentations.

En ce qui concerne la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner), nous ne pouvons pas remplacer l'animal cible (la poule), car nous nous trouvons face à des processus biologiques et biochimiques dont nous ne maîtrisons pas le détail et que nous ne pouvons donc pas mimer. Le nombre poules

à tester est fixé à 210, car c'est le minimum pour obtenir des données de comportement et de dynamique des populations statistiquement robustes (nécessité de prendre en compte les variations interindividuelles des odeurs émises par la poule et d'évaluer les variations dans l'accroissement des populations d'acarien en présence de poules traitées et non traitées pour être à même de détecter des différences significatives). Nous raffinons les expérimentations en offrant aux poules la possibilité d'exprimer leur comportement naturel (grattage, picorage et perchage pour tous les individus, ponte pour les adultes). En outre, aucune manipulation douloureuse n'est pratiquée durant le projet.

17982 Les vaches laitières au pâturage peuvent recevoir des compléments alimentaires pour de multiples raisons, et notamment lorsque la croissance de l'herbe dans les prairies sur l'ensemble de la ferme n'est pas suffisante pour nourrir tout le troupeau de vaches dans les jours ou les semaines à venir. C'est également le cas lorsque la surface en prairies est trop faible. Il est alors nécessaire d'apporter des compléments alimentaires aux vaches, et notamment sous la forme de fourrages conservés (foin, ensilage), qui viennent combler la capacité d'ingestion des vaches, donc éviter leur faim et assurer leur bien-être et leur santé. Les compléments peuvent aussi être des aliments concentrés (céréales, co-produits) qui ont aussi pour intérêt de rééquilibrer la ration si nécessaire (énergie/protéines/minéraux) et d'accroître la densité énergétique de la ration. Si de nombreuses études ont déjà été réalisées concernant les réponses des vaches à la quantité ou à la nature des concentrés apportés, les effets des apports de fourrages, et en particulier d'ensilage de maïs sont relativement peu connus. Ces associations de fourrages ont aussi des impacts sur la digestion dans le rumen et donc la production de méthane, effets qui sont peu décrits chez la vache laitière au pâturage. L'objectif de ce projet de recherches est de déterminer les effets de différentes stratégies de complémentation en ensilage des vaches laitières au pâturage, en modifiant les doses apportées ou les moments d'apport, sur l'ingestion d'herbe, la production et la composition du lait, le comportement alimentaire et la production de méthane.

Le projet nécessite 48 vaches (2 essais avec 24 vaches par essai). La règle des 3R a été bien prise en compte. Remplacer : cette étude ne peut être réalisée que sur des vaches adultes en production, pour mesurer l'ensemble de leurs réponses, notamment pour l'ingestion, la production de lait et de méthane. Réduire : le nombre de vaches par essai est choisi pour assurer la puissance statistique nécessaire à la mise en évidence des effets des régimes alimentaires et un comportement naturel des vaches au pâturage. Raffiner : une attention particulière sera portée sur le bien-être des animaux (contrôle des boîtes, de l'état de santé général), et toute indication de mal-être durable des animaux conduira à les sortir de l'expérimentation, en accord avec le vétérinaire.

17983 Récemment, il a été montré qu'une voie de communication entre la mère et le fœtus durant la grossesse consiste en la sécrétion de vésicules extracellulaires (EV), en particulier d'exosomes. Ceux-ci contiennent divers composants cellulaires et notamment des microARN (dont certains dérégulés lors de pathologies de la grossesse). Notre équipe s'intéresse au développement cérébral fœtal et au rôle que pourrait y jouer les EV placentaires. Ainsi, nous cherchons à savoir si les EV placentaires pourraient se retrouver dans le cerveau fœtal durant la grossesse.

A la différence des modèles cellulaires et tissulaires, le recours à un modèle animal permettra de tester in vivo le parcours des EV et de mettre en évidence leur passage à travers la barrière hémato-encéphalique, et s'ils sont internalisés par des cellules du cerveau. Le recours à un modèle animal est donc nécessaire, car il n'existe pas à notre connaissance de modèle permettant d'étudier le passage de la barrière hématoencéphalique et l'internalisation des EV au plus proche du in vivo, notamment chez la souris nouveau-né.

Notre projet consistera donc à injecter des EV, produits in vitro à partir de cellules placentaires, à des souriceaux nouveaux-nés. Nous avons fait le choix de travailler avec des nouveaux-nés car la barrière hémato-encéphalique (quasiment inexistante à ce stade) sera très similaire à celle d'un fœtus, mais nous ne nous heurterons pas au passage du placenta, ce qui aurait été un paramètre supplémentaire si nous avions choisi de travailler sur des femelles gestantes.

Il est prévu d'utiliser un maximum de 288 souris nouveaux-nés sur une durée de 3 ans.

La règle des 3R sera appliquée pour ce projet :

- - Remplacement : le recours à un modèle animal intervient après des études in vitro sur des modèles cellulaires et tissulaires qui ont montré qu'il existe une internalisation des exosomes placentaires par les cellules souches neurales (NSC). Le principe de remplacement n'est pas applicable à ce projet car il n'existe pas de modèle capable de reproduire la complexité des transferts lors de la grossesse entre mère et fœtus, notamment concernant la barrière hématoencéphalique fœtale (ou néonatale).
- - Réduction : Les groupes seront planifiés afin de diminuer au maximum le nombre d'animaux tout en disposant de groupes statistiquement analysables. Des études préalables ont montré que des groupes de 8 animaux étaient nécessaires par condition pour atteindre la significativité statistique.
- - Raffinement : Les procédures expérimentales seront suivies en termes de bien-être animal. Les animaux seront suivis quotidiennement. Concernant le nombre d'animaux, les femelles gestantes seront 4 par cage. Une semaine avant la mise bas elles seront séparées à une par cage. Elles resteront avec leur portée durant le temps de l'expérience cad 48h maximum, avant sacrifice de la portée. Un animal sera euthanasié s'il présente un des signes limites d'arrêt de la procédure définis avec le comité local de suivi du bien-être animal afin de limiter la douleur et la souffrance de l'animal (perte de poids > 20% ou activité extrême anormale).

17984 1. Objectif du projet

TLR3 est un récepteur de l'immunité innée, exprimé par des cellules immunitaires et épithéliales. Dans les cellules cancéreuses qui expriment toujours le récepteur (cancer du sein, poumon, . . .), l'activation du récepteur entraîne à la fois une inflammation mais aussi la mort de ces cellules cancéreuses et un ralentissement de la croissance tumorale.

La possibilité de ciblage thérapeutique de TLR3 dans les cancers a été confirmée par une étude rétrospective démontrant que seules les patientes dont le cancer du sein exprimait TLR3 avaient répondu favorablement à un traitement avec un ligand de TLR3.

Malgré leur activité adjuvante en vaccination, aucune molécule cible de TLR3 n'a à ce jour obtenu l'autorisation de mise sur le marché, en raison d'effets toxiques ou de manque d'efficacité, et d'homogénéité structurelle.

Récemment, un ligand de TLR3, parfaitement défini structurellement et donc reproductible a été mis au point. La preuve de concept in vitro de l'effet pro-apoptotique de cette molécule sur des cellules tumorales a été apporté in vitro.

De façon très intéressante, les cellules traitées par le ligand de TLR3 présentent des marqueurs permettant de prédire une activation du système immunitaire. Ceci est une observation très importante aux vues des récentes avancées en immunothérapie, et permettrait d'envisager un traitement combinant le ligand de Toll3 avec les inhibiteurs des points de contrôle de l'immunité.

Le but de ce projet est de prouver l'efficacité de ce ligand dans des modèles animaux.

2. Conformité aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement.

La règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer) sera respectée; Réduction du nombre d'animaux sans mettre en péril une interprétation statistique des résultats. Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux permettra d'éviter la souffrance des animaux. Raffinement : Lors de la réalisation des protocoles, le maximum d'informations sera récolté afin de restreindre l'utilisation de l'animal. Seul un modèle in vivo nous permettra d'étudier l'effet de cette molécule sur la croissance de cellules tumorales.

3. Nombre total d'animaux inclus dans le projet

Le nombre de souris total pour les 3 procédures est : 600

17985 Mots clés : modèles de cancer, sensibilité au traitement, nouveaux traitements

Buts du projet : Un nombre croissant d'observations réalisées chez les patients démontrent que le système immunitaire joue un rôle important dans le développement des cancers. De nouveaux traitements visant à moduler le système immunitaire ont permis une avancée majeure dans la prise en charge des patients. Ce projet vise à étudier de nouvelles molécules pouvant avoir une activité anticancéreuse grâce au système immunitaire. L'utilisation de souris immunocompétentes, c'est-à-dire dont le système immunitaire est intact, nous permettra de déterminer l'efficacité de ces nouvelles thérapeutiques ainsi que le rôle du système immunitaire dans l'effet anti-tumoral. Ce rôle étant particulièrement important dans le cas de traitements immuno-modulateurs. Pour démontrer l'efficacité de ces traitements, nous implanterons des tumeurs en sous cutanée chez les souris. Cette implantation s'effectuera sous anesthésie, une incision de la peau au niveau du flanc droit de la souris nous permettra de décoller la peau du péritoine afin d'insérer le morceau de tumeur, nous refermerons ensuite par un point simple de chirurgie la plaie.

Retombées attendues : Cette étude permettra de mettre au point de nouveaux traitements impliquant le système immunitaire.

Type d'espèces et nombres d'animaux : cette étude sera réalisée sur souris immunocompétentes avec un effectif total prévu de 4692 souris

Prise en compte des 3 R : a) Remplacement : cette étude cherche à étudier la croissance tumorale pour ensuite déterminer l'effet du système immunitaire sur la tumeur et doit donc être réalisée sur un organisme entier nécessitant ainsi l'utilisation du modèle animal ; b) Réduction : la mise au point du modèle sera faite sur le nombre minimal de souris nécessaire et la confirmation des résultats sera réalisée sur un nombre minimal d'animaux permettant de conclure de façon fiable statistiquement; c) Raffinement : Afin de respecter le bien-être animal, avant la mise en place du protocole les souris seront acclimatées aux expérimentateurs du projet afin de limiter leur stress. Les animaux seront observés 3 fois par semaine durant la durée de l'expérience afin de pouvoir réduire, supprimer ou soulager leur douleur ou leur détresse et ainsi améliorer leur bien-être; toutes les précautions nécessaires seront prises pour détecter et minimiser la souffrance des animaux dans ce cadre, l'implantation tumorale sera effectuée sous anesthésie et un analgésique sera également utilisé dans les procédures de chirurgie afin d'enrayer la douleur chez l'animal.

17986 Les pays développés connaissent depuis plusieurs années une augmentation de la prévalence des maladies neurologiques comme par exemple les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson). Ces maladies ont en commun notamment des performances cognitives et de mémoires déficitaires. Les causes de ces déficits ont impliqué majoritairement un dysfonctionnement neuronal. Cependant des données récentes de la littérature suggèrent que les stades précoces de ces maladies sont associés à une activation des systèmes inflammatoires impliquant l'activation de cellules non neuronales, qu'on appelle les cellules gliales et qui sont nécessaires à la survie des neurones.

Le but de ce projet est de mieux comprendre comment une augmentation ou une diminution de l'activité des cellules gliales entraîne une altération de l'activité des neurones retrouvée dans les maladies neurodégénératives. Nous pourrions ainsi déterminer si les cellules gliales (et plus précisément les astrocytes) pourraient être des cibles pharmacologiques pour le traitement de ces maladies.

Seule l'expérimentation *in vivo*, reproduisant le plus fidèlement possible les interactions glie-neurones dans l'environnement physiologique, nous permettra de répondre à cette question.

Pour cela nous utiliserons majoritairement une approche virale de transfert de gènes dans les cellules gliales du cortex visuel. Des chirurgies seront réalisées sur un total de 481 souris sauvages C57Bl6/J et transgéniques sur une période de 5 ans pour réaliser des études sur la mémoire, mesurer l'activité des neurones, et quantifier l'expression de molécules.

Dans le respect de la règle des '3R', les différentes procédures expérimentales ont été consciencieusement pensées et élaborées afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en permettant d'obtenir des résultats statistiquement satisfaisants. De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, les procédures se dérouleront sous anesthésie

générale et des points-limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

À terme, les résultats de ce projet permettront de mieux comprendre le rôle des astrocytes dans les altérations neuronales retrouvées dans les maladies neurodégénératives et les mécanismes impliqués. Et plus généralement, ces résultats pourraient présenter un intérêt translationnel pour le traitement des maladies neurodégénératives, de nombreuses similarités étant observées dans les mécanismes neuropathologiques de ces maladies.

17987 Objectif du projet :

Conformément à la réglementation, tous les personnels impliqués en expérimentation animale, quelle que soit leur fonction, doivent suivre une formation continue, afin d'assurer le maintien et l'actualisation de leurs compétences, et ce, tout au long de leur carrière.

Le but de ce projet est donc de former, et de maintenir les compétences des utilisateurs à la réalisation/maîtrise des techniques d'administration et de prélèvement, en vue d'être utilisés lors de la réalisation de procédures expérimentales pour des projets menés pour le compte de clients.

Ces formations, réalisées en interne au sein de l'établissement utilisateurs seront validées par le Responsable du suivi des compétences de l'établissement utilisateur.

Avantages escomptés :

Cette formation / maintien des compétences s'adresse aux concepteurs et aux personnels appliquant des procédures expérimentales, détenteurs d'un niveau concepteur ou réalisateur en expérimentation animale, ils seront encadrés pour la réalisation de certains gestes techniques par un tuteur afin d'apprendre à travailler en totale autonomie et en aisance technique et pour maintenir la compétence du geste.

La formation comportera une première partie théorique, puis une seconde partie pratique avec la réalisation des gestes techniques sur animal vigile ou endormi.

Domages escomptés :

Le tuteur veille au respect des règles de contention des animaux et à la bonne exécution des manipulations/gestes réalisés ; le stress et la souffrance sont donc très limités.

La surveillance de l'animal par le tuteur durant la manipulation/gestes exécutés permet le cas échéant d'interrompre ceux-ci s'ils induisent un stress ou une souffrance chez l'animal.

Les administrations et les prélèvements (fréquences et volumes) seront effectués selon les recommandations en vigueur pour respecter le bien-être animal et sont détaillés dans chaque procédure.

Il n'y a pas de dommage escompté dans le cas de prélèvement sanguin unique.

Dans le cas de prélèvements sanguins répétés, une attention particulière sera apportée au niveau des sites de prélèvement afin d'éviter tout point de nécrose pouvant entraîner une douleur chez l'animal.

Dans le cas de prélèvements d'urine ou de fèces, les animaux seront hébergés individuellement dans des cages à métabolisme, sur grille pour une durée inférieure à un jour. De ce fait, le bien-être de l'animal est modifié, d'où une attention particulière qui sera portée sur l'état général de l'animal.

Les manipulations les plus invasives (exemple : administration intradermique, pose de cathéter, prélèvement de biopsies) seront réalisées sous anesthésie générale associée à une couverture antalgique en cas de nécessité. Une surveillance particulière sera portée sur l'état général de l'animal en cas de réveil.

Certains actes nécessitent la pratique d'une chirurgie et porte atteinte à l'intégrité physique par l'incision. Elle requiert des compétences particulières qui s'acquièrent par des connaissances de base et un apprentissage des gestes auprès de personnes compétentes et habilitées à la chirurgie.

Des points limites préalablement définis et adaptés à chaque manipulation/gestes permettront d'assurer un suivi de l'état général des animaux, de préserver leur bien-être et de mettre en place des interventions précoces et adaptées si nécessaire. En cas d'altération de l'état de l'animal, la

surveillance sera rapprochée et les animaux seront soignés en fonction de la sévérité de la douleur observée.

Méthodes alternatives préliminaires:

Un modèle d'expérimentation artificiel a été conçu utilisant un matériau de type plastique permettant à l'expérimentateurs d'acquérir les compétences préliminaires nécessaires pour manipuler un rat ou une souris de manière éthique, sans la nécessité d'utiliser un animal vivant. Il permet ainsi d'éviter le stress à la fois chez l'animal et chez l'expérimentateur. A ce jour il n'existe pas de modèle de substitution pour le lapin et le miniporc.

Néanmoins, il n'existe pas de méthode de remplacement permettant de se substituer à la totalité des gestes techniques, une formation sur animal entier reste nécessaire avant la réalisation des procédures expérimentales incluant de nombreux animaux. L'utilisation de ces méthodes alternative préliminaires permet de réduire le nombre d'animaux qui seront utiliser pour la suite de la formation/maintien des compétences.

Nombre et type d'animaux, conditions d'hébergement et de soins (principe de réduction et principe de raffinement) :

Ces formations / maintien des compétences sont réalisées dans la mesure du possible sur des animaux surnuméraires ou issu d'un projet précédent avec avis favorable du vétérinaire, ce qui contribue à la réduction du nombre d'animaux nécessaires.

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

Sur 5 ans, il est estimé à 1800 rongeurs (600 souris, 600 rats, 300 cobayes, 300 hamsters), 150 lapins et 150 miniporcs. Le nombre d'animaux sera modulé en fonction du nombre de personnes à former et du type et nombre de gestes techniques à mettre en œuvre.

Au total, pour ce projet d'une durée de 5 ans, 2100 animaux seront utilisés.

Les conditions d'hébergement, d'enrichissement et de soins ont été choisies de manière à réduire au maximum toute douleur, souffrance, angoisse ou dommages durables que pourraient ressentir les animaux, en conformité avec les législations française et européenne (Directive 2010/63) en vigueur.

La stratégie d'enrichissement est établie afin de permettre à l'animal de reproduire au mieux son environnement naturel et est régulièrement revue/mise à jour.

Dès leur arrivée, les animaux seront hébergés dans des cages collectives pour les rongeurs et lapins et individuelle sur litière pour les miniporcs avec un environnement enrichi (jouets, maisons/tunnels en cartons, briques de bois à grignoter, fibres de peuplier compressées, contact visuel et olfactif entre les animaux, musique, commutation progressive de la lumière et interactions fréquentes avec les humains...).

Dans les cas spécifiques de mise en diurèse, de mise à jeun ou de convalescence, les animaux pourront être placés dans des cages individuelles tout en maintenant un contact visuel, auditif et olfactif entre les animaux.

17988 L'ostéoporose est une maladie due à une perte osseuse excessive qui fragilise l'os avec un risque de survenue de fractures pour des traumatismes minimes. L'ostéoporose est une pathologie dont la fréquence augmente avec l'âge. Elle concerne plus souvent la femme, surtout après la période de la ménopause, à la suite d'une carence en œstrogène. Chez la femme, la période de la ménopause conduit à une accélération progressive de la perte osseuse : elle peut perdre 30 à 50 % de sa masse osseuse au cours de la vie. Avec l'allongement de l'espérance de vie, l'ostéoporose et les fractures qui lui sont associées représentent un problème de santé publique important : autour de l'âge de 65 ans, on estime que 39% des femmes souffrent d'ostéoporose. Chez celles âgées de 80 ans et plus, cette proportion monte à 70%. La mise en place de stratégies médicamenteuses hormonales est un axe principal de recherche sur le traitement de l'ostéoporose.

Ce projet a pour but de préparer des femelles rates pour l'étude de notre client de l'effet (préventif) d'hormones peptidiques spécifiques sur le remodelage osseux dans le développement de

l'ostéoporose. L'étude sera réalisée sur des rats femelles Sprague-Dawley. Une résorption osseuse accrue sera induite par l'ovariectomie (chirurgie faisant déjà l'objet d'une demande d'autorisation pour notre établissement) supprimant la principale source d'œstrogènes sécrétée par les ovaires.

L'alizarin Red S, un fluorochrome utilisé pour la coloration du cartilage et des os, sera injecté à chaque rat en sous-cutané avant l'ovariectomie. Ce fluorochrome réagit avec le calcium, aidant ainsi au diagnostic des dépôts de calcium. Il permettra de voir l'évolution du capital osseux au cours de l'étude avec l'ostéoporose et le traitement hormonal par la suite.

Le rat ovariectomisé est le standard des modèles animaux atteints d'ostéoporose. Les animaux générés dans ce projet seront destinés à une étude visant à développer des traitements hormonaux contre l'ostéoporose.

L'utilisation d'animaux vivants est rendue nécessaire. Le remplacement ne peut pas se faire par des méthodes alternatives. Le remodelage osseux est régulé par de nombreux facteurs qui opèrent en interaction. Afin d'élucider l'effet de l'un de ces facteurs (ici l'hormone peptidique), il est nécessaire de disposer d'un modèle expérimental dans lequel l'interaction est intacte. Le meilleur modèle pour cela est l'animal vivant.

La règle des 3R s'applique ici pour les principes de réduction et de raffinement.

Le nombre d'animaux dans chaque groupe (un groupe opéré et un groupe sham) est défini par notre client selon son protocole expérimental. Un total de 170 rats femelles est nécessaire sur 5 années de recherche.

Afin de satisfaire au raffinement, l'hébergement des animaux sera réalisé dans des locaux appropriés, avec un enrichissement systématique des cages (bâtons de bois à ronger) et un personnel formé et habilité qui réalisera les injections de fluorochrome et les ovariectomies en respectant les règles d'éthiques, le bien-être animal et le principe des 3R. Nos surveillances quotidiennes nous permettront d'identifier d'éventuels rats en souffrance et de prendre les mesures nécessaires (surveillance accrue, mise à mort dans les cas les plus graves). Tout animal qui présenterait une perte d'état général sévère sera euthanasié selon une méthode recommandée par la réglementation et, approuvée par le comité d'éthique et la Structure Bien-être Animal. Ce projet est classé en degré léger.

17989 Objectif scientifique du projet :

Il a été montré que la protéine N est surexprimée dans de nombreux cancers.

Les récepteurs de la protéine N activent des voies dites positives induisant des phénomènes de survie, de prolifération mais aussi de migration des cellules tumorales. En absence de la protéine N, les récepteurs ne sont pas inactifs. En effet, il a été montré qu'ils activent les voies dites négatives, induisant des processus de mort cellulaire.

C'est pourquoi les cellules tumorales ont mis en place des systèmes pour échapper à la voie de mort cellulaire de ces récepteurs. Par exemple, les cellules tumorales sont capables de surexprimer de manière autocrine la protéine N afin d'empêcher l'activation de la voie négative de mort cellulaire.

Afin de restaurer la mort cellulaire dans les cellules cancéreuses et induite par la voie Protéine N/Récepteurs, un anticorps monoclonal ciblant la Protéine N a été développé.

Objectif du projet et retombées attendues dans le domaine :

Les deux objectifs du projet sont les suivants :

- Le premier est de développer une nouvelle molécule anti-cancéreuse dans des modèles précliniques murins.

- Le second objectif est de comprendre les mécanismes moléculaires qui régissent la voie de mort engendrées par le blocage de la protéine N.

Afin de répondre à ces objectifs, des souris avec xénogreffes seront utilisées dans cette étude.

Balance dommages/bénéfices :

L'utilisation de la souris est une nécessité pour ce projet car l'utilisation d'un organisme entier est indispensable afin d'analyser l'efficacité d'un composé en thérapie anti-cancéreuse. Ces

expériences ne sont pas réalisables sur des modèles in vitro car il est impossible de prédire la dispersion d'un composé dans un organisme, son efficacité, et la dose à utiliser pour qu'elle soit optimum.

Pour se faire, les animaux subiront des greffes de cellules tumorales humaines, des injections intrapéritonéales des différentes molécules thérapeutiques.

Conformité avec la règle des 3R :

Les effectifs définis ont été déterminés à l'aide de comportement connu de ces différents modèles expérimentaux et tiennent compte des exigences statistiques nécessaires à l'exploitation des résultats. Les points limites ont été précisément définis et une surveillance adaptée des animaux tout au long des expériences permettra un contrôle de toute douleur animale. Afin de réduire le nombre de souris utilisées, un modèle d'œuf de poulet sera privilégié. L'utilisation d'antalgiques permettra de réduire la douleur des animaux en cas de détection de douleur.

Nombre total d'animaux inclus dans ce projet : 540 animaux au maximum.

17990 Le ouistiti est un singe du Nouveau Monde de petite taille de plus en plus étudié comme modèle en recherche biomédicale. Il existe plusieurs raisons justifiant l'intérêt croissant qu'il suscite. Il présente un comportement social, des capacités cognitives et une communication similaires à ceux observés chez l'Homme, tout comme son architecture cérébrale. Sa durée de vie relativement courte permet d'étudier son développement et son vieillissement sur des échelles de temps en adéquation avec un programme de recherche à moyen terme. Sa petite taille et sa fécondité, avec des naissances gémellaires et bi-annuelles le positionnent comme un candidat de choix pour les technologies d'édition génique. Au delà des avantages que présente cette espèce pour la recherche biomédicale, il est important de collecter des informations sur le comportement de ces singes en captivité. De nombreuses études ont déjà permis d'établir des éthogrammes et de définir les structures et organisations sociales des ouistitis. L'objectif de ce projet est de caractériser les capacités cognitives, le tempérament et de quantifier les interactions sociales de ouistitis hébergés en paire ou en groupe. Pour cela, les animaux seront entraînés à réaliser des tâches comportementales afin d'étudier les processus moteurs, visuels, mnésiques, motivationnels et émotionnels, à l'aide de dispositifs auxquels ils pourront accéder librement depuis leur cage d'hébergement. En parallèle, nous réaliserons des observations des interactions sociales dans la cage d'hébergement mais également dans un dispositif permettant de quantifier de manière contrôlée les déplacements spontanés ou provoqués par une récompense, un congénère ou un objet. Enfin, pour caractériser leur tempérament, nous réaliserons des tests de réactivité à la nouveauté et à la présence d'un humain inconnu. Grâce à l'imagerie par Résonance Magnétique (IRM), nous pourrions visualiser les structures cérébrales de chaque animal. Il s'agit d'un acte non invasif, réalisé sous anesthésie générale. Les résultats de l'ensemble de ces tests devraient permettre d'établir des profils comportementaux et de tempérament, et de raffiner les procédures permettant l'inclusion d'individus dans les protocoles les plus adaptés à ceux-ci et ainsi diminuer le stress lié à certaines procédures. De plus, nous pourrions étudier la relation entre les résultats comportementaux et les données anatomiques cérébrales recueillies par IRM. Un total de 30 ouistitis (*Callitrix jacchus*) seront utilisés dans ce projet.

Remplacement : Ce projet a pour objectif de caractériser le comportement et le tempérament des ouistitis et nécessite donc l'utilisation d'animaux. Ces tests comportementaux ne peuvent pas être effectués in silico, et doivent être réalisés spécifiquement chez cette espèce.

Réduction : L'objectif est d'étudier l'ensemble des ouistitis de notre colonie, dont nous estimons la taille, sur 5 ans, à 30 individus au maximum. Cependant, l'analyse des résultats lors de la première année pourrait permettre de limiter l'étude à des observations dans la cage d'hébergement pour les individus à l'avenir.

Raffinement : Les animaux seront hébergés en paire ou en groupe, dans un environnement adapté et enrichi (hamacs, branches, nids, etc.). Une procédure de conditionnement sera mise en place pour optimiser la coopération des animaux, notamment lors des captures, et diminuer le stress. Une attention particulière sera apportée aux réintégrations des animaux dans leur groupe après une

séparation, avec des observations à intervalles réguliers. Une anesthésie sera réalisée lors de la session d'imagerie.

17991 Une proportion non négligeable de cancer du sein (10 à 20%) ne répond pas aux traitements de type hormonothérapies, ni aux thérapies ciblées, du fait de leur nature génétique. Il s'agit de cancer du sein dits « triple négatifs ». Leur pronostic est mauvais en raison du peu d'options thérapeutiques existant : en effet, ces cancers ne répondent pas aux hormones, ni aux thérapies ciblées, la seule option étant la chimiothérapie. De plus, au bout d'un certain temps, le traitement par chimiothérapie devient inefficace chez une majorité des patients, conduisant alors à une rechute de la maladie. Cela signifie que certaines cellules cancéreuses exposées au traitement ont développé une résistance à ce traitement. Afin de développer des agents thérapeutiques capables de traiter ce type de cancers multi-résistants, il est nécessaire de disposer de modèles tumoraux précliniques adaptés. Ces modèles précliniques consistent à implanter une tumeur humaine chez une souris immunodéprimée, afin que le tissu humain ne soit pas rejeté par le système immunitaire de la souris, puis d'administrer l'agent thérapeutique.

Dans une première étape qui fait l'objet de ce protocole, il s'agit de déterminer si un type de tumeur « triple négative » donné répond de façon efficace à un type de traitement donné. Le protocole présenté se divise en trois procédures.

Les modèles tumoraux triple négatifs sont peu tumorigènes, et ne développent de tumeurs que chez les souris fortement immunodéprimées, où aucune cellule immunitaire murine n'est en mesure de freiner leur croissance. Les modèles tumoraux seront implantés chez deux types de souris « super immunodéprimées », les souris NOG et les souris NXG afin de déterminer leur potentiel tumorigène.

Dans un second temps, l'absence de toxicité des agents thérapeutiques choisis aux doses choisies sera mise en évidence sur les deux types de souris.

Enfin, la sensibilité de chaque modèle tumoral à chaque agent thérapeutique sera caractérisée lors d'une étude d'efficacité anti-tumorale.

Ce projet nécessitera sur 5 ans un maximum de 1 992 souris.

Prise en compte des 3 R :

A. Remplacement : cette étude cherche à étudier l'efficacité in vivo de nouveaux traitements anticancéreux ce qui nécessite d'avoir recours à l'animal pour intégrer l'effet de l'organisme sur le composé. A terme nous souhaiterions disposer d'un modèle qui permettra de tester de nouvelles thérapie contre les cancers triples négatifs résistants aux traitements conventionnels

B. Réduction : les procédures seront faites sur le nombre minimal de souris nécessaires permettant de conclure de façon fiable statistiquement ; Les expériences sur les différents modèles seront réalisées en séquentiel, les résultats seront évalués pour déterminer la nécessité de poursuivre les expériences, afin de réduire autant que possible le nombre de souris utilisées ;

C. Raffinement : Avant la mise en place du protocole les souris seront acclimatées aux expérimentateurs du projet afin de limiter leur stress. Toutes les précautions seront prises pour détecter et minimiser la souffrance, la douleur et le stress des animaux (observation quotidienne weekend compris , pesée des animaux, traitement antalgique si besoin).

17992 Le syndrome dysgénésique et respiratoire porcin (SDRP) est une affection virale caractérisée par des troubles de la reproduction chez les truies et des troubles respiratoires chez les animaux en croissance. Cette maladie est très présente dans les régions à forte densité de production porcine où elle conduit à des pertes économiques considérables.

Parmi les mesures de lutte contre le virus du SDRP (SDRPV), la vaccination est une des plus souvent mises en œuvre sur le terrain. Les vaccins qui sont les plus utilisés et les plus efficaces sont les vaccins vivants atténués (en anglais modified live vaccine : MLV). Les MLV présentent cependant des défauts de sécurité dans la mesure où, suite à des phénomènes de mutation ou de recombinaison, ils peuvent retrouver leur virulence.

En 2016, une souche recombinante entre 2 MLV SDRP a été mise en évidence pour la première fois en France. Une étude in vivo a montré que cette souche recombinante présentait un niveau de réplication et de transmission bien supérieur à celui des 2 souches vaccinales parentales dont elle était issue. En 2019, une autre souche recombinante entre MLV SDRP a été mise en évidence au Danemark. Cette souche s'est répandue dans une quarantaine d'élevages où elle a induit des symptômes parfois sévères du SDRP.

Au regard de ces données, il paraît donc particulièrement important de prévenir l'émergence de souches recombinantes entre les MLV SDRP dans la mesure où celles-ci peuvent avoir une virulence élevée.

Une recombinaison entre 2 MLV SDRP peut se produire lorsqu'un porc présentant du virus vaccinal dans le sang pour un premier MLV SDRP est vacciné ou est contaminé (par transmission naturelle de la souche vaccinale) par un second MLV. Pour prévenir la recombinaison entre MLV, il est donc essentiel de prévenir la co-infection des porcs par 2 MLV différents. En pratique, il faut pour cela (i) connaître la durée de présence du virus vaccinal dans le sang pour les différents MLV SDRP et (ii) connaître le potentiel de transmission des différents MLV SDRP.

L'objectif du présent projet est d'évaluer pour les 5 MLV SDRP disponibles en France la durée de présence dans le sang des virus vaccinaux ainsi que leur capacité de transmission à des animaux sentinelles.

Pour ce faire, nous mettrons en place une étude incluant 66 porcelets répartis en 6 groupes. Chacun des 5 groupes vaccinés comportera 12 animaux (6 animaux vaccinés + 6 animaux contact non vaccinés) et le groupe contrôle comptera 6 animaux.

Dans la mesure où l'infection par le virus du SDRP est spécifique aux porcs et qu'il n'y a pas possibilité d'évaluer la présence dans le sang / transmission vaccinale in vitro, il n'y a aucune possibilité de remplacement du modèle porc pour cette étude. Comme décrit dans les notices des vaccins, la vaccination des porcs par les différents MLV ne devrait induire que des symptômes mineurs tels qu'une élévation temporaire de température et une légère dépression.

Le nombre d'animaux a été réduit autant que possible tout en permettant l'obtention de données fiables et exploitables. Les porcs seront élevés en groupes stables, bénéficieront d'un enrichissement social et auront à leur disposition des objets manipulables. Ils seront nourris et abreuvés à volonté. En cas d'atteinte de points limites préalablement définis, les porcs seront euthanasiés afin qu'ils ne souffrent pas.

Les connaissances générées dans le cadre de ce projet permettront de caractériser précisément les durées de virémie et les capacités de transmission des différents MLV disponibles en France. Ces données permettront aux autorités compétentes (Agence Nationale du Médicament Vétérinaire) de définir des recommandations précises visant à prévenir les recombinaisons entre les MLV SDRP.

17993 Le bien-être animal est une notion importante, qui suscite un intérêt croissant depuis quelques années, notamment en élevage. Elle ne fait plus seulement appel à la notion d'équilibre et d'homéostasie nécessaires entre l'animal et son environnement, à l'absence d'expériences négatives et contraignantes, mais implique dorénavant également la possibilité pour l'animal d'accéder à des émotions positives et de diminuer ses états mentaux négatifs. Bien que des progrès ont été mis en place pour améliorer le bien-être des animaux dans la plupart des filières d'élevage, certaines en nécessitent encore pour une prise en compte optimale. Une manière d'améliorer le bien-être des poissons d'élevage est d'incorporer des éléments d'enrichissements dans leur environnement. L'enrichissement physique consiste à apporter des éléments complexifiant physiquement (plantes, structures) ou sensoriellement (visuel, auditif...) l'habitat.

Ce projet a pour vocation de tester une stratégie d'enrichissement physique par l'ajout dans les bassins de 3 plantes artificielles, 3 tuyaux/abris et 3 galets pendant 3,5 mois dans le but d'améliorer le bien-être, la réponse au stress et les capacités cognitives de la truite arc-en-ciel en élevage. Deux traitements seront constitués 100 jours après la fécondation : le lot enrichi (E) et le lot non enrichi (NE) avec 3 réplicats de bacs par traitement. Chaque réplicat contiendra 30 poissons.

Après 2 mois d'élevage enrichi ou non enrichi, nous analyserons le comportement des poissons in situ par observations vidéos pendant 1 mois, puis 15 individus par traitement seront euthanasiés afin de réaliser des prélèvements de tissus (sang, rate et cerveau). Des mesures physiologiques dans le sang et la rate (marqueurs de santé : concentrations de lysozymes et d'activation du complément, identification de gènes impliqués dans le système immunitaire) et neurobiologiques (gènes de la neurogenèse et du stress exprimés dans trois régions du cerveau) seront réalisées. Les animaux d'un même traitement seront à ce stade réunis dans un seul bac d'une dimension plus grande que celle des réplicats. A 3,5 mois, nous évaluerons la réactivité émotionnelle de 12 individus par traitement (réponse à l'isolement social en environnement nouveau). A l'issue de ce test, les 12 individus par traitement seront anesthésiés afin de réaliser des prélèvements de sang pour la mesure du cortisol plasmatique (marqueur du stress), puis remis avec leurs congénères. Huit autres individus seront euthanasiés à T0 et leur sang prélevé afin de mesurer le niveau de cortisol basal. Outre les phénotypes comportementaux in situ (comportements en groupe), le comportement des individus soumis au test de réactivité et les analyses physiologiques, nous analyserons les paramètres suivants pour chaque traitement : croissance, indice de consommation, qualité d'eau (teneur en oxygène, teneur en ammonium, pH). Les animaux seront ensuite gardés une année supplémentaire afin de mesurer leur capacité d'apprentissage dans un dispositif de conditionnement opérant. L'enrichissement du milieu améliore en effet les capacités d'apprentissage d'après la littérature recensée chez d'autres espèces. Des corrélations pourront être faites entre la réponse au stress mesurée lors du test de réactivité (comportement et cortisol) et la vitesse d'apprentissage en fonction des conditions d'élevage des poissons (enrichies ou non). Le projet nécessitera l'utilisation de 24 animaux dans le cadre d'une procédure expérimentale.

Le projet respectera la règle des 3 Rs :

-Remplacer : il n'existe pas d'alternative à cette expérimentation animale puisque le but de cette étude est d'observer le comportement des poissons en réponse à la présence ou à l'absence d'un enrichissement dans le bassin dans l'optique d'une application future en élevage.

-Réduire : le nombre d'animaux permettra des analyses statistiques fiables, tout en assurant une densité optimisant la stabilité hiérarchique des poissons au sein des bacs.

-Raffiner : les animaux seront élevés dans les conditions optimales pour l'espèce (photopériode, qualité d'eau, densité, nourriture, enrichissement). Les traitements appliqués sont précisément des procédures d'enrichissement qui doivent améliorer le bien-être animal. Par ailleurs, les poissons seront simplement filmés et parfois manipulés pour les tests comportementaux ou pour des interventions de routine en élevage (pesées, transferts). La seule procédure nécessitant la demande d'autorisation de projet concerne 24 individus pour lesquels une simple prise de sang sera effectuée sous anesthésie générale.

17994 La protéine ApoE est une lipoprotéine transporteur de lipides. La lignée ApoE^{-/-} (ApolipoprotéineE^{-/-}) est un modèle physiopathologique de la maladie athéromateuse dans l'espèce humaine, maladie artérielle diffuse et progressive caractérisée par l'altération de la paroi artérielle par des dépôts graisseux. Cette lignée est présente au laboratoire et a été manipulée récemment pour un projet portant sur la protection du vaccin anti-grippal vis-à-vis de la formation de plaques d'athérome. Or, le métabolisme des lipides, impacté dans cette maladie humaine et dans le modèle animal étudié, est fortement impliqué dans le bon déroulement de la folliculogenèse ovarienne, c'est pourquoi il est pertinent de proposer une étude préliminaire sur 3 souris mutantes ApoE^{-/-} (et 3 souris sauvages contrôles) pour évaluer l'impact de l'absence de la protéine ApoE sur la physiologie de l'ovaire (nombre de follicules, composition en lipides de l'ovocyte).

Le cycle sexuel des souris sera suivi par frottis vaginal, puis les souris recevront deux injections d'hormones à 48h d'intervalle pour stimuler l'ovulation, avant d'être euthanasiées pour prélèvement des ovaires et ovocytes pour analyse ultérieure. La lignée sera maintenue par reproduction jusqu'à l'analyse des résultats préliminaires, et développée si le projet se poursuit.

Remplacement : le modèle ApoE^{-/-} est unique pour l'étude des effets du métabolisme lipidique sur la physiologie ovarienne

Réduction : ce projet préliminaire porte sur 3 souris KO et 3 sauvages contrôles, ce qui est le minimum nécessaire pour pratiquer des tests statistiques pour des critères quantifiables.

Raffinement : les souris sont élevées en groupe en présence d'enrichissement du milieu (boîtes-cabanes d'exploration en cartons, et crinklets (lanières de papier recyclé) pour le nid lors des gestations). Les animaux sont manipulés régulièrement avant l'application des procédures pour réduire leur stress au moment des procédures, qui sont de classe légère. Après chaque procédure, les animaux recevront un morceau de pomme (renforcement positif). Enfin, les animaux sont surveillés quotidiennement et des dispositions sont prises si des troubles (comportementaux, cutanés...) apparaissent.

17995 Le projet porte sur l'utilisation par voie nasale de nanoparticules biodégradables et biocompatibles comme vecteur d'antigènes dans le but d'immuniser contre une infection parasitaire à *Toxoplasma gondii* et d'induire une réponse immunitaire systémique et muqueuse spécifique et protectrice dans un contexte de toxoplasmose aiguë et chronique. Un premier candidat vaccin utilisant l'ensemble des protéines du parasite a été validé dans des modèles murin et ovin de toxoplasmose aiguë, chronique et congénitale. Suite à ces résultats, le développement du vaccin nécessite de simplifier sa production. L'objectif du projet est de comparer l'efficacité par voie intranasale du candidat vaccin optimisé (3 protéines) au candidat vaccin avec la totalité des antigènes de *T. gondii*, dans des modèles de toxoplasmose aiguë et chronique chez la souris femelle.

Cette expérimentation nécessitera l'utilisation maximale de 480 souris femelles adultes de la lignée CBA/J, modèle choisi en fonction de sa sensibilité pour la toxoplasmose chronique, dans le respect de la règle des 3R.

- Remplacement : aucun modèle in vitro ne reproduit un modèle de régulation complexe permettant la validation de notre stratégie.

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

- Raffinement : Les souris sont hébergées en accord avec les directives européennes et dans un environnement enrichi systématique d'objets en cellulose type "boîte à oeuf" pour faire un nid ou à ronger. Cet enrichissement pourra être complété en cas de besoin au moment de la réalisation des procédures par des briquettes en bois ou des lanières de papier Craft.

17996 Objectif scientifique du projet :

Il a été montré que la protéine X est surexprimée dans de nombreux cancers.

Les récepteurs de la protéine X activent des voies dites positives induisant des phénomènes de survie, de prolifération mais aussi de migration des cellules tumorales. En absence de la protéine X, les récepteurs ne sont pas inactifs. En effet, il a été montré qu'ils activent les voies dites négatives, induisant des processus de mort cellulaire.

C'est pourquoi les cellules tumorales ont mis en place des systèmes pour échapper à la voie de mort cellulaire de ces récepteurs. Par exemple, les cellules tumorales sont capables de surexprimer de manière autocrine la protéine X afin d'empêcher l'activation de la voie négative de mort cellulaire.

Afin de restaurer la mort cellulaire induite par la voie Protéine X/Récepteurs, le laboratoire a développé un anticorps monoclonal ciblant la Protéine X. Cet anticorps est actuellement testé pour une phase 2 chez l'homme.

La radioimmunothérapie consiste en l'utilisation d'anticorps comme des transporteurs de molécules radioactives vers une cible spécifique (en l'occurrence une tumeur). Cela permet ainsi d'imager ou d'irradier spécifiquement la zone exprimant la cible de l'anticorps utilisé suivant le radio-isotope utilisé. Ce domaine a fait l'objet de nombreuses études pré cliniques et cliniques amenant notamment la mise sur le marché de 2 anticorps radiomarqués pour le traitement des lymphomes non Hodgkiniens, le Bexxar® et le Zevalin®.

Objectif du projet et retombées attendues dans le domaine :

Notre projet a deux objectifs :

- Le premier est de développer un nouveau radio pharmaceutique permettant l'imagerie in vivo de l'expression de la Protéine X au niveau tumoral. Le composé radioactif injecté qui se concentrera uniquement dans les tumeurs exprimant fortement la protéine X, permettra sa détection par imagerie dans des modèles précliniques murins. Cette étude devrait nous permettre à terme de sélectionner des patients éligibles au nouveau traitement anti-protéine X par imagerie.

- Le second objectif de notre projet est de développer un agent de radiothérapie métabolique en le couplant avec un isotope pertinent pour la thérapie afin de détruire les tumeurs de l'intérieur. Notre but est que la radio-activité se concentre dans les tumeurs exprimant beaucoup de protéine X, que notre nouvelle molécule la détecte et se concentre à son tour dans le tissu tumoral. La radio-activité à forte dose locale devrait ainsi bloquer la division cellulaire et induire la mort des cellules cancéreuses.

Afin de répondre à ces objectifs, différents modèles de souris seront utilisés dans cette étude: des souris avec xénogreffes et un modèle souris avec des tumeurs spontanées transgénique.

Balance dommages/bénéfices :

L'utilisation de la souris est une nécessité pour ce projet car l'utilisation d'un organisme entier est indispensable afin d'analyser la dispersion spatiale des traceurs d'imagerie. En effet, des études de la biodistribution de notre nouvelle molécule thérapeutique seront réalisées au sein des différents organes ainsi qu'une étude de sa potentielle toxicité sur les organes sains. Ces expériences ne sont donc pas réalisables sur des modèles in vitro. Brièvement, les animaux seront « imagés » afin de voir si le traceur s'accumule dans les tumeurs, favorisant leur identification de manière non invasive. En cas d'accumulation dans les tumeurs, un second radio-isotope sera couplé à l'anti-protéine X, afin d'amener de manière ciblée une dose de radioactivité nécessaire pour tuer les cellules cancéreuses.

Pour ce faire, les animaux subiront pour ce projet des greffes de cellules tumorales, des injections en intraveineuses des différentes molécules thérapeutiques ainsi que des procédures d'imagerie.

Conformité avec la règle des 3R :

Le développement d'un nouveau traceur d'imagerie est en soit un effort de raffinement afin de ne pas procéder à la mise à mort des animaux. Les effectifs définis ont été déterminés à l'aide de comportement connu de ces différents modèles expérimentaux et tiennent compte des exigences statistiques nécessaires à l'exploitation des résultats. Les points limites ont été précisément définis et une surveillance adaptée des animaux tout au long des expériences permettra un contrôle de toute douleur animale. L'ensemble des procédures d'acquisition d'images sera réalisé sous anesthésie générale des animaux. Certains animaux utilisés dans l'étude proposée sont transgéniques.

Nombre total d'animaux inclut dans ce projet : 2848 animaux au maximum.

17997 La valeur énergétique des aliments pour les porcs est une caractéristique majeure permettant d'évaluer leur utilisation par les animaux. En France, la valeur énergétique des aliments est principalement basée sur des travaux qui ont permis d'attribuer une concentration énergétique à chaque nutriment constitutif des aliments (glucides, lipides, protéines). Cette concentration dépend de l'utilisation métabolique du nutriment par l'animal. Par exemple, les protéines alimentaires peuvent être utilisées par le porc de deux façons. D'une part, les protéines alimentaires peuvent être utilisées pour la synthèse des propres protéines corporelles de l'animal. Elles peuvent également être utilisées pour fournir de l'énergie à l'animal. Les voies métaboliques impliquées dans ces deux utilisations diffèrent, de même que les concentrations énergétiques (théoriques) associées. Pour autant, une seule concentration énergétique est attribuée aux protéines alimentaires, quel que soit leur usage, car la plupart des situations d'alimentation des porcs aboutissent à une utilisation des protéines à la fois pour des usages de synthèse de protéines corporelles et de fourniture d'énergie métabolique. Aujourd'hui, les aliments destinés aux porcs présentent des teneurs de plus en plus faibles en protéines, afin de limiter le gaspillage de protéines alimentaires et les rejets dans l'environnement. L'objectif du projet est d'évaluer la valeur

énergétique des aliments, quand l'utilisation des protéines alimentaires est principalement orientée vers la synthèse des protéines corporelles. Pour cela, la production de chaleur à l'état nourri et en situation basale sera mesurée sur 21 porcs d'un poids d'environ 30 kg. Le projet a été élaboré dans le respect de la règle des 3R. Remplacer: le projet nécessite des mesures sur animaux afin de déterminer la réponse métabolique des animaux car la diversité des voies métaboliques impliquées dans les utilisations des nutriments ne peut être envisagée par des approches de modélisation par exemple. Réduction: le nombre d'animaux mobilisés dans le projet a été réduit au maximum sur la base des travaux antérieurs. Nous avons évalué le nombre d'animaux à 7 par modalité expérimentale car ceci nous permet d'avoir une précision suffisante dans l'estimation des valeurs nutritionnelles des aliments. Raffinement: le projet nécessite de placer les animaux individuellement dans des enceintes qui génèrent un isolement social des animaux. Les enceintes sont équipées de dispositifs audio permettant aux animaux d'entendre les bruits de leurs congénères et de limiter leur niveau d'isolement.

17998 Ce projet porte sur l'étude des métastases dans le cancer du sein. Les métastases sont des nouvelles tumeurs apparaissant à distance d'une tumeur principale. La détection des métastases est un point crucial pour la prise en charge des patients et le choix des traitements.

Ce projet est donc construit avec un triple objectif: 1/ Mettre en place de nouveaux traceurs radioactifs d'imagerie pour la détection précoce des métastases du cancer du sein, 2/ évaluer l'action de ces traceurs pour le suivi de l'apparition de métastases 3/ évaluer les effets de nouveaux traitements.

Le cancer du sein sera induit chez la souris par injection de cellules cancéreuses au niveau de la glande mammaire. Ces cellules ont été modifiées pour produire de la lumière et peuvent donc être suivies dans l'animal. Ces cellules sont connues pour former une tumeur au niveau de la glande mammaire puis elles forment des métastases dans différents organes notamment le cerveau, les os, les poumons et le foie en 6 semaines.

Une première étape préliminaire servira à mettre en place les modèles chez la souris afin de bien les caractériser pour les expériences suivantes.

Par la suite, nous allons évaluer 4 nouveaux traceurs ; les traceurs 1 et 2 qui ont des propriétés d'imagerie des métastases et les traceurs 3 et 4 qui ont des propriétés d'imagerie combinées à une action thérapeutique. L'efficacité de ces 4 traceurs sera comparée à un traceur commercial de référence

Pour la totalité du projet 234 souris seront nécessaires.

La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R. Tout d'abord, en comparaison avec une étude classique qui nécessite la mise à mort des animaux à chaque point de temps examiné, l'imagerie est répétée à différents temps et permet de réduire le nombre d'animaux d'autant. De plus, le design choisi permettra d'éviter de multiplier les expérimentations identiques et de réaliser des validations successives. Le raffinement a été pris en compte : la totalité des procédures impliquant les animaux sera réalisée sous anesthésie suivie d'un réveil sous lampe chauffante pour réduire au maximum l'inconfort potentiel. L'étude de la formation et la diffusion des métastases rend la règle de remplacement difficilement applicable puisqu'il est nécessaire de l'étudier dans son environnement in vivo.

17999 L'amélioration des performances de croissance en production avicole s'est effectuée grâce à la sélection génétique et à une optimisation de l'alimentation, mais elle a été réalisée au détriment de la santé des animaux associée à une augmentation de l'incidence des maladies infectieuses. La coccidiose, causée par des parasites du genre *Eimeria*, représentent le premier fléau parasitaire de l'aviculture induisant des pertes de production ayant de graves conséquences économiques dues à de la mortalité mais surtout de la morbidité. L'infection par *Eimeria* conduit à une inflammation intestinale importante. Cependant, la nature des différents acteurs cellulaires et moléculaires ainsi que les mécanismes précis conduisant à cette inflammation nécessitent d'être mieux connus. Des travaux montrent l'importance de l'interleukine 17 (IL-17) sur l'inflammation et l'apparition de lésions.

Dans ce contexte, et comme une population de lymphocytes T, les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont des cellules majeures impliquées dans la production d'IL-17. Ces cellules sont à l'interface de la réponse immunitaire innée et de la réponse immunitaire spécifique et qu'elles ont un fort impact sur la réponse immunitaire humorale. Nous avons pour objectif d'étudier le rôle de ces cellules sur la réponse protectrice lors d'une réinfection par *Eimeria tenella*. Ce travail sera réalisé en collaboration avec une équipe allemande qui a produit des poulets exempts de cette population de lymphocytes T.

Pour ce faire nous utiliserons au maximum 620 poulets au total. Ce chiffre prend en compte la pré-expérimentation et les expérimentations sur 100 poulets produits, 25 sont wild-type et 25 sont homozygotes (exempt de cette population cellulaire). Grâce à ces poulets wild-type et transgéniques, nous pourrions déterminer le rôle de cette population de lymphocyte T lors d'une réinfection.

Dans ce projet la règle des 3R est respectée comme suit :

Remplacement : le rôle d'une population de lymphocytes T, les lymphocytes T $\gamma\delta$ sur la réponse protectrice lors de la réinfection par *Eimeria tenella*, nécessite l'utilisation d'animaux et ne peut être réalisée in vitro.

Réduction : Le nombre d'animaux par lot est adapté aux buts de cette expérimentation.

Raffinement : Les poulets seront hébergés en cages adaptés à leur taille, dans des conditions environnementales contrôlées, avec nourriture et eau à volonté et disposeront d'un enrichissement social et comportemental (pellet de fourrage compressé permettant aux animaux d'exprimer leur comportement de grattage piquage, petites plaques en inox suspendues ce qui permet aux animaux de piquer dedans).

18000 La pratique d'une activité physique (AP) régulière et modérée représente aujourd'hui un élément clé dans la prise en charge des patients atteints de cancer. L'AP induit des bénéfices sur la qualité de vie, la fatigue, les capacités physiques mais aussi sur l'évolution et la récurrence de certains cancers comme le cancer de la prostate (CaP). Malheureusement, les recommandations existant à l'heure actuelle restent trop générales et sont identiques à celles de la population générale, ne prenant en compte ni la pathologie, ni les traitements. Dans ce contexte, notre projet vise à déterminer l'impact de différentes modalités d'activité physique sur la croissance de la tumeur de la prostate dans deux modèles de rongeurs (immunocompétent et immunodéficient). Nous pourrions identifier les mécanismes moléculaires sous-jacents et plus particulièrement les modulations de la vascularisation tumorale et du système immunitaire. Pour se faire, nous aurons huit groupes d'animaux pendant 6 semaines. 4 groupes de souris immunocompétentes réparties en un groupe de souris saines (n=12), un groupe de souris cancer (n=12), un groupe de souris cancer qui réalise un entraînement sur tapis roulant (n=12) et un groupe de souris cancer qui réalise de l'activité physique spontanée sur roue d'activité (n=12). Ils seront comparés à 4 groupes de souris immunodéficientes réparties là encore en un groupe de souris saines (n=12), un groupe de souris cancer (n=12), un groupe de souris cancer qui réalise un entraînement sur tapis roulant (n=12) et un groupe de souris cancer qui réalise de l'activité physique spontanée sur roue d'activité (n=12). Ce projet de recherche a été pensé en respectant au mieux la règle des 3R. Remplacement: ce modèle expérimental in vivo ne peut pas être remplacé par un modèle in vitro car il résulte d'un dialogue entre la tumeur, le sang et le système immunitaire. Réduction: Le nombre d'animaux a été déterminé afin d'obtenir des valeurs statistiquement significatives et scientifiquement irréprochables pour valider les données obtenues à la fin de la procédure. Dans notre étude, 96 souris mâles seront utilisées pour répondre à ces exigences statistiques. Raffinement: les animaux seront hébergés dans une structure agréée qui tient compte de l'éthique animale. L'hébergement se fait dans des cages munies de jouets afin de minimiser le stress induit par l'hébergement. Le raffinement est complété par une surveillance journalière des animaux pour s'assurer que les conditions de bien-être sont respectées. En cas de souffrance constatée, toutes les mesures nécessaires pour réduire la souffrance seront mises en place (anesthésie, analgésie et/ou sortie du protocole).

18001 Mesures sur animaux jeunes ou adultes (volailles, porcs) de l'énergie métabolisable et/ou de la digestibilité de tout autre nutriment des aliments ou des matières premières et additifs destinés à l'alimentation des animaux de rentes en élevages de production.

Pour les volailles et les porcs, l'objectif est aussi de mettre certaines mesures faites in vivo en corrélation avec les mesures faites in vitro avec un appareil de spectrométrie proche Infra Rouge (NIR).

En plus des analyses chimiques faites sur les matières premières, il est nécessaire de mesurer in vivo la digestibilité des aliments ou de certains nutriments (acides aminés et énergie en particulier), les méthodes in vitro étant insuffisamment précises et moins discriminantes.

Les coefficients de digestibilité sont spécifiques aux différents nutriments dans chaque matière première et pour chaque espèce animale.

Connaître la fraction digestible des produits utilisés pour la formulation des aliments est indispensable pour l'optimisation des rations sur le plan technique et sur le plan économique gage de pérennité des élevages de production.

Ce dossier décrit les procédures spécifiques utilisées dans ce but.

Dans le cas de mesure d'efficacité d'additifs alimentaires, ils sont incorporés à faibles doses (entre 0.1 et 1%) dans des rations équilibrées spécifiques qui sont distribuées aux animaux avec des contrôles individuels de consommations.

La période d'essai proprement dite dure entre 3 jours et 2 semaines en fonction des procédures mises en œuvre.

4800 poulets et 200 porcs sont utilisés au maximum chaque année pour le projet.

Les besoins de mesures de digestibilité sont permanents pour l'établissement; ce projet est établi sur une période de 5 ans.

Les animaux sont logés dans des conditions conformes au respect de leur bien-être et de leurs exigences physiologiques et ne doivent subir aucun dommage durant la phase expérimentale.

Effectuées par des personnels parfaitement formés selon les bonnes pratiques précisément décrites dans des procédures, les manipulations des animaux sont sans conséquence sur le devenir des animaux (raffinement).

Des techniques de mesures de digestibilité in vitro de la matière organique des matières premières et aliments ont été développées en parallèle afin de ne réserver les mesures in vivo qu'aux produits sélectionnés parmi plusieurs (screening) afin de limiter le nombre d'essais (réduction).

18002 La maladie de Behçet est une pathologie inflammatoire touchant de nombreux organes, donnant des aphtes buccaux et génitaux caractéristiques et impliquant des facteurs environnementaux et génétiques pré-disposants. L'altération des microbiotes intestinal et buccal et la surreprésentation de certaines espèces bactériennes pourraient jouer un rôle dans le déclenchement et l'entretien de ces manifestations inflammatoires, en activant le système immunitaire des muqueuses et en entraînant une réponse lymphocytaire pro-inflammatoire. Un Streptocoque, appartenant à la flore buccale saine, pourrait d'après la littérature, jouer un rôle dans l'inflammation. Le traitement de première intention chez les patients est la colchicine pour les atteintes articulaires et cutanéomuqueuses, mais son mécanisme d'action n'est pas complètement élucidé. Le projet présenté vise à éclaircir l'impact de la colonisation chronique de la muqueuse buccale par une souche de Streptocoque (isolée de la flore buccale de patient atteint de la maladie de Behçet) sur la composition des microbiotes buccal ou digestif, ainsi que sur les processus inflammatoires au niveau de la muqueuse buccale, de la muqueuse digestive, de la paroi des vaisseaux et au niveau systémique. Dans un deuxième temps, nous déterminerons si la colchicine impacte les paramètres étudiés.

Remplacer

Ce projet nécessite l'utilisation de souris afin de reproduire dans son ensemble la physiopathologie en réponse à une infection bactérienne, notamment l'impact sur les muqueuses buccale et digestive, en prenant en compte un environnement complexe comprenant le système immunitaire

(pour permettre le dosage de cytokines pro-inflammatoires et de certains anticorps) et le microbiote intestinal. Des études in vitro ne seraient pas suffisantes pour conclure sur l'impact d'une souche de Streptocoque sur l'organisme et le microbiote.

Réduire

Le nombre de 10 animaux par lot a été défini en prenant en compte l'expérience du laboratoire lors de précédentes études. Ce nombre d'animaux devrait permettre d'obtenir des résultats fiables, reproductibles et statistiquement significatifs. Le nombre d'animaux utilisé pour cette manipulation a été réduit au minimum, dans la mesure où cela ne compromet pas les objectifs du projet. La première partie de l'étude sera réalisée sur 2 lots de 10 souris : un lot de souris non infectées et un lot de souris infectées. Elle permettra de déterminer en fonction des résultats si la deuxième partie de l'étude sera réalisée ou non. Pour cette deuxième partie, 4 lots de 10 animaux seront utilisés pour déterminer l'impact du traitement par colchicine. Selon les résultats, le projet inclura entre 20 et 60 animaux. Dans le cadre de la règle des 3R, un maximum de prélèvements sera réalisé post-mortem.

Raffiner

Les animaux seront hébergés 10 par cage de 900cm² en cages ventilées et auront libre accès à l'eau et la nourriture. Une période d'acclimatation de 7 jours sera réalisée avant le début de l'expérimentation. Les conditions d'hébergement sont les suivantes: température 20-22°C, hygrométrie 40-60%, cycle 12h/12h, éclairage 350-450 lux. Un enrichissement est proposé aux souris : tube/cachette en polycarbonate teinté rouge. Le bien-être de chaque animal sera évalué quotidiennement par des personnels formés à partir d'une grille tenant compte de plusieurs critères (sur 18 points), dans le but de mettre en évidence tout signe de souffrance. En fonction de ce score individuel de bien-être et de son évolution, un arbre décisionnel permettra d'adapter la surveillance ou le traitement de l'animal par des antalgiques. Si un animal dépasse le score limite, il sera alors sorti de l'étude et euthanasié.

18003 Réduire la mortalité des veaux est un enjeu majeur pour les éleveurs. Les maladies diarrhéiques et respiratoires, constituent une cause majeure de morbidité et représentent de 30 à 90% de la mortalité constatée. Le projet souhaite par une approche novatrice identifier des biomarqueurs chez les jeunes veaux permettant de prédire précocement leur susceptibilité aux maladies diarrhéiques et respiratoires afin de pouvoir apporter des soins particuliers aux animaux les plus fragiles. Les jeunes animaux dépendent fortement de leur immunité innée pour se défendre contre les infections avant d'être capable de développer leur propre immunité acquise. C'est ce potentiel immunitaire innée des veaux que nous souhaitons quantifier grâce à un test sanguin. La réponse immunitaire innée du veau sera quantifiée puis corrélée avec les paramètres génétiques des animaux et à leur statut sanitaire (présence de pathogènes entériques et respiratoires dans les premières semaines de vie). L'analyse des différents paramètres devrait nous permettre d'identifier un ou plusieurs biomarqueurs de sensibilité aux maladies du jeune.

Pour réaliser cette étude jusqu'en 2020 nous suivrons au total 500 veaux de race laitière (Holstein) et 500 veaux de race à viande (Charolais) pendant 2 mois, ainsi que la moitié environ de leurs mères (soit 500 vaches). Un tiers de ces animaux seront issus d'une ferme expérimentale et le restant seront issus de fermes commerciales. Les individus sélectionnés seront ensuite maintenus dans l'élevage sans autres interventions.

Le principe des 3R a été pris en compte dans la construction du projet :

- Remplacement : les mécanismes étudiés mettent en jeu des interactions complexes au sein de l'hôte qu'il est impossible de reproduire dans un modèle cellulaire, de culture d'organe ou dans une autre espèce.

- Réduction : le choix du nombre de veaux intégrés dans l'étude correspond au minimum nécessaire pour mener des analyses génétiques.

- Raffinement : les conditions d'hébergement, d'alimentation, de prophylaxie et de traitement des animaux ne sont pas modifiées par la mise en oeuvre du projet. Les divers prélèvements seront assurés par du personnel expérimenté, avec des moyens de contention et du matériel adaptés.

18004 L'endométriose est une maladie gynécologique chronique caractérisée par la présence de tissu endométrial (glandes endométriales et stroma), aussi appelé tissu utérin, en dehors de la cavité utérine. Ce tissu crée des lésions hormono-dépendantes responsables d'une inflammation, chez la femme en âge de reproduction, pouvant provoquer des dyspareunies profondes (douleurs ressenties lors d'un rapport sexuel), des dysménorrhées intenses (règles douloureuses), des troubles digestifs et/ou urinaires et une infertilité.

La prévalence est estimée à 10% des femmes en âge de procréer et à 1/3 des femmes de 16 à 50 ans souffrant de douleurs menstruelles aiguës. Cette maladie n'est pas mortelle cependant elle a un impact négatif sur la vie sociale de ces femmes car elle dure jusqu'à la ménopause définitive de la femme. Cette pathologie est multifactorielle et il n'est complexe d'étudier son évolution au sein même des patientes sans envisager des laparoscopies répétées. Même si actuellement aucun modèle animal disponible ne permet de reproduire à l'identique tous les aspects de la pathologie humaine, ces modèles expérimentaux représentent des étapes importantes dans la compréhension de la pathogenèse endométriosique (principalement de l'endométriose péritonéale) et dans le développement de nouvelles méthodes diagnostiques ou dans la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques.

Les modèles animaux sont fréquemment utilisés dans la recherche fondamentale sur l'endométriose. Ils permettent notamment de conduire des études les plus contrôlées possibles, en éliminant les facteurs confondants tels que l'âge, le statut hormonal ou le régime alimentaire des patientes, mais aussi les facteurs liés à leur environnement. Il existe aujourd'hui deux types de modèles d'endométrioses : un modèle hétérologue consistant en la greffe de tissus endométriotique de patients chez la souris immunodéprimée et un modèle homologue consistant en la greffe de tissu de rats chez le rat immunocompétent. C'est ce dernier modèle qui sera inclus dans le projet

Ainsi, l'objectif de ce projet est de mettre en place un modèle d'endométriose induit par la greffe de tissus endométriotique chez le rat. Ce modèle décrit dans la littérature est connu pour induire une douleur vaginale exacerbée et une diminution de la fertilité. Ainsi ce modèle, une fois mis en place, nous permettra d'évaluer l'effet de candidats médicaments.

Afin de répondre à cet objectif le nombre d'animaux utilisés sera de 1342 rats sur 5 ans en raison de 12 animaux par groupe (minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs), le nombre de groupe étant fonction du nombre de molécules et/ou doses à tester. Le détail du nombre d'animaux sera présenté pour chaque procédure.

Ce projet sera réalisé selon les exigences de la règle des 3-R :

Remplacement : Aujourd'hui, il n'existe pas de thérapie pharmacologique efficace pour traiter l'endométriose et aucun modèle in vitro ou ex vivo ne peut mimer la pathologie dans son ensemble et dans sa complexité.

Ces limitations rendent incontournables le recours à l'expérimentation animale pour tester l'efficacité de nouveaux candidats médicaments.

Réduction : Nous avons établi une stratégie d'expérimentation nous permettant dans la mesure du possible, de mesurer la valeur basale de chaque animal (l'animal est son propre contrôle). Cette stratégie permet donc de réduire sensiblement le nombre d'animaux par groupe.

Raffinement : En accord avec la règle de raffinement, les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale avec maintien de la température corporelle via l'utilisation de plaque chauffante thermo-régulée et un analgésique sera administré après l'intervention chirurgicale. Dès leur arrivée dans la zone d'exploration fonctionnelle, les animaux seront hébergés dans des conditions définies par la directive européenne 2010/63/UE à savoir 2 à 4 rats par cage d'hébergement et un enrichissement sera introduit dans l'hébergement des animaux. L'état des animaux sera suivi quotidiennement par du personnel compétent afin de s'assurer de leur bien-être et de l'absence de point limite à savoir prostration, perte de poids, présence de crampes

abdominale, présence de blessure, Après chaque intervention chirurgicale, une attention particulière sera apportée sur le réveil des animaux et l'absence d'agressivité vis-à-vis de ces congénères.

Si un animal présentait un point limite, il serait isolé et hydraté et mis en présence de nourriture dans la litière. Si son état ne s'améliorait pas dans les 48h, les expérimentateurs compétents excluraient l'animal de l'étude et l'euthanasieraient.

18005 CONTEXTE

L'adénocarcinome pancréatique fait partie des cancers les plus agressifs. Quel que soit le traitement, le taux de survie global à 5 ans est inférieur à 5%. Cette maladie est souvent diagnostiquée à un stade avancé et, par conséquent, seulement 15% à 20% des patients sont candidats à une résection chirurgicale. Environ 30% à 40% des patients ont une maladie métastatique au moment du diagnostic et dans ces cas, la survie est d'environ 9 mois. Les 30% à 40% restants des patients ont un cancer pancréatique localement avancé au moment du diagnostic, leur survie globale médiane est d'environ 1 an. Bien que de nouveaux protocoles de chimiothérapie entraînent une survie améliorée, le pronostic pour le cancer pancréatique localement avancé reste sombre et sans perspective de survie à long terme.

Il a été démontré dans un premier temps qu'il était possible de détruire du tissu pancréatique par un traitement par ultrasons focalisés à haute intensité (HIFU). Il a alors été observé que les HIFU appliqués au niveau de l'isthme du pancréas pouvaient entraîner l'obstruction de l'artère hépatique, ce qui n'est pas compatible avec une utilisation clinique de la technique en l'état. En effet, une occlusion artérielle serait en clinique une complication majeure non acceptable. Pour comprendre et contrôler ce phénomène, une nouvelle approche par imagerie Doppler a été envisagée. Une seconde phase a permis la validation d'un logiciel d'évaluation de l'évolution du flux artériel issu de l'information Doppler acquise au cours d'un traitement HIFU. Le seuil de traitement à ne pas dépasser pour éviter l'occlusion du vaisseau ayant été fixé empiriquement sur la base des données des précédentes procédures, il est important de le tester et de le relier à la création d'un rétrécissement de l'artère. L'innocuité du traitement et de la procédure ont été également montrés précédemment.

OBJECTIF

Le but est d'évaluer la pertinence de l'outil développé, c'est-à-dire observer qu'il n'y a pas d'occlusion de vaisseau en ne dépassant pas le seuil fixé et en observant une occlusion en le dépassant. Il sera également évalué qu'il n'y a pas d'effet cumulatif, qu'un traitement peut être réitéré sans engendrer de problème. L'objectif secondaire sera d'évaluer précisément les dommages liés à la lésion au niveau de l'artère et des tissus environnants.

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

Ce projet de recherche translationnelle d'une durée maximale de 1 an mettra en œuvre 8 porcs distribués en 2 groupes. Le modèle expérimental est représenté par l'artère hépatique commune de l'animal qui présente l'intérêt d'avoir une taille (5 mm de diamètre) sensiblement identique à l'artère mésentérique humaine qui sera incluse dans les protocoles de traitement clinique des tumeurs pancréatiques. Ce projet constitue une étape importante avant l'utilisation de la technique en clinique.

Au cours d'une procédure jugée modérée, les animaux subiront une laparotomie sous anesthésie générale, le traitement HIFU puis seront réveillés et maintenus sous observation pendant 2 jours, temps permettant d'évaluer les éventuels dommages de l'artère et seront ensuite mis à mort et autopsiés.

CONFORMITE AVEC LES 3R :

Réduction

4 animaux par groupe correspondent au nombre minimal pour montrer la fiabilité du logiciel d'évaluation du flux artériel.

Raffinement

La chirurgie est bien tolérée par les animaux car le protocole d'anesthésie et d'analgésie a été mis au point afin d'éviter toute souffrance. La chirurgie est effectuée par un chirurgien expérimenté. Le suivi est facilité par un scoring qui reflète l'état de l'animal et qui permet facilement de prendre la décision d'arrêt de la procédure pour l'animal. Enfin, la durée d'observation de l'animal a été réduite au minimum afin d'observer la lésion effectuée.

Remplacement

Les mises au point des techniques HIFU et Doppler ont été au préalable évaluées *in silico* et testées *ex vivo* ce qui a permis de repousser le passage à l'animal. Les organes non prélevés dans ce projet seront proposés à d'autres chercheurs pour la réalisation de test *ex vivo*.

18006 Ce projet vise à mieux comprendre l'effet protecteur des cellules régulatrices dans un modèle de sclérose en plaques (SEP) dans le but de proposer une nouvelle thérapie. La SEP est une maladie inflammatoire du système nerveux central (SNC). Elle est la première cause de déficit neurologique chez le jeune adulte (20-40 ans). Les femmes sont atteintes deux fois plus que les hommes, et le coût socio-économique de la SEP est second après les traumatismes dans ce groupe d'âge. Il n'y a actuellement pas de traitement curatif pour la SEP qui est donc une maladie chronique durant la vie du patient. Certains traitements permettent d'en ralentir la progression chez certains patients.

Le système immunitaire joue un rôle pathogène dans la SEP du fait de lymphocytes qui attaquent le SNC. L'activation de ces lymphocytes pathogènes est normalement empêchée par un autre type de cellules du système immunitaire appelées cellules T régulatrices (Tregs). Les Tregs sont déficitaires chez les patients atteints de SEP si bien qu'elles ne bloquent plus l'activation des lymphocytes qui causent la maladie. Il y a un grand espoir qu'il soit possible de traiter la SEP en transférant des Tregs protectrices chez ces patients. Des Tregs protectrices peuvent être produites en grand nombre en modifiant par transfert de gène des Tregs isolées du sang afin qu'elles expriment un récepteur à l'antigène (TCR) pertinent pour protéger contre cette maladie du SNC.

La SEP peut être modélisée chez la souris, et il a été montré dans un tel modèle que des Tregs modifiées de manière appropriée pouvaient protéger la souris receveuse de cette maladie quand ces Tregs étaient injectées avant l'activation des lymphocytes qui causent la maladie. Le but de ce projet est d'améliorer cette approche du point de vue de son efficacité et de sa sûreté afin de pouvoir l'appliquer avec succès après l'activation des lymphocytes qui causent la maladie, c'est à dire en contexte thérapeutique. Pour cela, nous étudierons comment les Tregs modifiées agissent au niveau moléculaire. Ainsi, nous déterminerons quelles molécules protectrices les Tregs expriment, puis nous testerons le rôle de ces molécules dans l'effet protecteur de ces Tregs. Nous testerons la possibilité d'augmenter le potentiel thérapeutique des Tregs en leur faisant exprimer des molécules inhibant les cellules immunitaires pathogènes et des molécules favorisant la réparation tissulaire au niveau du SNC. Enfin, nous testerons la possibilité d'améliorer l'effet de ces Tregs en utilisant de nouvelles approches pour optimiser leur préparation, ou bien en associant leur administration à celle de molécules immunosuppressives.

Ce travail sera effectué en utilisant un modèle pré-clinique de SEP chez la souris, qui a été validé pour sa valeur translationnelle, ayant permis le développement des nouveaux traitements aujourd'hui utilisés pour la SEP. L'induction de cette maladie modèle se fait par immunisation sous-cutanée avec de la myéline d'oligodendrocyte (MOG) et administration de toxine de pertussis par voie intrapéritonéale. Pour prendre en compte les 3R (réduction, remplacement, raffinement), les protocoles expérimentaux nécessaires pour ce projet ont été optimisés par des expériences *in vitro* en vue de remplacement de manière à réduire le nombre de souris nécessaires. L'approche de transfert de gène dans les Tregs permet une réduction du recours à des souris génétiquement modifiées. Le protocole d'induction de cette maladie modèle par immunisation a été l'objet de raffinement de manière à ce que les souris entrent en rémission rapidement après un court épisode clinique de manière à réduire la souffrance des souris. Le protocole d'induction de cette maladie modèle a de plus été raffiné de manière à ce que la maladie se développe de manière homogène chez des souris identiques génétiquement, ce qui permet une réduction du nombre de souris utilisées tout en permettant d'obtenir des résultats statistiquement valides. Les symptômes de la maladie modèle apparaissent environ à jour 11 après immunisation, et s'accompagnent d'une

paralyse ascendante pendant quelques jours, puis les souris entrent en rémission. Les souris sont examinées quotidiennement tout au cours de la maladie, et sacrifiées en cas de point limite atteint selon une échelle de score internationalement reconnue. Cette étude est prévue sur 5 ans et nécessitera un maximum de 924 souris. Le bénéfice attendu de ce projet est l'optimisation de thérapies cellulaires très ciblées permettant de guérir la SEP qui est actuellement traitée via des agents immunosuppresseurs non spécifiques.

18007 La greffe de moelle osseuse allogénique, c'est-à-dire réalisée avec un donneur volontaire sain de moelle osseuse ou de cellules souches mobilisées reste le seul traitement permettant d'obtenir la guérison dans les leucémies aiguës et certains cancers. L'effet anti-tumoral de la greffe est lié à la reconnaissance des cellules leucémiques ou cancéreuses du receveur par le système immunitaire du donneur qui déploie une attaque cellulaire dirigée contre les cellules malades du receveur reconnues comme étrangères et permet ainsi la guérison. Malheureusement, les cellules du système immunitaire du donneur sont incapables de faire la différence entre une cellule malade et une cellule saine qui porterait les mêmes caractéristiques immunologiques. L'attaque des cellules normales de certains organes du receveur est responsable de la maladie du greffon contre l'hôte (GVH pour « Graft-versus-Host » en anglais). Cette complication de la greffe de moelle osseuse se développe dans 50% des cas en moyenne et est à l'origine de dysfonctionnements d'organes sévères conduisant souvent au décès des patients. Il est donc urgent de trouver des stratégies qui permettraient de diminuer le risque de développer une GVH sans altérer l'effet anti-tumoral de la greffe.

Parmi les stratégies intéressantes l'injection de cellules régulatrices capables de diminuer la GVH, est la voie de recherche la plus prometteuse. Ainsi, les Cellules Souches Mésoenchymateuses (CSM) prélevées dans la moelle osseuse de donneur (CSM-MO) ont été rapportées comme potentiellement efficaces dans la littérature chez les patients atteints de GVH sévère. Cependant le recueil de CSM-MO nécessite un prélèvement de moelle osseuse sous anesthésie générale d'un donneur, avec un rendement d'autant plus faible que l'âge du donneur avance. La gelée de Wharton (tissu conjonctival du cordon ombilical) contient des CSM qui ont une plus grande capacité d'autorenouvellement, prélevable au décours de l'accouchement sans controverse éthique et constitue ainsi une source alternative de CSM. L'isolement des CSM à partir de la gelée de Wharton, et leur expansion selon les bonnes pratiques cliniques est maîtrisée par notre équipe. Ces CSM-GW ont été largement étudiées et possèdent les mêmes propriétés morphologiques, phénotypiques, immunogéniques et immunorégulatrices que les CSM-MO. Après avoir étudié et déterminé *in vitro* les mécanismes d'interaction des CSM-GW avec le système immunitaire, nous souhaitons maintenant analyser leur effet *in vivo* dans un modèle pré-clinique de GVH, par injection de greffons de cellules sanguines mononucléées humaines dans la souris. Ce modèle de xénogreffe est le modèle de référence dans la littérature pour toute étude pré-clinique de cellules humaines injectées comme thérapie cellulaires dans la greffe et ne peut donc être remplacé par un autre modèle. La souris utilisée appelée NSG pour NOD. Cg-Prkdcscid112rgtm1Wjl/SzJ ou dite NOD/SCID/Gamma-c KO est dépourvue de système immunitaire excepté quelques monocytes et macrophages. Elle est donc capable d'accepter un greffon de cellules sanguines humaines, et de développer une maladie de type « GVH ». Nous souhaitons suivre l'évolution de ces CSM-GW, leurs interactions avec l'immunité adaptative, leurs effets protecteurs vis-à-vis de la GVH et leur innocuité dans ce modèle pré-clinique. Les souris seront donc hébergées dans un environnement protégé, c'est à dire dans un portoir ventilé, cage avec capot et filtre HEPA®, alimentation irradiée et eau stérile. L'enrichissement du milieu sera assuré par du papier à l'intérieur de chaque cage, préalablement autoclavé, pour maintenir les conditions d'hygiène indispensable. Le projet d'étude *in vivo* permettra de

-Etudier les interactions des CSM-GW avec les cellules de l'immunité du greffon

-Etudier la biodispersion des CSM-GW après injection intra-veineuse

-Suivre cliniquement les souris receveuses avec un score clinique précis permettant de grader la sévérité de la GVH

-Vérifier l'inocuité des CSM-GW in vivo

Au total, nous avons élaboré notre projet selon la règle des 3 R: d'une part le modèle utilisé est indispensable pour valider l'étape pré-clinique à ce protocole qui se verra proposé à l'issus en thérapie cellulaire chez les patients allogreffés, d'autre part chaque expérimentation in vivo sera interrompue précocement dès qu'il s'agira de déterminer la biodistribution des CSM-GW et des interactions avec le système immunitaire pour ne pas attendre l'installation de la GVH ou dès qu'une significativité statistique sera obtenue entre les groupes. En effet, le projet estime après calcul "a priori" statistique de l'utilisation nécessaire minimale de 102 souris sur 5 ans. Pour limiter le temps d'observation des souris, certaines expérimentations seront arrêtées précocement en post-greffe avec mise à mort de la souris receveuse pour étudier précocement la régulation des cellules de l'immunité du greffon et les signes précurseurs histologiques de GVH. La méthodologie utilisée a défini les points limites pour tout le projet. Ces points limites seront : un score de GVH supérieur ou égal à trois, une évaluation de la douleur jugée sévère selon le "Mouse Grimace Scale" et une perte de poids supérieure ou égale à 20%. L'atteinte de ces points limites entraînera systématiquement une mise à mort par asphyxie au CO₂. Tout effet indésirable inattendu entraînera la mise à mort et l'arrêt de l'expérimentation. Aucune expérimentation ne sera poursuivie au-delà de 2 mois post-greffe.

18008 Le cancer du pancréas est une pathologie présentant un pronostic extrêmement sombre. Les chimiothérapies standards n'ont permis d'augmenter la survie des patients que d'un an. Malgré qu'un large éventail de thérapies ciblées (à base d'anticorps) ait été testé avec succès in vivo sur des modèles murins de cancer du pancréas, la translation en étude clinique s'est avérée très décevante. Et aucun modèle préclinique n'a permis de discriminer de manière rationnelle le bénéfice d'une thérapie ciblée sur une autre tout aussi prometteuse. Ces échecs ont mis en relief, l'inadéquation des modèles utilisés en étude préclinique et l'importance d'en développer de nouveaux. Nous souhaitons donc caractériser et développer de nouveaux modèles murins (PDX) sensibles ou résistants à la chimiothérapie que nous utiliserons pour tester des thérapies ciblées, jugées prometteuses. Notre institut a actuellement accès à 8 de ces modèles, en attente de caractérisation. Les thérapies ciblées testées contiendront des anticorps dirigés contre des récepteurs situés à la surface de cellules tumorales ou contre des protéines secrétées par les cellules entourant et soutenant la croissance de ces cellules tumorales. De nombreuses études ayant mis en évidence l'intérêt de viser simultanément plusieurs de ces cibles pour réduire la taille des tumeurs pancréatiques, nous aurons recours à des combinaisons d'anticorps monoclonaux (chacun ne reconnaissant qu'une seule cible), ou à des anticorps bispécifiques qui reconnaissent simultanément deux cibles. La caractérisation de différents modèles, permettra de sélectionner pour test préclinique la stratégie thérapeutique la plus prometteuse.

Le règle des trois R sera respectée en réalisant des tests in vitro qui nous permettrons de sélectionner les traitements les plus pertinents à tester chez les animaux et de réduire le nombre de souris. Les animaux utilisés feront l'objet d'une surveillance régulière et leur milieu sera enrichi à l'aide de litière mélangée à des copeaux, ainsi que de briques de peuplier.

Pour l'ensemble de ce projet, nous avons prévu un nombre de 560 souris sur une durée de 4 ans
Définition jugée utile : Les modèles PDX (« patient derived xenograft ») sont obtenus à partir de petits morceaux de tumeur provenant directement de patient, qui ont été greffés entre les épaules des souris.

Nous disposons de 7 anticorps monovalents et 12 anticorps bispécifiques. Nous prévoyons de tester in vivo UNE combinaison de 2 anticoprs monovalent et UN bispécifique sur la base des résultats qui seront obtenus in vitro (définissant le bispécifique le plus prometteur).

18009 Les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) tapissent le fond de l'œil juste derrière les photorécepteurs. Les fonctions de l'EPR sont nombreuses et toutes vitales pour la vision. Les photorécepteurs initient le signal visuel parvenant au cerveau dans un compartiment spécifique constitué de disques membranaires contenant les molécules photoréceptrices appelé segment externe de photorécepteur (SEP). Les SEP sont soumis à un fort stress oxydatif dû à leur exposition

constante aux rayons lumineux. Pour limiter le stress, les SEP sont renouvelés en permanence et leur partie distale la plus âgée relarguée selon un rythme circadien. Ces SEP sont phagocytés par les cellules d'EPR qui leur font face à raison d'environ 30 SEP par cellule d'EPR. Ainsi les cellules d'EPR représentent les plus importants phagocytes de l'organisme.

L'absence ou la dérégulation de la phagocytose rétinienne entraînent respectivement des pertes de vision précoces ou tardives telles les dystrophies bâtonnets-cônes (rétinite pigmentaire atypique) ou la dégénérescence maculaire liée à l'âge, principale cause de cécité chez les personnes de plus de 50 ans, et ceci dans différents modèles animaux ainsi que chez l'homme. Ces données soulignent l'importance de comprendre le fonctionnement de la phagocytose rétinienne, afin de pouvoir envisager des stratégies de traitements pour ces pathologies visuelles incurables à ce jour.

Les travaux du laboratoire visent à caractériser les mécanismes moléculaires régissant l'élimination quotidienne et rythmique des SEP. De nombreuses études ont permis de mettre en évidence des différences entre mécanismes *in vitro* et *in vivo*, notamment dus à l'interaction entre photorécepteurs et EPR et au rythme circadien de cette fonction, ceci nous obligeant à utiliser des modèles animaux. Les projets en cours cherchent à caractériser la régulation de l'activité des récepteurs que nous avons précédemment identifiés et leurs voies de signalisation associées. Pour cela nous utilisons divers modèles de rongeurs et allons créer des lignées tissu-spécifiques : souris (11 lignées) et rats (2 lignées). Sur la durée des 5 années du projet, nous estimons que nous allons utiliser en procédures expérimentales 3062 souris et 96 rats, soit 3158 animaux.

Le projet est conforme avec l'exigence de la règle des 3R:

- Remplacement : utilisation de lignées cellulaires et cultures primaires dans les phases de vérification des mécanismes moléculaires.
- Réduction : en fin d'expérimentation, nous prélevons les tissus des animaux suivis pour les études de vieillissement, afin de ne pas générer de cohortes supplémentaires. De plus, et quand cela est possible, un même animal pourra passer plusieurs analyses. Ainsi un maximum d'informations sera récupéré par animal pour en minimiser le nombre.
- Raffinement : l'estimation du nombre d'animaux requis pour nos études tiennent compte d'une rationalisation scientifique pour utiliser un nombre d'animaux juste tout en obtenant des résultats concluants, les tests statistiques utilisés dépendant du nombre de paramètres ou groupes comparés. Ainsi pour les comparaisons entre 2 conditions/groupes, le test t de Student est utilisé, avec une post-correction de Bonferroni quand nécessaire, alors qu'une ANOVA non-paramétrique avec post-test de Tukey est utilisée lorsque nous comparons plus de 2 paramètres. De plus, les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes misent en place dans les animaleries utilisées visent à réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux. En outre, et afin de limiter la souffrance animale, certains examens phénotypiques sont effectués en série sous la même anesthésie générale.

18010 L'immunociblage de tumeurs à l'aide d'anticorps monoclonaux est une option thérapeutique qui a émergé il y a une quinzaine d'année. Actuellement 30 anticorps médicaments sont sur le marché (dont la moitié sont utilisés dans le cancer), et 500 anticorps sont en essai clinique en oncologie thérapeutique. Notre laboratoire développe des anticorps thérapeutiques contre des cibles surexprimées dans de nombreux cancers. Nous nous intéressons particulièrement au cancer du pancréas pour lequel aucune thérapie efficace n'existe et aux cancers ovariens.

Notre projet porte sur l'étude d'anticorps thérapeutiques, ciblant les récepteurs de la famille HER ou anti-ligand impliqués dans le développement de nombreux cancers. Nos Anticorps sont tout d'abord validés *in vitro*, puis *in vivo*. Les souris immunodéficientes sont xénogreffées au niveau sous cutanées par des tumeurs humaines. Après quelques jours, les souris sont traitées avec l'anticorps testé. Le suivi de la croissance tumorale se fait par mesure de la tumeur au pied à coulisse ce qui permet d'évaluer l'efficacité du traitement.

La règle des trois R sera respectée en réalisant des tests *in vitro* qui nous permettrons de sélectionner les traitements les plus pertinents à tester chez les animaux et de réduire le nombre

de souris. Les animaux utilisés feront l'objet d'une surveillance régulière et leur milieu sera enrichi à l'aide de litière mélangée à des copeaux, ainsi que de briques de peuplier.

Avant toute expérimentation, les souris sont stabulées 1 semaine pour qu'elles s'habituent à leur nouvel hébergement. Les greffes en sous cutanée se font sur animaux vigiles. L'injection étant faite sur le flanc sous la peau, elle n'induit pas de douleur supérieure à celle fait par une piqûre soit niveau 0 (idem pour les injection intrapéritonéales lors des traitements).

Ensuite les souris sont surveillées et pesées tous les 2-3 jours afin de vérifier que la greffe ne prenne pas plus vite qu'attendu, que leur comportement est normal et de valider que nous n'atteignons pas un des points limites définis pour ce projet.

Des analgésiques (buprénorphine à 0.05mg/kg) et/ou des antalgiques ou antiinflammatoires (kétoprophène à 5mg/kg en s. c.) pourront être utilisés si nécessaire.

Pour l'évaluation de cancers d'origine humaine, il est indispensable d'utiliser des animaux immunodéprimés comme les souris athymic nude et la souris présente de nombreux modèles adaptés.

Pour l'ensemble du projet nous avons prévu 450 souris sur 4 ans.

18011 Ce projet explore, chez la souris, le rôle de la «formation réticulée» du cerveau postérieur dans la respiration et la motricité orofaciale notamment pendant la phase orale de l'alimentation (mastication, avalément). La formation réticulée contient un vaste ensemble de neurones parmi lesquels nous avons impliqué, (grâce à des travaux préliminaires qui ont permis l'obtention de fonds pour ce projet), trois ensembles de neurones définis par leur signature génétique: les neurones dérivés des progéniteurs neuronaux dits V0, exprimant le facteur de transcription Dbx1, impliqués dans la genèse du rythme respiratoire et sa transmission aux motoneurones du diaphragme ; et les interneurones exprimant le facteur de transcription Phox2b et Cited1, ou Phox2b et Atoh1, impliqués dans le contrôle de la musculature oropharyngée. Une première partie du projet détermine les connexions ces trois ensembles neuronaux par des techniques transgéniques ou à bases de virus neurotropes. La deuxième partie du projet explore la fonction des deux centres Phox2b+ dans la respiration et la phase orale de l'alimentation, par stimulation optogénétique sur animal adulte éveillé et fixé, accompagnée d'enregistrement de la respiration et des mouvements de la face, ainsi que par enregistrement optique de l'activité spontanée des neurones sur animal éveillé et fixé.

Pour ces expériences de physiologie intégrative des vertébrés (donc de l'homme), la souris est le modèle incontournable, notamment en raison des techniques génétiques établies chez cette espèce, qui permettent la manipulation ou l'enregistrement de classes définies de neurones. Comme il est détaillé plus bas dans la description des procédures, 212 souris sauvages ou transgéniques, portant 1, 2 ou 3 allèles mutés, seront requis pour l'expérimentation.

La «règle des 3R » sera appliquée de la façon suivante :

Le remplacement des souris est exclu par le fait qu'il s'agit d'un projet de physiologie intégrative sur contrôle cérébral d'un comportement complexe, un phénomène qui ne peut être examiné que chez un animal entier.

Les méthodes de réduction du nombre d'animaux utilisés sont multiples et sont l'objet d'un exercice quotidien. Les points clefs sont : i) une réunion hebdomadaire consacrée à la gestion des lignées transgéniques de l'équipe et à la planification des croisements, aussi bien pour la production d'animaux sur lesquels faire les expériences, que le maintien à minima des lignées. ii) Dans la planification des croisements, un optimum est constamment recherché entre l'accroissement des chances d'obtenir les animaux désirés et l'évitement d'une surproduction, cet optimum variant entre les expériences, leur degré d'urgence, ou leur coïncidence nécessaire avec d'autres expériences. iii) Comme les croisements donnent nécessairement naissance à des animaux d'un génotype non désiré, ceux-ci sont le plus souvent possible conservés pour, à leur tour être croisés dans des configurations différentes et produire des animaux du génotype désiré. iv) Les animaux produits pour des études anatomiques sont économisés en faisant systématiquement plusieurs séries de coupes de leur cerveau, distribuées sur des lames différentes, pour tester sur le même animal une batterie de sondes ou d'anticorps. v) Pour les expériences physiologiques, nous analysons chaque

expérience rapidement pour évaluer au fur-et-à-mesure de leur acquisition la nécessité d'en augmenter le nombre en fonction du succès des injections virales. Dès les critères de significativité atteints, nous pouvons ainsi y mettre un terme. iv) Le traitement statistique des données dépend des expériences réalisées, notamment du nombre de groupes comparés ainsi que du nombre d'animaux utilisés.

Les méthodes de raffinement de l'expérimentation incluent

: i) Les conditions d'hébergement et d'enrichissement dans l'animalerie centrale de mon institut qui respectent les règles en vigueur (température et humidité contrôlée, intensité et durée d'éclairage définie, cage ventilée, isolation phonique correcte, superficie de la cage, ajout de kraft pour la nidification, nourriture et eau ad libitum). ii) L'inconfort des souris sera réduit au maximum, les procédures étant bien établies et n'induisant ni douleur, ni angoisse ou stress. Les animaux sont manipulés par du personnel compétent. Les animaux feront l'objet d'une observation journalière par du personnel compétent et les anomalies de croissance postnatale (absence de lait dans l'estomac, un déficit de croissance visible), de prostration, d'absence de nid ou d'absence d'entretien du pelage conduiront à l'euthanasie des animaux.

18012 Les chèvres laitières au pâturage reçoivent toujours des compléments alimentaires, lorsque la surface en prairies est trop faible, pour rééquilibrer la ration si nécessaire (énergie/protéines/minéraux), ou bien pour accroître la densité énergétique de la ration et donc la production laitière. Les études sur la nutrition des chèvres à l'herbe sont très rares, notamment lorsque celles-ci ne reçoivent que de l'herbe à pâturer. Il est connu qu'apporter du concentré augmente la production de lait, mais on ne sait pas comment est régulée l'ingestion ni le comportement alimentaire des chèvres lorsqu'on apporte ce concentré. L'objectif de ce projet de recherches est de déterminer les effets de doses croissantes de concentrés sur l'ingestion d'herbe, la production de lait, la composition du lait et le comportement alimentaire des chèvres laitières au pâturage. Il sera réalisé sur 36 chèvres (3 lots de 12).

La règle des 3R a été bien prise en compte. Remplacer : cette étude ne peut être réalisée que sur des chèvres adultes en production, pour mesurer l'ensemble de leurs réponses, notamment pour l'ingestion et la production de lait. Réduire : le nombre de chèvres utilisées est réduit le plus possible, et ce nombre de chèvres est nécessaire pour avoir des lots de taille suffisante au pâturage (respecter leur comportement naturel de groupe), et mettre en évidence des potentiels effets significatifs des régimes alimentaires (puissance statistique suffisante). Raffiner : une attention particulière sera portée sur le bien-être des animaux (contrôle des performances, de l'état de santé général, des crottes), et toute indication de mal-être durable des animaux conduira à les sortir de l'expérimentation, en accord avec le vétérinaire.

18013 La mise en œuvre de pratiques expérimentales relevant de l'expérimentation animale fait partie intégrante de la formation de la spécialité Génie Biologique du Diplôme Universitaire de Technologie (DUT) dont le contenu est fixé au niveau national par le Programme Pédagogique National (PPN), publié par arrêté ministériel (arrêté du 3 août 2005). Ce programme a été entièrement revu en 2013. Dans ce contexte, le présent projet vise à pouvoir assurer dans son intégralité la formation de technicien supérieur en génie biologie. L'établissement demandeur propose cette formation depuis plus de 25 ans et les personnels impliqués se sont efforcés de le faire dans le respect des règles d'éthique relatives aux pratiques d'expérimentation animale. Le modèle rongeur (rats) est utilisé dans le cadre des enseignements pratiques. Sur 5 années d'activités, nous utiliserons (en considérant un effectif maximal de 14 étudiants par groupe) 1300 rats. Ces effectifs pourront être revus à la baisse si le nombre d'étudiants devait être réduit. La prolongation de ces activités se fera dans le respect de la nouvelle réglementation liée à la transposition de la directive 2010/63/UE. L'équipe pédagogique propose ici des protocoles de travaux pratiques pour étudier les grandes fonctions physiologiques (étude de la glycémie, du système cardio-vasculaire. . .) et souligne son engagement dans la poursuite de l'amélioration de ses pratiques et dans le respect de la règle des 3R. Ainsi, différentes méthodes alternatives sont déjà développées en toxicologie et pharmacologie afin de Remplacer autant que possible l'utilisation des animaux par des cultures in vitro. Dans le

même esprit, plusieurs séances d'apprentissage sont basées sur des méthodes *in silico* réalisées sur l'étudiant lui-même (Electromyographie, Electrocardiographie, pneumotachographie,...) à partir d'un système numérique de traitement de données expérimentales (Système BIOPAC). En complément, l'organisation en groupes ou binômes permettra de Réduire le nombre d'animaux nécessaires au travail d'apprentissage. Enfin, le bien-être des animaux sera respecté durant l'hébergement (hors procédures expérimentales) et tout au long des procédures expérimentales avec l'utilisation d'analgésiques et d'anesthésiques (Raffiner). Les protocoles d'anesthésie et d'euthanasie seront conformes à la réglementation en vigueur.

18014 L'objectif de ce projet vise à poursuivre une étude que nous avons lancée il y a quelques années pour évaluer les effets de la radiothérapie par rayonnement spatialement fractionnés sur les tissus à l'aide de la micro-tomographie à haute résolution. L'objectif principal est de visualiser et de quantifier les changements, après la radiothérapie, qui interviennent dans les tissus du cerveau et des poumons et dans leur réseau vasculaire, à différents stades du développement de la pathologie et/ou à différents moments après le traitement. Nous utiliserons une méthode d'imagerie innovante, qui permet d'analyser les tissus en générant des images 3D à fort contraste, avec des résolutions à l'échelle du micron. Nous réaliserons notre étude chez le rat. Diverses conditions d'irradiation seront mises en œuvre dans le cadre des traitements afin d'imiter différents cas thérapeutiques. Nous établirons la première base de données détaillée des effets de la radiothérapie sur les tissus tumoraux et normaux, ce qui permettra de mieux comprendre la morphologie de la tumeur ainsi que les modifications tissulaires induites par les radiations au niveau microscopique.

Ce projet de recherche s'inscrit parfaitement dans le cadre des efforts français et européens en matière de santé mondiale (i) pour accroître la capacité à surveiller, et donc à comprendre, les causes et les mécanismes qui sous-tendent la conservation ou la pathologie des tissus après traitement de radiothérapie, et (ii) pour améliorer la méthodologie de détection, de traitement et de gestion des maladies oncologiques.

Les résultats de l'étude proposée apporteront un nouvel éclairage sur les recherches en cours en matière de radiothérapie, dont le but est de trouver de nouvelles thérapies pour le traitement du cancer.

Les protocoles ont été conçus en suivant le principe des 3R « Remplacer, Réduire, Raffiner ». Le nombre de rats impliqués dans ces expériences est estimé à 708 ; ce nombre inclut l'analyse de rats sains, des rats porteurs de tumeurs, et des différents protocoles de radiothérapie.

- « Remplacer » : il convient de noter qu'il n'existe aucun moyen de remplacer ces études de radiothérapie, qui englobent l'ensemble de l'organisme dans sa réponse pathophysiologique, et que seules les expériences sur les animaux permettent un suivi complet de la maladie dès ses premiers stades.

- « Réduire » : nous avons prévu le nombre nécessaire et suffisant d'animaux pour conserver la puissance statistique lors du traitement des résultats et pour disposer d'un nombre suffisant de contrôles internes, afin de pouvoir tirer des conclusions quant aux effets secondaires et à l'efficacité du traitement. Nos groupes expérimentaux de rats se composent de 8 animaux du même âge et du même sexe afin d'obtenir des données homogènes (les groupes contrôles sont réduits à 5 animaux).

- « Raffiner » : un raffinement continu des pratiques expérimentales sera appliqué. Les animaux seront hébergés dans des cages standard, qui seront équipés d'enrichissements afin de réduire le stress, et recevront de la boisson/nourriture à volonté. Le maximum d'efforts sera déployé pour réduire la souffrance, la douleur et le stress de tous les animaux, tout au long de leur hébergement au sein de l'animalerie. Le suivi des animaux, et en particulier celui des animaux porteurs de tumeurs, sera effectué selon une grille d'évaluation permettant de définir un niveau de douleur/souffrance à partir duquel les animaux concernés seront euthanasiés. Toutes les procédures thérapeutiques seront réalisées sur des animaux sous anesthésie, l'imagerie ne sera réalisée qu'*ex-vivo*.

18015 Les sensations de douleur sont des symptômes communs dans la maladie de Parkinson, négativement associées avec la qualité de vie des patients, et ayant un impact plus fort que les symptômes moteurs. Ces symptômes restent cependant peu pris en compte cliniquement et leurs mécanismes sous-jacents sont peu étudiés et compris. Les symptômes douloureux peuvent être présents chez environ 85 % des patients. Différents types de symptômes de douleurs peuvent être distingués avec des douleurs :

- causées par des affections des os, articulations, muscles, tendons ou ligaments (musculosquelettiques, ~ 58.5%),
- déclenchées par une hyperpression sur une racine nerveuse, à l'intérieur ou à proximité de la colonne vertébrale (neuropathiques radiculaires, ~ 38 %),
- dues à une atteinte à n'importe quel niveau du système nerveux central (neuropathiques centrales ~ 8.5 - 27 %),
- induites par les mouvements anormaux tels que les dystonies (contractions involontaires des muscles) ou dyskinésies (mouvements anormaux involontaires) (~ 33.5 %).

Le seuil de douleur est également altéré chez les patients, présentant ou non des symptômes de douleur, la littérature reste cependant contradictoire concernant cette altération. Ces symptômes de douleurs sont donc un souci majeur dans la prise en charge de la maladie. Les douleurs neuropathiques centrales sont décrites par les patients comme des sensations douloureuses bizarres et sans cause apparente telles que des douleurs vives, des sensations de brûlures, des fourmillements ou irritations douloureuses. Ces symptômes prédominent du côté du corps le plus affecté par la maladie et ne sont pas reliés aux autres symptômes douloureux décrits précédemment. Les douleurs centrales et altérations des seuils de douleur dans la maladie de Parkinson, sur lesquelles portent ce projet, suggèrent que les circuits cérébraux permettant de percevoir et traiter les informations douloureuses pourraient être dysfonctionnels dans la maladie de Parkinson mais ces réseaux n'ont jamais été étudiés dans ce contexte. Ce projet a ainsi pour but d'approfondir nos connaissances sur l'état fonctionnel de ces réseaux dans des modèles animaux de la maladie de Parkinson et de tester une nouvelle hypothèse quand aux mécanismes sous-jacents à la mise en place de ces symptômes.

Le projet est composé de 4 procédures expérimentales et requerra l'utilisation d'un maximum de 218 rats au total sur 5 ans.

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

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

Remplacement : Ce projet a pour but de mesurer l'état fonctionnel d'un réseau de structures, en particulier leurs réponses sensorielles par des stimulations naturelles. De ce fait, il est impossible de remplacer notre préparation in vivo par un modèle cellulaire ou une simulation computationnelle.

18016 La greffe de moelle osseuse est le seul traitement permettant d'obtenir la guérison de certains cancers du sang (leucémies, lymphomes...). La greffe permet que le système immunitaire du donneur reconnaisse comme étrangères les cellules cancéreuses du receveur et ainsi les tue : c'est ce qu'on appelle l'effet anti-tumoral du greffon (ou GVT « greffon versus tumeur »). Toutefois, les cellules du système immunitaire du donneur sont incapables de faire la différence entre une cellule cancéreuse et une cellule saine du receveur. L'attaque des cellules saines du receveur par le système immunitaire du donneur s'appelle la maladie du greffon contre l'hôte (GVH pour « greffon versus tumeur »). Cette complication se développe chez 50% des patients greffés et elle est à l'origine de dysfonctionnements sévères d'organes pouvant conduire au décès des patients. Tous les médicaments développés pour contrôler la GVH diminuent l'effet GVT (et donc augmentent la rechute du cancer). La seule stratégie qui permettrait de moduler la GVH sans altérer l'effet GVT

est la thérapie cellulaire. La modulation du système immunitaire du donneur pourrait se faire en enrichissant ou en éliminant certaines cellules immunitaires régulatrices du donneur.

Les cellules myéloïdes suppressives (MDSCs) sont des candidates extrêmement intéressantes, puisqu'elles ont été décrites *in vitro* chez la souris comme capables de moduler le système immunitaire du donneur. Toutefois, le métabolisme de ces cellules varie très rapidement en fonction du contexte clinique dans lequel elles se trouvent (inflammation, maladie cancéreuse résiduelle, flore microbienne du tube digestif...). Envisagées comme thérapie cellulaire dans des modèles murins de GVH (avec des MDSC murines), elles pourraient rapidement perdre leur fonction et disparaître *in vivo*. Nous avons largement étudié les MDSCs humaines *in vitro*. Nous savons : les produire, les faire se multiplier, les moduler dans leur métabolisme, les inhiber dans leurs propriétés immunosuppressives et les dépléter. Nous souhaitons maintenant vérifier *in vivo* leur utilité et leur innocuité dans la greffe de moelle osseuse, avant de les proposer en tant que thérapie cellulaire en clinique. Le modèle murin utilisé est le seul mondialement reconnu et indispensable pour valider toute étude pré-clinique de thérapie cellulaire dans l'allogreffe de moelle osseuse : la souris NSG-S : NOD. Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl Tg(CMV-IL3,CSF2,KITLG)1Eav/MloySzJ. Ces souris, dépourvues de système immunitaire murin (excepté quelques mono-macrophages et quelques cellules dendritiques), et sécrétant des cytokines humaines, sont capables d'accepter des cellules sanguines normales et cancéreuses humaines. Aucun remplacement de cette étape pré-clinique n'est possible.

Ce projet a trois principaux objectifs, dont l'utilisation d'un modèle animal est indispensable, sans remplacement possible:

-Etudier la biodispersion des MDSCs en fonction du contexte clinique : combien de temps les MDSCs persistent après injection *in vivo*, où se localisent elles (dans le microenvironnement tumoral, dans les sites de GVH...)?

-Etudier les interactions des MDSCs vis-à-vis des cellules de l'immunité du donneur et des cellules leucémiques du receveur : est-ce que les MDSCs sont capables d'atténuer la réponse immunitaire du donneur (efficacité contre la GVH)? Ne risquent-elles pas de promouvoir la pousse de cellules leucémiques (innocuité vis-à-vis de l'effet GVT)?

-Enfin, observer l'impact pré-clinique de l'injection de MDSCs au moment de la greffe de moelle osseuse, sur la GVH et l'effet GVT.

Ce projet est donc construit autour de 3 grands types d'expérimentations. Les procédures utilisées sont : l'irradiation par une source de rayon X, l'injection intra-veineuse de cellules humaines, les prélèvements sanguins pour le suivi immunologique et le suivi par imagerie.

A noter, que pour les expérimentations de biodispersion, et de fonctionnalité/interaction *in vivo* des MDSCs avec le système immunitaire et les cellules leucémiques, les expérimentations seront de quelques jours et s'arrêteront au maximum 15 jours après la greffe, avant que l'installation des signes cliniques de GVH ne puisse se voir. En effet, nous savons que les cellules de l'immunité du donneur s'éduque, interagissent, communiquent dans son nouvel environnement receveur dans les 15 premiers jours qui suivent l'injection. Ce n'est qu'à partir de 15 jours après la greffe que le système immunitaire du donneur migre vers les organes cibles et donc que les premiers signes cliniques de GVH s'observent. Les points limites pour ce type d'expérimentation seront basés sur une observation quotidienne des souris avec une évaluation de la douleur jugée sévère selon le "Mouse Grimace Scale" et une perte de poids supérieure ou égale à 20% observée sur 2 jours consécutifs. L'atteinte de ces points limites ou tout effet indésirable inattendu entraînera systématiquement une mise à mort par asphyxie au CO₂.

Pour les expérimentations avec suivi clinique des souris greffées, le suivi clinique quotidien est de 2 mois maximum (incidence cumulée de GVH, score de GVH, progression tumorale). Les points limites sont : un score de GVH supérieur ou égal à trois, une évaluation de la douleur jugée sévère selon le "Mouse Grimace Scale" et une perte de poids supérieure ou égale à 20% observée sur 2 jours consécutifs. L'atteinte de ces points limites ou tout effet indésirable inattendu entraînera systématiquement une mise à mort par asphyxie au CO₂.

Raffinement : Toutes les souris seront observées quotidiennement en terme de respect du bien-être ; elles seront hébergées en portoir ventilé, cage avec capot et filtre HEPA® à 6 souris par cage de 500 cm², alimentation irradiée et eau stérile avec un enrichissement du milieu par du papier préalablement autoclavé à l'intérieur de chaque cage.

Réduction : Le projet estime après calcul "a priori" statistique de l'utilisation nécessaire maximale de 204 souris sur 3 ans. En effet, pour les expérimentations de biodispersion et de fonctionnalité/interaction des MDSCs avec son environnement, un minimum de 4 à 6 souris par groupe est nécessaire, avec une procédure qui peut se répéter 3 fois pour analyser la reproductibilité de l'effet de MDSCs produites à partir de 3 donneurs différents. Pour les expérimentations de suivi clinique, selon la littérature, il a été observé que l'administration de cellules régulatrices de la GVH, améliore de façon statistiquement significative l'incidence cumulée et la sévérité de la GVH lorsque les groupes contrôles et expérimentaux sont suffisamment dimensionnés (allant de 6 à 12 souris receveuses par groupe). L'expérimentation s'arrêtera dès l'obtention d'une différence significative entre les groupes (minimum 6 souris par groupe), et ne sera pas poursuivie en l'absence de différence statistiquement significative observée au-delà de 12 souris receveuses par groupe.

18017 La greffe de peau ou transplantation cutanée est l'utilisation d'un morceau de peau pour recouvrir une plaie, soit dans un but de cicatrisation par le tissu apporté, soit comme pansement. Suivant l'origine du greffon on parle de prélèvement autologue (fait sur le receveur lui-même) ou de prélèvement hétérologue (fait sur une autre personne que le receveur). La xénogreffe désigne la transplantation d'un greffon où le donneur est d'une espèce biologique différente de celle du receveur. Elle s'oppose ainsi à l'allogreffe où le greffon vient de la même espèce que le receveur.

Les substituts cutanés ou dermes artificiels, sont des biomatériaux capables de remplacer une partie de la peau et constituent une alternative précieuse pour la gestion des plaies lorsque les thérapies standards sont un échec. Cependant, sélectionner le bon substitut n'est pas une décision thérapeutique aisée. Aujourd'hui, si les greffes autologues sont les greffes de première intention pour la couverture des plaies, elles se heurtent à l'écueil d'une disponibilité limitée de peau, en particulier dans la prise en charge des grandes brûlures et les procédures restent invasives et douloureuses. Des allogreffes et des xénogreffes peuvent pourvoir au remplacement temporaire de la peau, avant de laisser la place à une autogreffe. Subsiste évidemment les risques de rejet, douleurs et infection, et la formation de cicatrices.

De nombreux substituts cutanés biosynthétiques sont aujourd'hui disponibles, constitués de cellules humaines vivantesensemencées sur une matrice et nourries de protéines et facteurs de croissance nécessaires pour mieux se développer et se multiplier dans le tissu souhaité. Ils sont utilisés pour traiter les plaies chroniques qui ne cicatrisent pas, les greffes de tissus mous chez les patients présentant des brûlures à épaisseur partielle, des plaies chirurgicales, ulcères du pied diabétique, ulcères veineux...

Il est donc important de tester de nouveaux substituts cutanés sur des modèles de plaies simples et chroniques représentatifs chez l'animal qui pourront être utilisés par la suite chez l'Homme et ainsi permettre d'améliorer la cicatrisation des plaies.

L'objectif de notre projet est donc d'évaluer différents substituts cutanés nouvellement développés afin de sélectionner celui ou ceux qui permettront de favoriser la régénération de tissu cutané, sur un modèle de plaie murin.

Ce projet sera divisé en 2 parties afin tout d'abord de définir les conditions expérimentales optimales et ensuite de tester différents substituts cutanés, nécessitant l'utilisation d'un total de 82 souris mâles Swiss Nude de 20-22 g. Nous utiliserons des souris Nude pour éviter les risques de rejet.

Pour la 1ère partie, nous utiliserons 16 souris avec 4 conditions expérimentales différentes (4 souris par condition) : sous anesthésie gazeuse, induction d'une plaie cutanée ou non par excision cutanée complète sur le milieu du dos (Procédure expérimentale 1), suivi de la greffe ou non d'un morceau de substitut cutané dans le lit de la plaie cutanée avec suture chirurgicale (Procédure expérimentale 2), puis collage d'un anneau en silicone autour de la région greffée pour éviter la contraction de la

plaie avant placement pendant 1 semaine d'une compresse au-dessus du greffon cutané, maintenu en place avec une bande de sparadrap (Procédure expérimentale 3). Les régions greffées ou non seront observées et photographiées chaque semaine pendant 2 semaines lors du change de pansement effectué 3 fois au cours de la première semaine, après placement des souris sous anesthésie, les souris n'étant plus anesthésiées au cours de la deuxième semaine de suivi, la région greffée étant directement observable, afin d'évaluer la survie et la tolérance du greffon cutané (Procédure expérimentale 4).

Pour la 2ème partie, nous utiliserons 66 souris, réparties en 3 groupes de 22 souris chacun, afin de tester 3 substituts cutanés nouvellement développés. Les conditions expérimentales comprendront les 4 mêmes procédures expérimentales que pour la 1ère partie. Pour chaque substitut cutané testé, les souris seront mises à mort à différents temps après réalisation de la greffe cutanée, 2 semaines, puis 1, 2, 3, 4, 5 et 6 mois, avec 3 souris greffées prélevées pour chaque temps, et 1 souris sans induction de plaie cutanée et sans greffe de substitut cutané prélevée au bout de 6 mois.

Pour les 2 parties expérimentales, l'ensemble des animaux sera mis à mort par injection intrapéritonéale d'une surdose d'euthanasique sous anesthésie gazeuse et un prélèvement cutané sera effectué au niveau de la zone de greffe cutanée pour la réalisation d'analyses biologiques (histologie, immunohistochimie et spectrométrie de masse) permettant d'évaluer les processus de régénération du tissu cutané au cours du temps (prolifération cellulaire, épithélialisation, vascularisation...).

Nous utiliserons le nombre minimum d'animaux nécessaire à la réalisation de ce projet mais permettant d'obtenir des résultats prédictifs et représentatifs (Réduction).

Les souris seront placées en cage individuelle (18. 9 x 29. 6 x 12. 8 cm) avec couvercle filtrant pour éviter qu'elles ne s'arrachent entre elles l'anneau en silicone, le greffon cutané, la compresse et la bande de sparadrap, en cycle de lumière inversé pour observer leur comportement pendant leur phase active et ainsi respecter leur horloge biologique (chronobiologie), et des bâtonnets d'ouate seront placés dans leur cage comme enrichissement pour assurer leur bien-être (Raffinement).

Les animaux seront observés quotidiennement tout au long de l'expérimentation, leur poids sera mesuré à chaque renouvellement de pansement ou 2 fois par semaine, et si une perte de poids supérieure à 20% par rapport au poids maximal est observée ou si des signes d'infection de la plaie ou des modifications du comportement des animaux sont observés (cachexie, vocalises, convulsions...), ceux-ci seront mis à mort dans des conditions éthiques.

Ce projet sera réalisé sur des animaux vivants car il n'est pas possible d'utiliser des modèles in vitro ou ex vivo pour évaluer la tolérance et l'efficacité de substituts cutanés sur des plaies cutanées chroniques (Remplacement).

18018 La douleur aiguë est un processus physiologique nécessaire à la survie. Lorsqu'elle devient chronique ou persistante, à la suite d'une inflammation ou d'une lésion nerveuse, la douleur n'offre plus aucun avantage mais provoque au contraire détresse et souffrance. Les traitements disponibles ne sont souvent que partiellement efficaces et peuvent s'accompagner d'effets secondaires importants. Récemment, notre connaissance de la douleur s'est considérablement accrue. Pourtant, aucune avancée thérapeutique majeure n'est intervenue. Une des raisons à cet échec est qu'il n'y a pas une mais des douleurs. En effet, les douleurs chroniques se manifestent par plusieurs symptômes : douleurs spontanées, continues ou paroxystiques, et douleurs provoquées par des stimulations normalement non douloureuses (allodynie) ou normalement déjà douloureuses (exagération de la douleur ou hyperalgésie). Chacun de ces symptômes dépend de mécanismes distincts. D'où la nécessité de traitements spécifiques pour chacun de ces symptômes. L'allodynie mécanique est le symptôme le plus fréquemment rencontré chez les patients douloureux chroniques. Comment le toucher devient-il douleur ? Normalement, ces sensations sont indépendantes. Les nerfs véhiculant les messages douloureux se terminent dans les couches superficielles de la corne dorsale, et ceux véhiculant les messages tactiles dans les couches profondes. Cependant, suite à une lésion nerveuse ou une inflammation périphérique, les

informations tactiles peuvent accéder aux neurones de la douleur des couches superficielles via un 'court-circuit' et provoquer ainsi une allodynie mécanique.

Les mécanismes et les fibres sensorielles responsables de l'allodynie mécanique sont peu connus. Nous avons récemment identifié des fibres non-peptidergiques C sensibles à l'isolectine B4 (fibres IB4) qui participent activement à l'expression de l'allodynie mécanique, avec un rôle sensiblement différent dans les douleurs céphaliques et extracéphaliques. Ces résultats suggèrent que les réseaux neuronaux mis en jeu lors de l'expression de ce symptôme diffèrent en fonction du territoire douloureux.

Ce projet qui s'étendra sur deux ans a pour objectif de caractériser la contribution des fibres afférentes nociceptives non peptidergiques de type IB4 dans la chronicisation des douleurs spinales et trigéminales.

Nous répondrons à deux questions principales :

1. Quel est le rôle des fibres IB4 dans la physiopathologie des douleurs inflammatoires, spinales et trigéminales, chez la souris ?
2. Si ces rôles sont différents, en quoi réside cette différence ?
 - a. Un phénotype différent des fibres IB4 spinales et trigéminales ?
 - b. Une connectivité différente des fibres IB4 spinales et trigéminales avec les neurones de 2ème ordre (excitateurs et/ou inhibiteurs) de la corne dorsale spinale ou du Sp5C, respectivement ?

Nous étudierons l'effet de l'ablation sélective des fibres C-IB4 sur la douleur inflammatoire. L'ablation des fibres IB4 sera induite par une injection intranerveuse de la toxine IB4-saporine (IB4-SAP) chez la souris. Cette procédure sera réalisée sous anesthésie générale. 3 semaines après l'injection, la sensibilité cutanée de l'animal (pression nécessaire entraînant un comportement d'évitement) sera évaluée à l'aide de filaments de calibres croissants appliqués au niveau de la peau. Une fois ce test réalisé, ces animaux recevront une injection sous-cutanée de formaldéhyde ou d'adjuvant complet de Freund (CFA) afin d'induire une douleur inflammatoire. Dans un premier groupe d'animaux, la sensibilité cutanée sera à nouveau évaluée afin d'évaluer l'effet de l'ablation des fibres IB4 sur la douleur d'origine inflammatoire. Un second groupe d'animaux permettra de déterminer les cibles neuronales centrales des fibres C-IB4 par immunohistochimie. Pour visualiser les synapses impliquant les fibres C-IB4 au niveau de la corne dorsale, nous utiliserons plusieurs vecteurs viraux fluorescents injectés dans la corne dorsale de souris transgéniques. Ces expérimentations seront réalisées soit au niveau de la patte, soit au niveau de la face, afin d'évaluer l'implication des fibres IB4 dans les douleurs céphaliques et extracéphaliques. Les groupes d'animaux décrits ici sont représentés dans le document annexe.

Pour ce projet, l'expérimentation sur des animaux est nécessaire. Aucune méthode alternative n'existe pour prévenir l'utilisation d'animaux dans ce protocole : en effet, l'expression du toucher ou de la douleur fait intervenir de nombreux circuits neuronaux, pour la plupart largement méconnus, qui ne peuvent être reproduits artificiellement. D'autre part, le projet nécessite l'utilisation de lignées de souris transgéniques afin de pouvoir marquer des populations de neurones d'intérêt. Afin de respecter la règle des 3R, le nombre d'animaux par groupe est réduit au maximum tout en permettant de discriminer un effet significatif entre les conditions expérimentales et calculé par tests statistiques adaptés en fonction de la technique utilisée. Au total 130 souris adultes (nombre équivalent mâles/femelles) seront utilisées dans ce projet (descriptif des groupes indiqué en annexe). Lorsque cela sera expérimentalement possible et dans le maintien de la règle des 3R « réduire », nous utiliserons les mêmes animaux pour les mises aux points techniques des différentes procédures. Pour chaque animal ayant reçu une injection d'IB4-SAP, la quantité de fibres détruites sera analysée post-mortem. Par conséquent, l'euthanasie de l'animal est nécessaire. Les modèles inflammatoires seront induits par l'injection sous-cutanée de formaldéhyde ou de CFA. Ces modèles sont couramment utilisés au cours de recherches sur les mécanismes de la douleur d'origine inflammatoire et maîtrisés par le laboratoire.

Ce projet porte sur la douleur. Par conséquent, l'utilisation d'antalgiques est limitée. Néanmoins, afin de respecter la règle des 3R « raffiner », les procédures chirurgicales non-liées à l'établissement d'un modèle de douleur seront associées à un traitement antalgique pré- et post-opératoire. De

plus, tous les animaux seront hébergés en milieu enrichi (social et environnemental) afin de respecter au mieux leur confort et leur niveau de stress. Aucun des modèles de douleurs décrits dans ce projet n'induit de déficit locomoteur sévère pouvant influencer sur les besoins physiologiques de l'animal. De plus, l'expérimentation sera arrêtée si l'animal montre une perte de poids supérieure à 25% suite à un traitement. Enfin, les tests comportementaux à la douleur seront réduits au minimum (fréquence et intensité des tests) et réalisés selon des protocoles expérimentaux établis et acceptés par la communauté scientifique.

18019 En France, environ 1780 nouveaux cas de cancers pédiatriques sont diagnostiqués chaque année. Ces enfants vont subir des traitements potentiellement stérilisants. En effet les traitements de chimio- et radiothérapies ont une toxicité connue sur les cellules germinales souches.

Chez les hommes pubères, il est possible de préserver la fertilité par congélation de spermatozoïdes afin de les utiliser ultérieurement en assistance médicale à la procréation. Pour les garçons pré-pubères ne produisant pas de spermatozoïdes, une procédure de congélation du tissu testiculaire peut être envisagée avant traitement pour allo ou autogreffe. Ce tissu testiculaire pré-pubère, dont les cellules germinales sont présentes uniquement au stade spermatogonies, pourra être décongelé en vue de produire des spermatozoïdes soit par spermatogenèse in vitro, soit par greffe de tissu testiculaire ou transplantation de cellules germinales chez les patients guéris mais devenus stériles. La greffe tissulaire pouvant entraîner la réintroduction de cellules cancéreuses, l'approche de maturation in vitro est la meilleure indication pour restaurer la fertilité de ces patients.

La mise en place de différents protocoles de congélation (congélation lente contrôlée et vitrification sur surface solide) du tissu testiculaire pré-pubère chez la souris a montré la possibilité d'obtenir une spermatogenèse complète in vitro à partir de tissu testiculaire frais et décongelé. La spermatogenèse in vitro par culture organotypique en interphase gaz-liquide permet de produire des spermatozoïdes féconds dont la qualité nucléaire est comparable à celle observée in vivo.

Le modèle rat, dont la durée de la spermatogenèse est plus proche de celle de l'homme (74 jours chez l'homme, 53 jours chez le rat et 35 jours chez la souris), est un modèle pertinent pour l'optimisation du modèle de culture organotypique à long-terme. Pour le moment, une spermatogenèse in vitro à partir de tissu testiculaire de rat pré-pubère ou d'enfant n'a pas encore été obtenue. Avant d'envisager une application clinique, il apparaît donc indispensable de mettre en place, chez divers modèles animaux, une méthode de culture permettant l'obtention de spermatozoïdes fonctionnels.

Au cours de ce projet, nous évaluerons l'impact de différentes conditions et milieux de culture sur l'avancée de la spermatogenèse et les différences moléculaires entre du tissu cultivé et du tissu de rats sain afin d'optimiser et améliorer la qualité des cellules produites. Des tentatives de restauration de la fertilité de ces tissus seront réalisées à partir des résultats obtenus précédemment.

Notre projet se déroulera dans le respect des 3R : nous veillerons à limiter le stress et assurer le bien-être des animaux en optimisant les conditions d'hébergement par la présence d'enrichissement dans les cages et en laissant les bébés rats auprès de leur mère afin de ne pas perturber leur développement. Nous réduirons à son minimum le nombre de rats utilisés pour chaque procédure, tout en ayant des résultats significatifs. Au cours de cette étude, 693 rats seront utilisés.

18020 Le glioblastome, tumeur cérébrale gliale de grade élevé, a une incidence de 3 nouveaux cas par an pour 100 000 habitants avec une fréquence plus importante entre 45 et 70 ans. Conventionnellement, ces tumeurs sont traitées par la neurochirurgie puis par radiothérapie avec chimiothérapie. Malgré les bénéfices apportés par la radiothérapie qui reste le traitement de référence, la survie médiane des patients atteints de glioblastome est inférieure à un an, le plus souvent due à une récurrence à l'intérieur même du volume irradié. L'échec des traitements actuels impose donc de développer de nouvelles stratégies de thérapie comme la thérapie génique. Celle-ci, dont le premier traitement a été approuvé par les autorités européennes, est une stratégie thérapeutique consistant, entre autre, à transférer et faire exprimer un gène d'intérêt (appelé gène

thérapeutique) dans une cellule afin de traiter une maladie. Ce principe requiert un contrôle fin de l'expression du transgène afin d'éviter l'apparition d'effets secondaires liés à une expression excessive de la protéine thérapeutique. Or les systèmes de régulation actuellement disponibles n'ont jamais pu être transférés vers une application clinique pour des raisons soit de toxicité liée à l'inducteur du transgène ou de difficulté à réguler finement son expression.

D'autre part, le domaine de l'oncologie voit depuis plusieurs années un essor important d'une nouvelle classe thérapeutique : l'immunothérapie anti-tumorale. En effet, il est maintenant clairement établi que le système immunitaire a un rôle important dans le contrôle du développement d'une tumeur maligne, et les stratégies d'immunothérapie anti-tumorale ont ainsi pour but de stimuler l'action du système immunitaire et d'inhiber les mécanismes d'immunosuppression mis en place par la tumeur. Parmi ces stratégies, certaines sont dites adoptives, ou « cellulaires », et consistent à injecter au patient des cellules.

Un exemple de thérapie cellulaire est celui de l'allogreffe de Cellules Souches Hématopoïétiques (allo-CSH), qui est certes utilisé depuis plusieurs décennies, mais qui reste à ce jour le seul traitement curatif pour de nombreuses hémopathies malignes, en particulier pour les leucémies aiguës. Mais cette thérapeutique s'accompagne de complications telles que la réaction du greffon contre l'hôte (GvH, Graft versus Host disease) et les infections qui limitent les indications de stratégies curatives. Ces complications représentent une cause majeure de morbi-mortalité, de mauvaise qualité de vie et un surcoût économique, du fait notamment des thérapeutiques onéreuses pour les traiter et de la majoration du temps d'hospitalisation des patients. Certes toxique, la GvH est pourtant nécessaire car sa présence est associée à une meilleure efficacité anti-tumorale (effet GvL, Graft versus Leukemia). En effet, la GvH correspond schématiquement à la reconnaissance des cellules normales du receveur comme étant étrangères par les lymphocytes T du greffon, ce qui engendre une forte réponse inflammatoire et le recrutement de lymphocytes T cytotoxiques et ainsi des dommages tissulaires parfois sévères. Les recherches pour améliorer les résultats de l'allo-CSH se poursuivent, et le développement d'un système de régulation souple et facilement réversible qui permettrait de moduler l'activité de ces cellules immunitaires apparaît donc être d'intérêt majeur. En effet, un tel système pourrait permettre de mieux contrôler l'activité des cellules allogéniques après administration au malade, en majorant leur activation ou en limitant leur toxicité sans inhiber leur efficacité anti-tumorale.

L'équipe a récemment développé un système de régulation génique (appelé AARE-gène) qui permet de réguler l'expression d'un gène thérapeutique via la nutrition. L'utilisation de ce système afin de réguler l'expression d'un gène tueur de tumeurs a permis d'en valider l'efficacité sur des cellules de gliomes humains. Désormais ce projet consiste à étudier le potentiel de ce nouveau système sur (1) la souris Nude porteuse de xénogreffes tumorales (lignées de glioblastome humain), (2) sur un modèle de tumeur induite par un agent carcinogène hépatique, (3) dans des lymphocytes T (LT) humains transduits avec un vecteur lentiviral comprenant le transgène d'intérêt puis réinjectés à des souris immunodéficientes NSG (NOD-scid IL-2R γ null), tout ceci afin de valider notre système dans plusieurs types de cancer. Ce protocole vise à réaliser la preuve de concept sur modèle in vivo du système AARE-Gène et ainsi d'apporter un nouvel élément de régulation de l'expression génique en thérapie génique. Etant donné que l'efficacité du système AARE-Gène a été préalablement validée en cellules en culture, il n'existe pas à ce stade du projet, de solution alternative à l'expérimentation animale.

Ce projet sera réalisé selon la réglementation 2010/63/UE et selon la règle des 3rs (Réduction, Remplacement, Raffinement). Le nombre d'animaux (au total 336) utilisés pour démontrer l'intérêt d'utiliser le système AARE-Gène dans le domaine du cancer est calculé, pour chaque expérience, au minimum en fonction du test statistique retenu (Réduction). Pour chaque expérience, des points limites (perte de poids, consommation. . .) seront définis et des groupes "contrôle" adaptés au protocole seront constitués avec un nombre d'animaux suffisant statistiquement (Raffinement). Ces expériences vont permettre de valider des résultats déjà obtenus in vitro et sont nécessaires pour évaluer l'impact de différents régimes testés sur l'organisme entier (Remplacement).

18021 Le cervelet est une structure cérébrale impliquée dans de nombreuses fonctions motrices mais aussi cognitives le principal neurone étant la cellule de Purkinje. La perte de ces neurones entraîne un syndrome cérébelleux, associé à diverses pathologies, des maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson ou la sclérose en plaques. Les cellules gliales jouent un rôle primordial dans le maintien du bon fonctionnement cérébelleux et les cellules gliales de Bergmann sont très liées aux cellules de Purkinje. Parmi les cellules gliales du cervelet, les cellules de Fananas sont une variété décrite en 1916 mais elles ont été peu étudiées depuis, leur rôle dans le cortex cérébelleux est inconnu. Une méthode de détection de ces cellules utilisant des anticorps spécifiques a été décrite. Nous voulons poursuivre l'étude de ces cellules, en utilisant des méthodes d'immunohistologie et ainsi mieux les caractériser. Nous voulons observer ces cellules au cours du développement et ainsi déterminer les périodes optimales pour les étudier, réaliser des doubles marquages pour bien les distinguer des autres cellules gliales du cervelet. Ce projet est nécessaire afin de bien caractériser la localisation et l'expression de ces cellules au cours de la vie des souris dans un premier temps, afin de permettre l'étude de ces cellules d'un point de vue fonctionnel dans un deuxième temps.

Réduire : Pour ces expériences un nombre maximal de 102 souris sera utilisé, réduisant ainsi au minimum le nombre d'animaux utilisés pour les expériences. Un tel effectif est nécessaire afin de disposer de données suffisantes pour permettre de faire des statistiques cohérentes sur nos diverses expériences

Remplacer : Nous utiliserons une technique existante et nous voulons déterminer les périodes optimales pour l'observation de ces cellules.

Raffiner : Les conditions d'hébergement des animaux sont aux normes dans nos locaux et un enrichissement est présent dans les cages ce qui met les animaux dans des conditions de vies optimales. Ainsi pour les expériences sur des animaux les plus âgés ces conditions devraient permettre de n'induire aucun biais liés à l'hébergement.

Le peu de connaissance actuelle sur ces cellules a été obtenus in vivo et il manque actuellement de marqueurs précis afin de mieux les caractériser au sein du tissu cérébelleux, la souris est un modèle idéal pour cela.

18022 Le but de ce projet est de tester in vivo dans un modèle murin l'innocuité et l'efficacité de nouveaux protocoles thérapeutiques pour des déficits immunitaires sévères (DIS). Les DIS sont des pathologies très graves qui touchent les globules blancs (lymphocytes T, granulocytes), des cellules du sang indispensables à la lutte contre les agents infectieux. Ces déficits peuvent être dus soit à une mutation dans un gène indispensable au développement ou à la fonction des globules blancs (dans ce cas, la population touchée est constituée d'enfants ou de jeunes adultes), soit à la chimiothérapie pour traiter des leucémies par exemple. Ce cas peut toucher aussi bien les enfants que les adultes.

Pour toutes ces pathologies, la greffe de moelle osseuse provenant d'un donneur sain est une option thérapeutique largement utilisée, mais la survie après greffe est très hétérogène et peut être inférieure à 30%. De nouvelles approches thérapeutiques doivent donc être absolument développées pour augmenter la survie de patients greffés. Notre objectif est d'explorer l'efficacité de trois nouveaux traitements de thérapie cellulaire (injection de progéniteurs de lymphocytes T), et de thérapie génique (injection de cellules de moelle osseuse ou de progéniteurs T génétiquement modifiés).

L'efficacité de ces approches innovantes doit absolument être validée in vivo car cette étape est exigée par l'Agence Nationale de la Santé et du Médicament avant tout essai clinique chez l'homme. Il existe un modèle de souris transgénique immunodéficiente ayant un phénotype non dommageable et qui tolère la greffe de cellules humaines. Selon l'âge des souris receveuses, les cellules humaines seront injectées en intra-veineuse ou en intrahépatique et la reconstitution immunitaire sera suivie par des prélèvements sanguins et /ou des prélèvements des organes lymphoïdes après euthanasie.

Pour respecter la règle des 3R, chaque approche thérapeutique sera préalablement validée in vitro et le nombre d'animaux sera réduit à 680 au maximum (324 animaux âgés de 4 à 8 semaines et 356 nouveau-nés de moins de 4 jours) pendant toute la durée du projet (5 ans). Toutes les manipulations induisant de la douleur chez l'animal ainsi que l'euthanasie seront précédées par une anesthésie générale. Nous avons également établi des points-limites entraînant la prise d'antidouleurs ou la mise à mort anticipée des animaux si nécessaire. Tout au long de l'étude, les animaux seront hébergés dans un environnement enrichi, exempt d'organisme pathogène avec une nourriture et une eau stérile.

Les résultats de ces expériences nous permettront de compléter les dossiers réglementaires pour les futurs essais cliniques de thérapie génique et/ou de thérapie cellulaire pour les patients atteints de DIS.

18023 L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre d'une prestation contractuelle pour le compte d'un client qui développe des composés thérapeutiques visant les troubles liés au vieillissement. Les troubles liés au vieillissement (troubles neurodégénératifs, sarcopénie. . .) ont été largement associés aux processus d'autophagie et de mitophagie (processus de recyclage des mitochondries endommagées au sein des cellules) dans différents organes. Ces mécanismes représentent ainsi une cible d'intérêt thérapeutique majeur dans la lutte contre les effets du vieillissement. La société cliente souhaite ainsi tester l'impact de 5 composés en développement sur les phénomènes de mitophagie au niveau de différents organes dans un contexte d'administration chronique in vivo.

Les 5 composés seront administrés par voie orale à trois doses différentes pendant 15 jours et comparés à une administration orale de véhicule pendant la même durée. La prise alimentaire et le poids corporel des animaux sera mesurée une fois par semaine. A l'issue du traitement, les animaux seront anesthésiés et mis à mort. Différents tissus et organes seront alors prélevés pour mesure du processus d'autophagie : sang, muscles squelettiques (quadriceps, gastrocnémien et soleus), cerveau, cœur et rein.

Cette étude nécessitera l'utilisation de 160 souris C57Bl/6J divisés en 16 groupes expérimentaux (5 composés x 3 doses = 15 groupes + 1 groupe contrôle) de 10 animaux.

La règle des 3Rs a été prise en compte dans l'élaboration du présent protocole:

- Raffinement: Le protocole a été planifié de façon à limiter au maximum tout stress et tout inconfort pour les animaux. Les animaux seront hébergés par 2 ou 3 en cages ventilées et un enrichissement du milieu sera assuré par l'ajout de maisons dôme et de briquettes en bois spécialement conçues pour les rongeurs. L'ensemble des prélèvements terminaux seront réalisés en post-mortem. Par ailleurs, bien que le protocole soit très peu invasif, un suivi journalier des animaux permettra une action rapide en cas d'atteinte des points limites établis. Ces actions incluent l'emploi d'analgésiques ou le retrait de l'animal du protocole expérimental.

- Réduction: Le nombre d'animaux utilisés par groupe (n=10) a été défini comme le nombre minimum nécessaire pour être en mesure de mettre en évidence une différence statistiquement significative sur les paramètres étudiés.

- Remplacement: Des études préliminaires in vitro et ex-vitro ont été réalisées par le client à partir d'une famille de molécules afin de définir les 5 composés ayant les plus fortes chances de succès en termes de développement. L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie à ce stade afin de s'assurer de l'efficacité réelle d'un composé sur la mitophagie dans différents organes lors d'une administration in vivo.

18024 Les lymphomes sont des proliférations malignes de lymphocytes, l'un des types de cellules qui constitue le système immunitaire. Ils se développent principalement dans les organes lymphoïdes tels que les ganglions ou la rate mais on peut aussi les trouver dans d'autres organes (peau, cerveau...). Ils constituent environ la moitié des hémopathies malignes et sont classifiés en deux groupes : les lymphomes Hodgkiniens et les non-Hodgkiniens. Parmi ces derniers on trouve les lymphomes diffus à grandes cellules B (DLBCL), les lymphomes folliculaires (FL) et les lymphomes

de Burkitt (LB) qui constituent notre modèle d'étude. Le traitement conventionnel du LB repose sur une chimiothérapie intensive de quelques mois (cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine, prédnisone). Si le traitement est bien toléré, le taux de guérison est de l'ordre de 90 % chez les enfants et il se situe autour de 70% chez les adultes. Malheureusement, en cas de rechute, que ce soit chez les enfants ou les adultes, le pronostic est très sombre. La nécessité de développer de nouveaux traitements qui permettraient de baisser les doses de chimiothérapie et offriraient de nouveaux espoirs aux patients qui rechutent est donc grande.

Une des cibles thérapeutiques qui fait aujourd'hui l'objet de nombreuses recherches est une famille de protéines qui est impliquée dans la résistance des cellules tumorales aux traitements conventionnels (chimiothérapie, radiothérapie). En effet, les protéines de cette famille (dite « famille de BCL-2 »), souvent surexprimées dans les cellules tumorales, ont la propriété d'empêcher les cellules de mourir. La nouvelle stratégie thérapeutique consiste donc à développer des inhibiteurs de cette famille de BCL-2 déclenchant ainsi la mort de la cellule tumorale. Dans le cas des cellules de LB, diverses études ayant montré qu'elles surexprimaient l'une de ces protéines (appelée MCL-1), nous avons développé un nouvel inhibiteur de MCL-1. Les résultats des tests effectués sur des cellules en culture montrent que ce composé a la capacité de tuer les cellules de LB mais pas les lymphocytes normaux. Nous souhaitons donc à présent étudier l'effet de ce composé, seul ou en combinaison avec des agents de chimiothérapie (cyclophosphamide, doxorubicine) à faible dose, sur des modèles de souris greffées avec des cellules de LB.

En effet, la cardiotoxicité de la doxorubicine est très documentée et le cyclophosphamide a des effets indésirables notamment sur les cellules du sang (neutropénie, thrombopénie). Il est indispensable de vérifier l'efficacité et l'absence de toxicité des différentes combinaisons sur l'organisme entier. Il n'existe pas de modèle alternatif pour évaluer ces paramètres.

Pour cela, nous utiliserons des souris immunodéficientes qui permettent l'implantation de tumeurs humaines. De manière à assurer le bien-être des animaux tout au long de l'étude, nous prendrons les dispositions nécessaires en vue de réduire et d'éviter toute forme de souffrance à l'aide de complément alimentaire et de traitement anti-douleur adaptés. Toutes les interventions et administrations se feront sous anesthésie générale ou locale. Les points limites établis seront strictement appliqués. L'hébergement des animaux se fera dans des conditions optimales avec enrichissement du milieu et un suivi quotidien.

Nous déterminerons le schéma expérimental de notre composé en testant deux doses. Des études réalisées dans le cadre d'autres projets nous ont déjà permis de déterminer la dose minimale efficace pour le cyclophosphamide et pour la doxorubicine. En fonction des résultats obtenus nous combinerons, dans un premier temps, la doxorubicine avec notre composé pour obtenir une inhibition de la croissance tumorale tout en minimisant les effets secondaires liés à la chimiothérapie. Si les résultats sont convaincants, notre projet d'arrêtera. Sinon, nous combinerons notre composé avec le cyclophosphamide, autre molécule utilisée en chimiothérapie de première intention. Le nombre d'animaux a été réduit au minimum et déterminé grâce à une étude statistique permettant une interprétation précise et significative des résultats obtenus. Nous utiliserons au maximum un nombre total de 251 souris. Les techniques de greffe ont été standardisées pour améliorer la reproductibilité des résultats. Les animaux seront surveillés tous les jours et pesés très régulièrement. Les animaux recevront des compléments alimentaires (DietGel Recovery en cas de problème d'alimentation), et médicaments anti douleurs si nécessaire. Si un signe de douleur est observé (prostration, agressivité), un anti-douleur type AINS pourra être administré et un enrichissement supplémentaire ou différent pourra être ajouté dans la cage.

18025 L'arthrose touche plus de 70% des sujets âgés de plus de 70 ans. Cette pathologie touche les articulations dans leur ensemble : dégradation du cartilage, inflammation de la membrane synoviale et formations osseuses anormales. Actuellement il n'existe que des traitements palliatifs de la douleur, mais aucune thérapie ne permet encore de restaurer des fonctions articulaires normales ni même de bloquer le processus arthrosique. L'arthrose étant notre principale source d'intérêt scientifique, il n'en demeure pas moins qu'il existe à ce jour plusieurs autres pathologies ostéo-articulaires au moins aussi complexes qui ne connaissent elles non plus aucun traitement. La

thérapie génique, stratégie innovante qui permet le transfert d'acides nucléiques clés aux cellules atteintes afin de restaurer un phénotype cellulaire sain, semblerait être une piste pertinente pour le traitement de différentes maladies ostéo-articulaires. Parmi les vecteurs disponibles, les virus adéno-associés recombinants (AAVr) constituent un outil de choix. Pour autant, l'articulation présente deux principaux obstacles à l'utilisation d'AAVr : l'accessibilité des cellules du cartilage, et la neutralisation des virus par le liquide synovial. De manière à potentialiser cette stratégie, l'utilisation d'AAVr de différents sérotypes et dont la capsid sera modifiée chimiquement sera éprouvée. Les modifications chimiques induisent une modulation des propriétés physico-chimiques de l'AAVr permettant ainsi une amélioration potentielle de leur infectiosité vis-à-vis de cellules enchâssées dans une matrice extracellulaire dense mais également un masquage de l'AAVr pour éviter le déclenchement de réponses du système immunitaire. Des premiers tests seront effectués sur différents types de cellules en culture pour évaluer l'effet de la modification chimique sur le vecteur et l'efficacité de transduction de ces différents sérotypes in vitro. Cependant, les modèles in vitro ne peuvent s'approcher de la complexité des interactions entre le vecteur et l'environnement biologique in vivo et rendent donc difficile la reproductibilité de ces résultats in vivo. Il est également impossible de vérifier la bio distribution ou encore l'index thérapeutique de ces particules modifiées sur des cellules en culture. L'utilisation de la souris est donc ici justifiée pour évaluer ces deux paramètres in vivo.

La procédure expérimentale n°1 a pour objectif de comparer, le tropisme, l'efficacité de transduction ainsi que la neutralisation de différents sérotypes d'AAVr dans les différents tissus de l'articulation par des techniques histologiques et moléculaires (RT-qPCR). L'apport des modifications chimiques sera évalué dans le but d'observer s'il engendre une modification du tropisme, de l'efficacité de transduction et/ou de la neutralisation. L'injection intra articulaire d'AAVr modifiés ou non permettra de choisir le vecteur présentant les meilleures caractéristiques, à savoir, un tropisme spécifique à l'articulation et une moindre neutralisation. Les résultats obtenus permettront de faire un choix avisé du sérotype en fonction de la pathologie ostéo-articulaire en question et des cellules ciblées par la stratégie de thérapie génique mise en place. Pour l'étude, 10 souris dans chaque groupe seront injectées par voie intra-articulaire avec un AAVr codant pour la Green Fluorescent Protein (GFP) dans chacun des 2 genoux. L'un servira alors aux études histologiques et l'autre aux études moléculaires. Deux sérotypes seront étudiés (AAVr2/2 et AAVr2/DJ) avec pour ces deux sérotypes 6 modifications chimiques testées ainsi que le sérotype non modifié soit 7 conditions par sérotype. Un groupe contrôle de 10 souris sera injecté avec une solution saline. Ce projet utilisera donc 150 souris C57BL/6J mâles.

Ce projet prend en compte la règle des 3R :

-Le nombre d'animaux a été réduit au nombre minimal requis pour chaque type de test afin d'atteindre une significativité statistique : soit 10 animaux par groupe pour la procédure expérimentale n°1 ce qui fait un total de 150 souris. L'étude statistique adaptée compte tenu du nombre d'animaux par groupe sera un test non paramétrique Kruskal-Wallis pour pouvoir comparer toutes les conditions suivi du test de comparaison multiple de Dunn pour déterminer où sont les différences observées.

-Le raffinement est mené en réduisant la douleur lors des expérimentations afin d'améliorer la reproductibilité et la qualité de l'expérimentation. Ainsi, une analgésie pré-opératoire immédiate est prévue par administration de buprénorphine et de meloxicam. Les souris seront hébergées à raison de 5 souris par cages. Elles seront observées et pesées quotidiennement la première semaine après la chirurgie puis 2 fois par semaine jusqu'à la fin de l'expérimentation. Par ailleurs, des points limites ont été identifiés et les procédures de raffinement à mettre en place pour réduire la douleur lors de l'atteinte de ces points limites ont été décrites.

-Malheureusement, le remplacement de cette expérimentation animale par un modèle in vitro est impossible, car cette étude vise à comparer le tropisme, l'efficacité de transduction, la bio-distribution ainsi que la neutralisation de différents AAVr in vivo. Or bien que l'efficacité de transduction des AAVr peut être étudiée in vitro, les résultats obtenus in vitro, sont généralement très éloignés des efficacités de transduction in vivo. Nous ne pouvons donc pas extrapoler les

efficacités de transduction obtenus in vitro à l'in vivo. Il n'existe donc pas de méthode alternative à l'utilisation d'animaux pour ce projet.

18026 La sérotonine est un neurotransmetteur du système nerveux central impliquée dans de nombreuses fonctions ; parmi les plus connues, on peut citer la dépression, les antidépresseurs ayant pour action l'élévation des niveaux de sérotonine dans le cerveau et par conséquent la stimulation de ses récepteurs. L'étude de l'élimination génétique d'un de ses récepteurs chez la souris reproduit en partie les changements de comportement associés à certaines mutations trouvées chez l'homme dans le gène codant pour ce même récepteur. De plus l'utilisation de composés bloquant ce récepteur pourrait avoir un intérêt thérapeutique. L'évaluation de l'impact de l'absence de ce récepteur sur le comportement, reproduisant ces variants génétiques chez l'animal est donc de première importance.

De manière complémentaire aux observations chez l'homme, des premières données chez la souris indiquent que l'absence de ce récepteur favorise une impulsivité anormale ainsi que les comportements dépressifs. Le but de nos travaux actuels est donc d'affiner nos données obtenues chez ces souris qui corroborent les données de clinique humaines afin de comprendre plus en détail les fonctions cérébrales contrôlées par ce récepteur et ainsi d'en comprendre les pathologies associées, incluant le comportement dépressif.

Une technique récemment développée permet de réduire l'impact éventuel d'anomalies développementales induite par la mutation des gènes d'intérêt qui pourrait être délétère pour l'animal. Elle consiste en l'utilisation d'inactivation conditionnelle des gènes permettant de la limiter à un tissu précis où se fait cette inactivation et de rendre les phénotypes de ces animaux non-dommageables.

Ce projet a donc pour but de comprendre comment un des récepteurs de la sérotonine intervient dans le comportement mais aussi dans certaines maladies à composantes génétiques comme la dépression. Pour cela nous prévoyons d'étudier les phénotypes observés après une invalidation conditionnelle du récepteur uniquement dans les neurones du cerveau produisant la sérotonine chez la souris.

Les souris sont aussi analysées dans une série de tests comportementaux en réponse à certains composés pharmacologiques, afin d'évaluer les modifications comportementales éventuelles induites par l'inactivation du récepteur, réduction de l'anxiété par des antidépresseurs, activité locomotrice, réduction du réflexe de sursaut ou anhédonie.

Cette approche intégrée de l'impact de l'absence d'un sous-type de récepteur à un neurotransmetteur sur le fonctionnement du système nerveux central nécessite d'utiliser des animaux pour pouvoir tirer des conclusions fonctionnelles.

Ce projet s'inscrit dans le cadre des 3R (remplacement, réduction, raffinement)

a) Remplacer :

De manière à réduire le nombre d'animaux utilisés, leur remplacement par une approche cellulaire est toujours privilégié, culture primaire de neurones mais aussi lignées cellulaires transfectées lorsque la question scientifique posée le permet. Cependant pour étudier les effets de mutations génétiques sur le comportement, nous devons utiliser le modèle murin qui est le seul modèle permettant de modéliser les pathologies du système nerveux central.

b) Réduire :

Une étude statistique a été réalisée pour déterminer le nombre d'animaux nécessaire pour chaque lot à partir de nos expériences précédentes à 10 souris par groupe d'études des comportements associés à la sérotonine. Ainsi nous avons réduit ce nombre au strict minimum nécessaire à atteindre la puissance statistique requise. Afin de restreindre encore la quantité, les animaux sont utilisés pour une série de test lorsque l'impact d'un premier test comportemental n'intervient pas sur les tests subséquents.

c) Raffiner :

Les animaux sont hébergés en groupe sociaux de 5 individus maximums et ils disposent dans chaque cage d'un enrichissement de nidification. Une surveillance quotidienne est réalisée pour vérifier la bonne santé des animaux. Dans le cas d'animaux importés de fournisseurs extérieurs, une période d'acclimation d'au moins 1 semaine est respectée.

Dans le cadre des procédures expérimentales la douleur est prise en compte par différents médicaments analgésiques. Un raffinement de la qualité de vie des animaux est obtenu, en réduisant la durée d'expérimentation et en prévoyant des anesthésiques et analgésiques en cas d'intervention invasive.

Le nombre d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats robustes non-contestables est de 880 souris pour les cinq années à venir.

18027 L'arthrose, est caractérisée par une érosion du cartilage, la formation d'ostéophytes, une sclérose osseuse sous chondrale et une inflammation synoviale. L'arthrose est également couramment décrite comme la conséquence d'une perturbation de l'homéostasie des tissus cartilagineux. Étant donné que le vieillissement est l'un des principaux facteurs de risque de l'arthrose, nous proposons de tester des facteurs anti-âge pour le traitement de cette maladie. Parmi les facteurs anti-géroniques, la protéine alpha-klotho (a-KL) semble être l'un des plus pertinents, car plusieurs polymorphismes du gène a-KL sont associés à un risque accru d'arthrose et des niveaux différents d'ARNm d'a-KL ont été rapportés entre le cartilage articulaire sain et arthrosique. Cependant, le rôle de la protéine a-KL dans la physiopathologie de l'arthrose reste inconnu. Dans ce contexte, l'objectif de ce projet est d'explorer le rôle de la protéine anti-géronique a-KL dans l'arthrose. Pour cela, nous allons générer une souche de souris dépourvues d'a-KL. Ces souris vont nous permettre d'analyser l'impact de la délétion globale de la protéine a-KL sur la survenue d'une arthrose post traumatique chirurgicalement induite.

La procédure n°1 a pour but de déterminer l'efficacité de notre protocole d'injection sur la diminution de l'expression du gène a-KL. Nous évaluerons si cette diminution dans l'organisme global présente des effets secondaires néfastes sur la santé générale de la souris. A l'issue de la procédure n°1, si des effets délétères importants (nécessitant le sacrifice anticipé) sont observés chez les souris, la procédure n°2 ne sera pas mise en oeuvre.

La procédure n°2 a pour objectif d'évaluer l'impact de la diminution de l'expression du gène a-KL sur l'apparition et l'évolution de l'arthrose post traumatique. Les souris seront déléetées pour a-KL à l'âge de 9 semaines puis elles seront opérées pour induire chirurgicalement l'arthrose par déstabilisation de ménisque médial (DMM). Les souris seront euthanasiées et auront une ponction intracardiaque terminale décrite dans la procédure n°3. Les pattes, le rachis, la tête et les reins seront également prélevés pour évaluer le niveau d'arthrose par des analyses moléculaires, radiologiques, histologiques et immunohistochimiques et pour l'analyse des niveaux d'expression du gène a-KL.

Ce projet prend en compte la règle des 3R en appliquant les consignes suivantes :

Je réduis le nombre d'animaux en utilisant le nombre minimal requis pour chaque type de test afin d'atteindre une significativité statistique.

La procédure 1 utilisera un total de 30 souris de 9 semaines réparties en 3 groupes (temps de sacrifice post injection: 1, 2 et 8 semaines) de 5 souris/génotype (2 génotypes étudiés).

La procédure 2 utilisera un total de 780 souris. Les 780 souris sont réparties comme suit :

- 720 souris en groupes de 20 souris par condition (2 conditions : DMM ou SHAM), par temps d'analyse (3 temps : 2, 6 et 12 semaines post-chirurgie) soit 120 souris femelles et 120 souris mâles par génotype (3 génotypes : sauvage, hétérozygote et homozygote) seront utilisées.

- 60 souris en groupes de 5 souris par temps (2, 6 et 12 semaine post-chirurgie) et par condition (DMM ou SHAM) soit 30 souris (mâles ou femelles) pour les 2 conditions contrôles (permettant de vérifier l'effet du tamoxifène seul et l'effet de l'expression de la recombinaison Cre).

La procédure 3 ne concerne que les animaux de la procédure 1 et 2, elle n'utilisera pas d'animaux supplémentaires. Cette saisine nécessitera donc un total de 810 souris. Je raffine en réduisant la

douleur lors des expérimentations afin d'améliorer la reproductibilité et la qualité de l'expérimentation. Ainsi, une analgésie péri-opératoire immédiate est prévue par administration de buprénorphine et méloxicam en pré et post-chirurgie. Les souris seront hébergées à raison de 5 souris par cage avec de l'enrichissement type frisottis. Elles seront observées et pesées quotidiennement les trois premiers jours après la chirurgie puis 2 fois par semaine jusqu'à la fin de l'expérimentation. Par ailleurs, des points limites ont été identifiés et les procédures de raffinement à mettre en place lors de l'atteinte de ces points limites ont été décrites. Malheureusement, je ne peux pas remplacer cette expérimentation animale par un modèle in vitro, car cette étude vise à déterminer l'impact de l'invalidation d'un gène sur l'apparition de l'arthrose.

18028 L'arthrose est une pathologie des articulations qui se caractérise par une destruction progressive du cartilage articulaire, une sclérose de l'os sous-chondral associée à l'apparition d'ostéophytes, ainsi qu'une inflammation de la membrane synoviale. Il est désormais reconnu que cette composante inflammatoire joue un rôle clé dans la maladie, puisqu'elle est liée à une augmentation de la dégradation du cartilage et de la douleur. Il n'existe, à ce jour, aucun traitement capable d'enrayer l'évolution du processus arthrosique. Il est maintenant bien connu que les cellules souches mésenchymateuses (CSM) ont des propriétés régénératives qu'elles exercent via la sécrétion de facteurs immunomodulateurs, anti-apoptotiques, anti-fibrotiques et anti-inflammatoires. La sécrétion de différents facteurs par les CSM joue également un rôle dans la protection des cellules contre le stress oxydatif et la senescence. Ainsi, les thérapies cellulaires à base de CSM apparaissent comme prometteuses dans le traitement de l'arthrose. Les avancées récentes dans la physiopathologie arthrosique ainsi que dans la compréhension des propriétés régénératives des CSM ont été obtenues grâce à l'utilisation de modèles de souris arthrosiques. Ces études ont notamment montré que les CSM murines réduisent l'épaississement synovial, la formation d'ostéophytes et la destruction du cartilage dans des modèles d'arthroses expérimentales. Considérant d'une part, le rôle de l'inflammation et du système immunitaire dans le processus arthrosique et d'autre part les différences entre les médiateurs de l'immunomodulation entre les CSM de souris et les CSM humaines, le développement de modèles animaux sophistiqués mimant au mieux le système immunitaire humain représenterait un plus dans l'évaluation de thérapies cellulaires anti-arthrosiques à base de CSM humaines. Dans ce contexte, nous souhaitons développer un modèle d'arthrose expérimentale chez la souris humanisée. Les souris NOD/SCID/IL2R gamma $\gamma^{-/-}$ (NSG) sont immunodéficientes: elles manquent de lymphocytes T, lymphocytes B et présentent des niveaux très faibles d'activité des cellules NK. Ces souris, privées de la chaîne gamma du récepteur commun aux cytokines, présentent également un fonctionnement déficient de leur système immunitaire inné. Les souris NSG supportent une greffe à long terme de cellules souches hématopoïétiques humaines (CSH). Avec le temps, les CSH greffées se différencient permettant la colonisation du système immunitaire murin par des cellules immunitaires humaines (lymphocytes T et B, cellules NK, cellules dendritiques ainsi que des monocytes/macrophages et des granulocytes). Ainsi, chez des souris préalablement humanisées (Procédure 1) nous induiront l'arthrose par déstabilisation du ménisque médial (DMM) droit (Procédure 2). Afin de caractériser ce modèle d'arthrose en terme de cinétique et degré de l'atteinte arthrosique chez les souris humanisées, les souris seront euthanasiées 1, 6 et 12 semaines après induction de l'arthrose, les membres postérieurs seront prélevés et l'évolution de l'arthrose induite sera appréciée par des analyses microscanner et histologiques. Ce projet utilisera un nombre total de 90 souris. Les animaux seront mis à mort à la fin de la procédure 2. Nous utiliserons des souris de souche NSG (Jax™ Mice strain) mâle et femelle de 4 semaines hébergées à raison de 5 souris par cage. Les enrichissements prévus dans cette étude sont de type frisottis (Sizzle-Dri Kraft) et si besoin ajout d'un dôme (Cello dome). Les expérimentations seront réalisées en respectant la règle des 3 R (Remplacer, Réduire et Raffiner). En effet, une bonne caractérisation du modèle d'arthrose chez les souris humanisées nous permettra de réduire le nombre d'animaux lors de nos futures expérimentations utilisant ce modèle. Par ailleurs, afin de réduire la douleur lors des expérimentations, une analgésie péri-opératoire immédiate est prévue par administration de buprénorphine en pré et post-chirurgie. Par ailleurs, les souris seront observées les 3 premiers jours après la chirurgie, puis 2 fois par semaine jusqu'à la fin de l'expérimentation. Malheureusement, il

n'est pas possible de remplacer cette expérimentation animale par un modèle in vitro, car cette étude vise à voir l'influence du système immunitaire humain dans l'évaluation de thérapie cellulaire anti-arthrosiques à base de CSM humaines.

18029 Mesures sur coqs adultes caectomisés de l'énergie métabolisable et de la digestibilité des acides aminés des matières premières destinées à l'alimentation des volailles pour les mettre en corrélation avec les mesures faites avec un appareil Proche Infra Rouge (NIR)

En plus des analyses chimiques faites sur les matières premières, il est nécessaire de mesurer in vivo les coefficients de digestibilité de certains nutriments (acides aminés et énergie en particulier), les méthodes in vitro étant insuffisamment précises et discriminantes.

Pour ce faire, des coqs adultes ayant subi une ablation des caeca réalisée par le Chirurgien Agréé de l'EU sont utilisés comme modèle expérimental, modèle reconnu et largement utilisé dans le monde. En effet, l'ablation des caeca permet de s'affranchir des fermentations microbiennes qui viendraient modifier la digestibilité intestinale vraie.

Des échantillons de quelques kilos suffisent pour être transformés en aliments qui sont administrés à des coqs après une mise à jeun.

La période d'essai proprement dite dure 3 jours : ingestion de l'aliment par les animaux et collecte des fèces après digestion. Les analyses chimiques faites sur les matières premières avant ingestion et sur les fèces en fin d'essai (fraction non digestible) permettent par différence de calculer des coefficients de digestibilité des nutriments indispensables à une optimisation (technique et économique) des rations des volailles en production.

Sur une période de 5 ans, avec un effectif de 160 coqs, 400 à 500 échantillons de matières premières peuvent être ainsi analysés.

L'utilisation de coqs adultes permet, par la quantité relativement importante d'aliment ingéré et donc la quantité d'excrétas produits, de limiter à 12 répétitions (12 coqs) par aliment le nombre de mesures tout en conservant un coefficient de variation acceptable pour chaque série de mesures et partant, d'obtenir une bonne signification statistique de chaque résultat moyen (réduction)

Les coqs sont logés en cages individuelles spacieuses dans une salle climatisée (température et humidité constantes) et lumineuse ; les cages sont grillagées ce qui permet aux animaux de se voir sans possibilité de bagarre, munies d'un perchoir et d'un « jouet » ce qui contribue à leur confort (raffinement). Une alimentation en eau propre et en aliment complet ad libitum est respectée scrupuleusement (raffinement).

Effectuées par des personnels parfaitement formés selon les bonnes pratiques précisément décrites dans des procédures, ces manipulations sont sans conséquence sur le devenir des animaux (raffinement).

La bonne gestion de la douleur éventuelle durant la mise en œuvre de la procédure est assurée par la prise en compte des « points limites adaptés » formalisée par l'utilisation systématique d'une grille d'évaluation conçue en concertation avec l'ensemble des acteurs chargés du Bien-être animal (SBEA et opérateurs).

En plus d'une valorisation directe en formulation des aliments, ces données sont utilisées pour enrichir et compléter une base de données créée depuis plus de 25 ans (plus de 460 matières premières évaluées) et servant à l'amélioration et au développement d'une méthode d'analyse indirecte par Spectrométrie Proche Infra Rouge (NIR). Cette méthode dite analyse NIR est largement déployée dans un réseau de clients au niveau mondial et permet de s'affranchir de l'utilisation des coqs pour les mesures de routine tout en apportant une réponse rapide aux besoins d'analyses (remplacement et réduction du besoin en animaux expérimentaux).

18030 La maladie de Pompe est une maladie métabolique rare liée à la mutation du gène codant l'enzyme alpha-glucosidase (GAA) qui dégrade le glycogène lysosomal en glucose. Sa déficience entraîne une accumulation pathologique du glycogène dans les cellules, qu'elles soient musculaires ou neuronales/gliales. Dans les formes les plus sévères, la mutation est responsable d'une

cardiomyopathie qui évolue vers l'insuffisance cardiaque et le décès en l'absence de traitement. Une thérapie enzymatique de remplacement existe : une GAA fonctionnelle est injectée régulièrement (sa durée de vie nécessite de répéter l'injection) au patient. En théorie, l'enzyme fonctionnelle atteint toutes les cellules de l'organisme et y remplace la GAA altérée. Mais celle-ci n'atteint que difficilement les cellules du cerveau, du fait de la barrière naturelle qui le protège (Barrière Hémato-Encéphalique ou BHE). En conséquence, des retards de développement et certains déficits (en particulier auditif) sont observés, en particulier pour la forme infantile. Afin d'affiner le traitement, un marqueur non-invasif de réponse au traitement et de progression de la pathologie au niveau du système nerveux central manque.

Avec l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) moderne, il est possible de détecter et quantifier de nombreux métabolites (et électrolytes) d'intérêt pour la biochimie, la physiologie et la pharmacologie, que ce soit en conditions normales ou pathologiques. Jusqu'ici focalisée sur la détection des noyaux d'hydrogène de l'eau en raison de son abondance dans les tissus mous, l'avènement des très hauts champs magnétiques ouvre la voie de la spectroscopie et de l'imagerie de noyaux moins abondants tels que le carbone-13 (^{13}C), un isotope stable du carbone. Alternativement, il est possible de détecter indirectement certains de ces métabolites via les atomes d'hydrogène auxquels ils sont associés. Ces nouvelles approches d'imagerie offrent des perspectives extrêmement intéressantes. Elles doivent permettre d'apporter une multitude d'informations physiologiques et biochimiques qui pourraient à terme améliorer notre compréhension des processus physiopathologiques des maladies cérébrales, mais aussi des maladies métaboliques affectant les muscles et de certains cancers. Ultimement, ces méthodes (on parle de RMN in vivo) pourraient servir à l'évaluation de nouvelles thérapies.

Notre objectif est le développement et la validation d'outils dédiés à la détection du glycogène par RMN in vivo à hauts champs magnétiques. Une fois mis au point, ces outils seront utilisés pour mesurer le glycogène cérébral dans une souris modèle transgénique de la maladie de Pompe. En cas de résultats positifs, ces outils pourront être évalués et envisagés pour mesurer le glycogène cérébral chez le patient.

A l'heure actuelle, la complexité anatomique, fonctionnelle et métabolique du cerveau ne peut être appréciée que chez l'individu vivant. Aussi le passage par l'expérimentation animale demeure une étape nécessaire à l'évaluation de nouveaux traitements chez l'Homme. L'effectif total de souris normales ou transgéniques a été estimée à 80 pour toute la durée du projet. Ce nombre a été réduit au minimum notamment grâce à la possibilité offerte par l'IRM d'un suivi longitudinal. Afin de procéder au marquage isotopique au ^{13}C du glycogène cérébral, du glucose marqué au ^{13}C sera infusé aux souris anesthésiées avant et pendant l'examen RMN. Tous les animaux seront issus d'établissements éleveurs ou de fournisseurs agréés et seront hébergés en groupe conformément aux règles en vigueur de l'animalerie. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter et limiter toute souffrance : anesthésie lors des examens RMN, suivi en continu des paramètres physiologiques pour intervenir immédiatement et mise en place de protocoles analgésiques en cas de douleur ou souffrance de l'animal. Des critères d'arrêt sont prévus afin de prendre en compte des effets inattendus et la progression des symptômes chez les souris modèles de la maladie de Pompe. Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation mettra en œuvre des traitements appropriés pour supprimer toute souffrance ou décidera d'une euthanasie.

18031 Le projet vise à estimer l'efficacité pour les poissons de la connectivité actuelle d'un grand axe fluvial, sur un secteur de 185km comptant sept barrages qui ont tous été progressivement équipés ces dernières années de dispositif(s) de franchissement piscicole. Ces dispositifs n'ont fait l'objet d'aucun suivi d'efficacité et seules deux stations de vidéo contrôle des migrations (STACOMI) fournissent actuellement des données quantitatives de passage des poissons. L'expérimentation vise à détecter plus finement par pistage acoustique l'étendue des déplacements et flux migratoires d'espèces migratrices et d'espèces strictement d'eau douce (holobiotiques). Il s'agira d'évaluer la fréquentation des habitats par ces espèces, leur propension à se déplacer (migrations latérale et longitudinale) et à poursuivre leur progression sur l'axe et ses affluents jusqu'aux frayères potentiellement accessibles pour elles. Ces observations permettront d'estimer la connectivité

octroyée par les dispositifs de franchissement existants et l'impact cumulé des obstacles physiques sur l'accessibilité aux habitats fonctionnels, pour mettre en évidence les zones potentiellement à préserver et à restaurer afin de rétablir les fonctionnalités du bassin-versant pour les espèces étudiées et faciliter la réalisation de leur cycle de vie.

Autorisé en avril 2020, le projet n'a débuté qu'en fin de printemps (juin) du fait de la crise sanitaire (Covid 19), ce qui n'a pas permis de prélever toutes les espèces initialement ciblées, étant donné leurs rythmes migratoires saisonniers. Ainsi, alors que l'effectif spécifique attendu a été atteint pour l'anguille européenne, le mulot porc, la brème commune, il ne l'a été que très partiellement pour la lamproie marine, le barbeau fluviatile et la truite de mer ou nullement pour la grande alose et le saumon atlantique. Au demeurant les remontées annuelles de saumons et truites de mer s'étant avérées particulièrement faibles, ces espèces ne sont plus ciblées dans cette prolongation du projet.

Les trois espèces aujourd'hui visées sont la grande alose *A. alosa* et la lamproie marine *P. marinus* (migrateurs) ainsi que le barbeau fluviatile *B. barbus* (holobiotique), tous inscrits dans les plans de gestion régionaux et choisis selon leurs potentialités de reconquête du bassin-versant. Au total 75 poissons maximum seront utilisés pour ce suivi complémentaire sur un an. Ils seront capturés au verveux (filet conique) par une équipe de pêcheurs professionnels dans le bassin de sortie de la passe à poissons du premier barrage aval. Une à deux campagnes de piégeages (5 jours chacune) sont prévues en avril/mai, calées sur les premiers pics saisonniers de passages au barrage des espèces visées. La STACOMI en temps réel aidera à ajuster la fréquence de relevé (~toutes les 2h) à l'abondance des remontées. A chaque relevé, les poissons seront triés et ceux non retenus immédiatement relâchés. Ceux sélectionnés seront répartis dans des bacs couverts de grande capacité alimentés constamment en eau de rivière fraîche et bien oxygénée (circuit ouvert) où ils seront gardés 2 à 3h maximum dans l'attente du marquage et observés régulièrement. Chaque poisson sera anesthésié par balnéation dans une solution adaptée aérée en continu (dose variable selon l'espèce et le marquage). Il sera pesé, mesuré et identifié par une marque externe dorsale. Un prélèvement d'écaillés sera effectué pour déterminer l'âge (analyse de croissance des populations) et chez l'alose, un morceau de nageoire sera aussi prélevé pour déterminer l'origine (analyse génétique populationnelle). L'animal sera ensuite marqué avec un émetteur acoustique : par insertion dans la cavité stomacale par voie naturelle (alose) ou dans la cavité abdominale par chirurgie (autres espèces). Puis l'animal sera placé en réveil dans une cage flottante de pleine eau (alose) ou un grand bac couvert en circuit ouvert jusqu'à récupération complète de l'anesthésie. Il sera gardé en observation environ 1h avant d'être libéré dans son milieu.

Il est nécessaire de recourir à des animaux sauvages car il n'existe pas d'élevage pour les espèces visées. Les poissons marqués seront suivis dans leur milieu pour évaluer l'impact cumulé des barrages sur l'accessibilité aux habitats fonctionnels. Ils seront pistés pendant un an pour couvrir la migration de reproduction. Le secteur d'étude sera maillé avec un réseau de 30 hydrophones déployés en barrières d'écoute à l'aval et à l'amont des barrages et aux confluences des principaux affluents.

L'effectif spécifique visé par cet avenant au projet 2020 (40 aloses, 20 lamproies, 15 barbeaux) ne représente qu'un très faible pourcentage des populations présentes et est adapté (chez les barbeaux) à la disponibilité en individus de grande taille. C'est un minimum annuel raisonnable pour compléter une approche à l'échelle du bassin-versant et nécessaire statistiquement pour documenter la variabilité comportementale intra et interspécifique et la corrélérer à quelques variables environnementales.

Raffinement : le piégeage est optimisé pour cibler les espèces et maximiser la capturabilité, tout en limitant les traumatismes physiques, sources de stress (temps d'attente, densité dans le piège) et effets sur les populations. Les conditions d'hébergement sont adaptées (pleine eau ou renouvellement par circuit ouvert, faible densité) et limitées au minimum nécessaire pour ne pas affecter la physiologie, la santé ou le comportement habituel de l'animal. Les poissons seront observés régulièrement et la physico-chimie de l'eau surveillée. Les marquages, standardisés et déjà pratiqués, tiennent compte des spécificités et de la fragilité des espèces. L'insertion gastrique, peu traumatisante et adaptée aux espèces qui stoppent leur alimentation en migration de reproduction, sera pratiquée sous anesthésie légère et sans émergence de l'animal (alose). Chez les

autres espèces, le marquage abdominal sera opéré sous anesthésie profonde après injection d'un analgésique pour soulager la douleur et d'un antibiotique pour prévenir l'infection post-chirurgicale et faciliter la cicatrisation. Ces mesures (et le faible poids de la marque) limiteront les effets préjudiciables à la survie et aux performances de nage des animaux.

18032 La sécurité alimentaire est un problème majeur à l'échelle mondiale. Ainsi, une attention doit être accordée aux contaminants alimentaires naturels omniprésents tels que les mycotoxines produites par des champignons. Des enquêtes mondiales ont estimé que jusqu'à 70% de la production agricole mondiale est contaminée par des mycotoxines. Comme la plupart des mycotoxines sont très résistantes au broyage, au chauffage et à la cuisson, elles atteignent facilement l'assiette du consommateur.

Parmi ces champignons, contaminants les denrées agricoles, on trouve des *Fusarium* qui produisent une mycotoxine qui est la plus répandue en Europe : la désoxynivalénol (DON).

Des expositions chroniques à DON peuvent augmenter la sensibilité aux infections intestinales et prédisposer aux maladies inflammatoires.

D'autre part, de plus en plus de preuves indiquent qu'outre la nourriture, le microbiote intestinal (ensemble des microorganismes se trouvant dans le système digestif) peut participer à la carcinogenèse intestinale. Certaines bactéries ont été liées au cancer par l'induction d'une inflammation chronique ou la production de métabolites qui provoquent des altérations de l'ADN (ils sont dits génotoxiques). Ainsi des bactéries de l'espèce *E. coli* produisant un métabolite génotoxique, la colibactine, se retrouvent chez un nombre accru d'Européens (25-44%). La colibactine est notamment retrouvée dans les biopsies de patients atteints de cancer colorectal.

Le but de ce projet est de comprendre comment la présence d'une mycotoxine dans les aliments peut exacerber la génotoxicité des *E. coli* producteurs de colibactine, et comment leur association affecte la santé et pourrait expliquer, en partie, cette plus grande sensibilité au cancer colorectal chez les populations humaines où les bactéries génotoxiques sont en augmentation.

Lors de la conception du protocole expérimental, nous avons veillé à l'application de la règle des 3R:

i) notre projet porte sur la relation entre l'alimentation, l'hôte et une bactérie ce qui met en jeu des interactions complexes. Pour le mener à bien nous avons besoin de tester la combinaison DON + *E. coli* sur des organismes complexes, afin de comprendre leur impact sur la physiologie de l'hôte. En effet, l'impact de l'aliment et de la bactérie sur l'épithélium digestif, l'apport de cellules par le sang lors de l'inflammation, la migration de cellules aux ganglions pour activer des réponses adaptatives sont autant de facteurs impossibles à reproduire *in vitro* ou *ex vivo*. Par conséquent, seule l'utilisation d'animaux nous permettra de répondre à notre question scientifique. Le rat est le modèle de référence dans les études de nutrition et de cancérogénèse. Pour simplifier notre modèle nous avons choisi de travailler avec des rats Fisher 344 axéniques (dépourvus de microbiote) auxquels nous allons inoculer *E. coli*. Le DON sera quant à lui donné dans l'aliment.

ii) nous avons déterminé le nombre d'animaux nécessaire et suffisant à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Le projet prévoit ainsi le recours à un nombre nécessaire de 108 rats sur 5 ans. Chaque groupe sera composé de 12 rats. Nous prévoyons de tester 2 concentrations de DON, d'avoir un lot témoin sans DON et d'utiliser 3 souches bactériennes exprimant ou non la colibactine. Ce qui nous fera en tout 9 lots de 12 rats. Comme nous allons regarder les signes précurseurs de l'inflammation et de la génotoxicité l'expérience ne durera pas plus de 5 semaines et nous n'attendons pas d'effets cliniques sur les animaux.

iii) tous les rats auront dans leur cage un enrichissement de milieu par l'ajout de Sopalin (pour faire le nid) et d'un bâton de bois à ronger. Les rats seront 2 par cage pour éviter l'isolement et pour avoir de l'espace dans la cage.

Les rats et leur comportement seront suivis quotidiennement afin de détecter d'éventuels signes d'inconfort. Cela nous permettra d'intervenir rapidement et de façon appropriée si un problème survenait. Les rats seront pesés au moins une fois par semaine (voir de façon plus rapprochée en

fonction de leur comportement) et une perte de poids supérieure à 20% du poids initial associée à une modification comportementale sera un critère d'arrêt de l'expérimentation.

18033 Les anévrismes de l'aorte abdominale représentent une maladie fréquente de la population de plus de 65 ans, dont l'évolution, en l'absence de traitement, est la rupture pouvant entraîner un décès par hémorragie interne. Leur traitement est actuellement largement dominé par le traitement dit endovasculaire, c'est à dire par l'introduction dans l'aorte d'une prothèse par l'intermédiaire d'une artère située dans le pli de l'aîne. L'objectif de ce traitement est de recouvrir la surface interne de l'artère malade par une prothèse vasculaire pour "exclure" l'anévrisme du reste de la circulation et donc empêcher le risque de rupture de ce dernier.

Il y a actuellement plusieurs endoprothèses aortiques disponibles sur le marché qui permettent de traiter ces anévrismes lorsque l'anatomie aortique est simple. Cependant, lorsqu'un anévrisme atteint le segment viscéral de l'aorte, nous devons avoir recours à des endoprothèses fenêtrées sur mesure qui sont adaptées à l'anatomie du patient. Ces prothèses ont des trous/fenestrations qui doivent être positionnés en direction des orifices des branches artérielles majeures pour ainsi préserver la perfusion des reins et des autres organes intra-abdominaux. Pour éviter un enlignement non favorable des fenestrations par rapport aux orifices artérielles, nous avons recours à de petits stents couverts qui permettent de faire le pont entre l'endoprothèse et ces artères. Pour le moment, aucun des stents proposés par l'industrie n'offre de conformité parfaite pour effectuer cette connexion. Nous avons comme objectif d'évaluer un stent novateur qui pourrait à la fois bien s'accommoder à la fenestration de la prothèse et ce, tout en étant adapté au diamètre de la branche artérielle cible, et ainsi assurer une bonne étanchéité et perméabilité à long terme.

Après une phase de mise au point in vitro, qui nous a permis de valider le concept et le choix des matériaux, nous devons, avant de proposer cette solution thérapeutique pour l'humain, vérifier in vivo l'efficacité et l'innocuité de ce dispositif.

Le porc constitue un modèle de choix en santé humaine pour l'étude des maladies cardiovasculaires, de par l'existence de caractéristiques anatomiques et physiologiques cardiovasculaires comparables à celles de l'humain.

De plus, la modélisation chirurgicale d'un anévrisme de l'aorte abdominale et l'implantation de notre prothèse ne peut être envisagée, avec un fort taux de succès, que sur une espèce aux dimensions anatomique accessibles à la chirurgie. Pour la totalité du projet, nous utiliserons au maximum 17 porcs à croissance lente. Le nombre d'animaux utilisé est déterminé par un test statistique permettant de déterminer un nombre nécessaire et suffisant d'animaux pour affirmer l'efficacité du nouveau traitement. L'ensemble des procédures seront réalisées sous anesthésie générale par un mélange couvrant les composantes hypnotiques et antalgiques de l'anesthésie.

Afin de tenir compte des besoins quotidiens de nos animaux et d'améliorer leur bien-être, les porcs auront une période d'acclimatation d'une semaine avant d'être inclus dans le protocole. Leur nourriture sera adaptée et ils seront stabulés en groupe dans des cages adaptées à leurs poids, afin de permettre un contact régulier entre congénères et réduire leur stress. Leur environnement sera enrichi (activité de foussement encouragée, médecine ball, jeux dans le couloir, planche à gratter, distributeur d'aliment actif. . .) et adapté à chaque phase de l'expérimentation pour réduire leur angoisse. Tout constat d'un mal-être sera remonté au responsable du bien-être des animaux pour examen approfondis et traitements adaptés. Si la douleur, la souffrance et l'angoisse ne pouvaient être réduites à leur minimum, une décision d'interruption d'expérimentation sera prise en concertation avec le vétérinaire sanitaire.

18034 L'obésité est une maladie chronique et un problème de santé publique majeur. En France, elle est en augmentation constante depuis plusieurs années et touche environ 15% de la population.

La chirurgie bariatrique, également appelée chirurgie de l'obésité, consiste à enlever une partie de l'estomac et souvent à exclure une partie de l'intestin du circuit des aliments. C'est le traitement de référence de l'obésité quand elle est dite morbide (c'est-à-dire avec un indice de masse corporelle (poids/taille au carré) ≥ 40).

Le « Bypass Gastrique Roux-en-Y » (RYGB) est la chirurgie bariatrique la plus utilisée après la Sleeve Gastrectomy ; il consiste à réduire de manière drastique le volume de l'estomac et à modifier le circuit alimentaire dans le tube digestif. Il a pour effet de diminuer la prise alimentaire et d'induire un défaut d'absorption des nutriments au niveau de l'intestin (on parle alors de malabsorption). Cette chirurgie est bénéfique en termes de perte de poids, de correction des maladies associées et d'espérance de vie, mais elle présente également des désavantages. Le RYGB peut induire des carences nutritionnelles, notamment vitaminiques et protéiques. Afin d'améliorer la prise en charge nutritionnelle des patients, il est crucial de détecter cette malabsorption protéique et de la quantifier. Des études précédentes ne mettent pas en évidence un problème d'absorption des protéines alimentaires après un RYGB, mais elles suggèrent que les protéines sont davantage séquestrées dans le tissu intestinal, réduisant ainsi leur mise à disposition pour les autres organes, ce qui pourrait être à l'origine de la dénutrition protéique observée après RYGB.

L'étude proposée a pour but d'explorer cette hypothèse pour mieux comprendre le rôle de l'intestin dans la dénutrition protéique après RYGB. Le projet permettra à terme d'établir de nouvelles stratégies nutritionnelles adaptées pour les patients bénéficiant d'un RYGB.

Objectif de l'étude : Etudier l'effet du RYGB sur la paroi intestinale et la biodisponibilité des protéines et des acides aminés alimentaires. Les acides aminés sont les principaux composants des protéines. Une fois digérées, les protéines alimentaires sont dégradées et les acides aminés sont libérés puis utilisés par l'organisme en fonction des besoins. La biodisponibilité des protéines correspond à la capacité de l'organisme à assimiler les protéines alimentaires.

Des rats vont être soumis à un régime obésogène, et une fois obèses (après 3- 4 mois de régime riche en sucres et lipides) ils vont être opérés sous anesthésie générale d'un RYGB. Ils seront ensuite suivis pendant plusieurs semaines après opération (2, 8 et 12 semaines). 10 jours avant de recevoir un repas test, les rats seront soumis à une « période d'habituation » au cours de laquelle la nourriture ne leur sera pas servie à volonté, mais seulement pendant des périodes de quelques heures. Cela les habitue à manger entièrement et rapidement un petit repas. Le jour du test, les rats recevront ce petit repas-test contenant des protéines marquées, c'est-à-dire des protéines différenciables des autres, mais aussi traçables : on pourra donc suivre le devenir des protéines alimentaires (et des acides aminés qui les constituent) dans l'organisme après absorption et digestion. Les animaux seront euthanasiés 6h après le repas et les contenus des différents segments du tube digestif, le sang, différents organes et les urines seront collectés et analysés. Vingt minutes avant l'euthanasie, les animaux recevront une injection intraveineuse sous anesthésie gazeuse qui permettra de déterminer la synthèse protéique dans différents organes. Cela témoigne de la capacité pour l'organisme d'utiliser les acides aminés alimentaires issus de la digestion pour répondre à ses besoins. L'analyse de la quantité de protéines marquées dans les différents échantillons prélevés (sang, urine, tissus et contenus intestinaux) permettra de déterminer la biodisponibilité des acides aminés alimentaires chez ces rats. Des analyses plus poussées de l'intestin permettront quant à elles de mieux comprendre les adaptations intestinales qui surviennent en réponse à un RYGB.

La règle des 3 R (remplacer, réduire, raffiner) sera respectée.

Remplacement : Il n'est pas possible de recréer in vitro la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires entrant en jeu. L'utilisation du modèle animal pour suivre le devenir digestif et métabolique des protéines alimentaires et pour étudier l'adaptation de l'intestin en réponse au RYGB est indispensable car cela requiert des techniques hautement invasives. Néanmoins, un modèle in vitro à partir des prélèvements d'intestin (organoïdes) sera développé dans le cadre de cette étude.

Réduction : Nous limitons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables. Un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables. 10 animaux par groupe sont nécessaires. Il y a 2 groupes (Sham et RYGB) et 3 temps d'analyse (2, 8 et 12 semaines) nécessitant au total 60 animaux.

Raffinement : l'ensemble des procédures de ce projet se fera dans le respect du bien-être animal. Les chirurgies sont réalisées sous anesthésie générale et la prise en charge de la douleur, conforme

à celle réalisée chez les patients opérés d'un RYGB, est prévue avant, pendant et après l'opération. Nous avons inclus dans toutes les procédures des grilles de suivi de poids et de la prise alimentaire des animaux avec des pesées journalières les 15 jours après l'opération puis hebdomadaires, ainsi qu'une grille d'évaluation de la douleur avec des points limites précis et adaptés.

Le projet aura une durée totale de 3 ans et tous les animaux sont euthanasiés en fin de procédure pour pouvoir étudier l'estomac et l'intestin en détail.

18035 Dans le règne animal, les gènes évoluent selon différents processus moléculaires de remaniement du génome, parmi lesquels la duplication qui correspond à l'apparition d'une ou de plusieurs copies (parfois plusieurs dizaines) d'un gène initial dans le génome d'une espèce. La question qui se pose alors sur un plan fondamental est de savoir si les copies « néoformées » codent des protéines présentant la même fonction (on parle alors de redondance fonctionnelle) ou des fonctions différentes du gène initial. Dans le cas d'une redondance fonctionnelle, la perte d'une ou plusieurs copies dans un modèle d'inactivation (technique qui permet de rendre un gène invalide) pourra être compensée par les copies intactes. Il s'agit de la configuration canonique car la plus répandue. Mais il existe aussi des cas où chaque gène dupliqué acquiert une néo-fonction singulière et indispensable à la fonction.

Chez les mammifères, on constate qu'il existe de nombreuses duplications de gènes impliqués dans la gamétogenèse, mâle et/ou femelle. Par exemple chez la souris, la famille de gènes Nalp exprimés dans l'ovocyte correspond à plusieurs copies d'un même gène initial, et il a été montré que l'inactivation de deux de ses membres conduit à une stérilité. Dans ce cas donc, il n'y a pas de redondance fonctionnelle. Au laboratoire, nous nous intéressons à une autre famille de gènes gonadiques que nous avons identifiée chez la souris : la famille des Oogénésines. On y dénombre une centaine de copies, très proches d'un point de vue structural, et dont une trentaine sont exprimés exclusivement dans les gonades. Dans cette famille, nous avons caractérisé l'Oogénésine 4 exprimée dans les gonades et notre objectif est maintenant d'étudier l'effet de son inactivation chez la souris. Une autre équipe de recherche a montré que l'Oogénésine 2 n'est pas indispensable à la fertilité des souris. Il est donc possible que dans cette famille il y ait une redondance fonctionnelle de ses différents membres, contrairement à la famille Nalp. C'est donc la question de la redondance fonctionnelle des membres de la famille des Oogénésines que nous posons en invalidant l'Oogénésine 4 et en analysant le phénotype reproductif (fertilité in vivo, production des hormones sexuelles, histologie de tissus gonadiques) des mutants mâles et femelles.

Ce travail permettra à long terme de mieux comprendre la reproduction dans l'espèce humaine.

Le nombre total et optimisé de souris pour ce projet est de 128.

Application de la règle des 3 R:

Remplacement : il n'existe actuellement aucun modèle cellulaire in vitro ou ex vivo qui permette d'étudier la fonction d'un gène impliqué dans la gamétogenèse, fonction complexe faisant intervenir plusieurs types cellulaires et régulations hormonales.

Réduction : le nombre total de souris nécessaires pour ce projet est de 128 si les mâles et femelles sont touchés (il se peut qu'un seul sexe le soit).

Raffinement : les souris sont élevées en groupe en présence d'enrichissement du milieu (boîtes-cabanes d'exploration en cartons, et crinklets (lanières de papier recyclé) pour le nid lors des gestations). Les animaux sont manipulés régulièrement avant l'application des procédures pour réduire leur stress au moment des procédures, qui sont de classe légère. Après chaque procédure, les animaux recevront un morceau de pomme (renforcement positif). Enfin, les animaux sont surveillés quotidiennement et des dispositions sont prises si des troubles (comportementaux, cutanés...) apparaissent.

18036 Le projet a pour objectif de décrire l'activité de produits immunologiques destinés à la prévention de la rage chez les carnivores domestiques. L'activité des produits sera évaluée au travers de la mesure de la réponse induite chez l'animal par l'analyse du taux d'anticorps sérique (test

sérologique) par comparaison avec le taux d'anticorps obtenu avec un vaccin européen de référence.

Une procédure est décrite dans le présent projet :

essai d'activité sur souris dans le cadre strict du contrôle qualité de chaque lot de fabrication du vaccin et de son suivi de stabilité

Ce projet est conçu en accord avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement (3R), avec notamment :

le remplacement d'un essai léthal par un essai non léthal qui utilise moins d'animaux

Lorsque cela est possible, l'utilisation d'animaux témoins communs au test d'activité de plusieurs lots, de manière à réduire le nombre global d'animaux utilisés,

La définition de points limites adaptés,

L'enrichissement apporté dans les cages des animaux.

Le nombre d'animaux envisagé sera de 7000 souris pour l'ensemble du projet.

La procédure est classée en gravité modérée.

18037 Les malformations artérioveineuses cérébrales (MAV) sont définies par un lien anormal entre les artères et les veines. Ces lésions sont caractérisées par une forte prolifération vasculaire et tissulaire avec un renouvellement accru des cellules endothéliales et une angiogenèse anormale. La prise en charge des MAV cérébrales n'est pas encore clairement établie. En effet, il existe différents traitements qui peuvent être proposés aux patients avec des taux d'efficacité et de complications (risques de morbidité et de mortalité) différents selon la prise en charge.

Au cours des dernières décennies, de nombreux modèles de MAV ont été décrits pour étudier les changements hémodynamiques et histologiques et pour tester de nouveaux traitements. Le modèle expérimental de MAV le plus largement décrit et utilisé est un modèle chirurgical réalisé sur le Porc.

L'objectif de cette étude est de développer un modèle de MAV endovasculaire (sans chirurgie) consistant en une occlusion par des techniques mini-invasives de certaines artères et de pouvoir le comparer au modèle chirurgical de référence. Le principal avantage attendu du modèle endovasculaire est un abord plus simple permettant une meilleure reproductibilité du modèle, et la réduction voire l'abolition des suites post-opératoires liées à la chirurgie.

Ce projet sera mené sur 20 porcs pietrains (6mois, 40 +/-5 kg), répartis en deux groupes: un groupe contrôle de 10 animaux recevant la mise en place d'un modèle chirurgical de MAV et un groupe d'intérêt constitué de 10 animaux recevant la mise en place d'un modèle endovasculaire de MAV.

Toutes les procédures seront réalisées, sous anesthésie générale, par des chirurgiens et des radiologues interventionnels. La mise en place des MAV sera contrôlée par imagerie en étudiant l'angiogénèse, la régénération tissulaire et l'étude de l'effet EPR (perméabilité et rétention vasculaires accrues consécutivement à l'inflammation). Les volumétries seront effectuées par scanner, l'étude des différents mécanismes se fera par imagerie moléculaire après injection de traceurs spécifiques à l'état basal (avant mise en place du modèle) puis 1 semaine, 4 semaines et 12 semaines après la mise en place de la MAV par chirurgie ou de façon endovasculaire. Ces données seront couplées par des études histologique, immuno-histochimique et de morphométrie analytique après mise à mort de l'animal et explantation des MAV.

Ce projet est conçu pour respecter la règle des 3R:

Remplacement: Il est à ce jour très difficile voire impossible, de simuler des pathologies hémodynamiques avec précision. Le recours au modèle animal est donc incontournable. Le choix du modèle porcin permet la réalisation d'un modèle de MAV validé reproduisant les paramètres physiopathologiques des MAV humaines. De plus, le modèle offre la possibilité de travailler avec des équipements et des protocoles identiques à ceux utilisés en clinique, notamment pour les actes d'imagerie diagnostique et la radiologie interventionnelle.

Réduction. Nous estimons notre besoin maximal en animaux à 20: 10 animaux contrôles (modèle de MAV chirurgical, déjà validé), 10 animaux d'intérêt (modèle de MAV endovasculaire). La plupart

des analyses dépendront de données qualitatives, par expérience, un nombre de 10 par groupe permettra d'obtenir des résultats interprétables, en tenant compte de la variabilité interindividuelle. Raffinement. Afin de tenir compte des besoins quotidiens de nos animaux et d'améliorer leur bien-être, les porcs bénéficieront d'une période d'acclimatation de 7 jours avant toute manipulation, auront une nourriture adaptée, de l'eau de boisson à volonté et seront stabulés en groupe de 2 à 8 pour permettre un contact régulier entre congénères et réduire le stress dans un box de 9m² avec enrichissement (cordes pendantes, chaînes, jouets et balles anti-morsure, fibres de bois au sol). Chaque procédure sera réalisée sous anesthésie générale, la gestion de la douleur est assurée par l'administration de morphiniques en per-opératoire. Un contrôle biquotidien en postopératoire est assuré par une personne compétente avec évaluation du bien-être et de la douleur (par grille de score). L'évolution du score permet de noter l'amélioration ou l'aggravation de l'état de l'animal et de prendre des mesures appropriées (points limites).

18038 Le présent projet concerne le contrôle réglementaire sur rongeur de l'innocuité de différents produits immunologiques destinés aux carnivores domestiques.

Il n'existe pas pour le moment de méthode alternative d'évaluation de l'innocuité de ces produits.

Deux procédures répétitives sont décrites dans le présent projet, réalisées sur rongeurs dans le cadre strict du contrôle qualité de chaque lot de fabrication en conformité avec différentes réglementations (nationales et/ou européenne).

Ce projet est conçu en accord avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement (3R), avec notamment :

L'utilisation systématique d'un anesthésique dans le cas d'une des procédures,

L'enrichissement apporté dans les cages des animaux,

La surveillance renforcée des animaux et la définition de points limites adaptés permettant la réduction de la souffrance, le cas échéant.

Le nombre d'animaux envisagé sera de 4300 rongeurs pour l'ensemble du projet.

La procédure 1 est classée en gravité sévère et la procédure 2 est classée en gravité légère

18039 Les maladies à prion sont des maladies neurodégénératives fatales touchant l'humain et de nombreuses espèces animales, de rente (ruminants) ou sauvages (cervidés). Ces pathologies transmissibles ont une origine sporadique, génétique ou infectieuse. Certaines maladies à prion animales peuvent se transmettre à l'humain (risque zoonotique). Les prions humains peuvent se transmettre accidentellement en milieu hospitalier par transfusion sanguine ou lors de la réutilisation d'outils chirurgicaux ou de dispositifs médicaux (ex. endoscopes) insuffisamment décontaminés.

Les prions sont des agents protéiques composés uniquement d'une forme anormale et pathologique de la protéine prion cellulaire normale naturellement présente chez les mammifères. La forme anormale est dénommée PrP^{Sc}, la forme normale PrP^C. Au cours de l'infection, les prions se répliquent en induisant un changement de conformation de la protéine normale de l'hôte en protéine anormale selon un mécanisme autocatalytique.

Les prions s'accumulent dans les tissus nerveux et lymphoïdes des espèces atteintes. L'accumulation des protéines prion anormales sous formes d'agrégats dans le cerveau induit la mort des neurones.

Comme d'autres agents pathogènes (bactéries, virus) les prions peuvent se transmettre d'une espèce à une autre. Cette capacité à se propager entre espèces est limitée par une barrière appelée « barrière d'espèce ». Lors de telles contaminations, l'absence de signes cliniques et/ou de protéine prion pathologique dans le cerveau des individus infectés sont des indicateurs d'une barrière d'espèce efficace.

La force de la barrière d'espèce dépend principalement des interactions entre le prion et la protéine prion normale du nouvel hôte. Par conséquent, des souris transgéniques exprimant la protéine prion normale d'un hôte donné seront sensibles expérimentalement aux prions issus de ce même hôte sans barrière d'espèce. Les modèles transgéniques exprimant la protéine prion normale ovine,

bovine ou humaine ont permis de s'affranchir en grande partie de la transmission expérimentale à des animaux de rente ou à des primates non humains.

Les objectifs du projet sont à la fois fondamentaux et finalisés. Ils visent principalement à mieux comprendre la structure physique, la diversité et le potentiel de transmission inter-espèces des prions, afin notamment de modéliser le risque de transmission à l'humain. Ils cherchent à comprendre le support structural de l'infectiosité prion et à déterminer les mécanismes régissant la propagation des prions dans le tissu lymphoïde et cérébral. Ils fourniront également des bases scientifiques sur les procédés d'inactivation des prions, permettant ainsi au législateur de modéliser le risque de transmission secondaire des prions par voie alimentaire, transfusionnelle ou chirurgicale. Ces objectifs reposent en majeure partie sur l'utilisation de lignées de souris transgéniques exprimant la protéine prion normale de différentes espèces et sur leur inoculation expérimentale.

Le recours à ces animaux est rendu nécessaire par le fait que la majeure partie des prions, notamment ceux infectant l'humain, sont non cultivables en lignées cellulaires et/ou non amplifiables par des techniques d'amplification *in vitro*. Le développement de la maladie dans les modèles de souris transgéniques se révèle également très proche du développement observé chez l'humain et chez l'animal, tant dans le système lymphoïde que cérébral. Le nombre et la variété des objectifs scientifiques nécessiteront l'utilisation de 5060 souris transgéniques exprimant la protéine prion normale de différentes espèces, spécialement élevées à cette fin et provenant d'élevages reconnus et autorisés. Ce nombre d'animaux a été déterminé en fonction de nos expériences antérieures. Ils sont en nombre suffisants à l'obtention de résultats statistiquement exploitables en termes d'incidence de la maladie, d'analyses biochimiques de la protéine prion anormale et de la neuropathologie.

Les souris seront anesthésiées à l'isoflurane lors de l'inoculation et leur état de santé sera scrupuleusement surveillé quotidiennement, week-end et jours fériés inclus. Lors du développement des signes cliniques de maladie à prion chez les animaux inoculés, des échelles cliniques journalières et l'application de points limites permettront de limiter toute souffrance inutile. Les conditions d'hébergement bénéficieront d'un enrichissement du milieu avec des maisonnettes de type igloo ou tubes en cartons, des bouts de bois à ronger et des "jouets" pour la nidification. Les souris seront hébergées en groupe sociaux de 3 à 5 animaux, en évitant au maximum l'isolement. Ceci est d'autant plus important vu le temps d'incubation des prions dans ce type de modèle expérimental (de 1,5 mois à 2 ans).

18040 Les Glucocorticoïdes naturels et leurs analogues sont très fréquemment utilisés pour le traitement des maladies inflammatoires et immunitaires comme la polyarthrite rhumatoïde et l'asthme, mais aussi dans la prévention du rejet de greffe. Depuis ces dernières années, leur prescription augmente de façon importante, en particulier dans la population âgée qui reçoit 3 fois plus de traitement aux corticoïdes que la population générale, alors que cette famille de molécules présente de nombreux effets secondaires préoccupants qui en limitent l'utilisation tout particulièrement sur le long terme. Parmi ces effets, on peut retenir les effets diabétogènes. En effet, les glucocorticoïdes ont des actions hyperglycémiantes pouvant provoquer une intolérance au glucose, voire un diabète. On parle alors de diabète cortico-induit. Il est aussi reconnu que l'excès de glucocorticoïdes entraîne un surpoids, voir une obésité et une insulino-résistance, qui pourraient contribuer à accroître la mortalité. C'est ainsi le cas chez les patients atteints de la maladie de Cushing pour lesquels l'excès de glucocorticoïdes entraîne une mortalité plus importante que dans la population générale en raison de troubles cardiovasculaires probablement liés à l'obésité et à l'insulino-résistance. Enfin, il a été montré que les glucocorticoïdes induisent des mécanismes conduisant à la mort de nombreux types cellulaires et à des anomalies développementales. Il est donc important de trouver des stratégies pour contrer les effets indésirables de ses substances afin de pouvoir maintenir leur utilisation lorsqu'elle est nécessaire. L'enzyme Glycogène Synthase Kinase 3 (GSK3) semble participer aux mécanismes, induits par les glucocorticoïdes, conduisant à la mort des cellules. Cela est notamment visible dans les cellules du système immunitaire mais aussi dans les cellules Beta (cellules productrices de l'insuline) présentes dans les îlots de Langerhans du pancréas. GSK3

serait aussi impliquée dans les effets des glucocorticoïdes sur le développement des cellules beta pancréatique augmentant la susceptibilité d'un individu à développer un diabète à l'âge adulte. Le but de notre projet est donc d'aborder plus largement, par une étude in vivo, les aspects physiopathologiques du diabète cortico-induit et de démontrer qu'ils peuvent être contrôlés par l'utilisation d'un inhibiteur de l'enzyme GSK3, le chlorure de lithium (LiCl). Si notre hypothèse est validée, ce travail ouvrira des perspectives intéressantes pour la réduction des effets secondaires des glucocorticoïdes et aura un réel impact en terme d'applications des corticothérapies. Cette étude durera 5 ans et comptera 112 rats Wistar adultes et 256 foetus Wistar. Ce projet sera réalisé dans le respect de la règle des 3R (réduire, remplacer, raffiner) et du bien-être des animaux. L'amélioration de l'environnement d'hébergement se fera grâce à un enrichissement. Nous réduirons au plus petit nombre possible les animaux tout en veillant à l'obtention de résultats exploitables d'un point de vue statistique. Nous ferons en sorte d'optimiser ce nombre d'animaux dans la conduite des procédures et l'exploitation des résultats. Il ne sera pas possible de "remplacer" l'étude in vivo visant à analyser les effets multi-organes induits par les corticoïdes par une étude in vitro.

18041 La sérotonine est un neurotransmetteur du système nerveux central impliquée dans de nombreuses fonctions ; parmi les plus connues, on peut citer la dépression, les antidépresseurs ayant pour action l'élévation des niveaux de sérotonine dans le cerveau et par conséquent la stimulation de ses récepteurs. L'étude de l'élimination génétique d'un de ses récepteurs chez la souris reproduit en partie les changements de comportement associés à certaines mutations trouvées chez l'homme dans le gène codant pour ce même récepteur. De plus l'utilisation de composés bloquant ce récepteur pourraient avoir un intérêt thérapeutique. L'évaluation de l'impact de l'absence de ce récepteur sur le comportement, reproduisant ces variants génétiques chez l'animal est donc de première importance.

Des premières données chez la souris indiquent que l'absence de ce récepteur favorise une impulsivité anormale ainsi que les comportements type autistique ou psychotique. Le but de nos travaux actuels est donc d'affiner nos données obtenues chez ces souris qui corroborent les données de clinique humaine afin de comprendre plus en détail les fonctions cérébrales contrôlées par ce récepteur et ainsi d'en comprendre les pathologies associées, impulsivité, autisme, ou encore comportement psychotique.

Une technique récemment développée permet de réduire l'impact éventuel d'anomalies développementales induite par la mutation des gènes d'intérêt qui pourrait être délétère pour l'animal. Elle consiste en l'utilisation d'inactivation conditionnelle des gènes permettant de la limiter à un tissu précis où se fait cette inactivation et de rendre les phénotypes de ces animaux non-dommageables.

Ce projet a donc pour but de comprendre comment un des récepteurs de la sérotonine intervient dans le comportement mais aussi dans certaines maladies à composantes génétiques et inflammatoires comme les troubles du spectre de l'autisme, la schizophrénie ou encore les maladies neurodégénératives. Pour cela nous prévoyons d'étudier les phénotypes observés après une invalidation conditionnelle du récepteur uniquement les cellules immunitaires du cerveau (microglies) de manière permanente ou à certains moments de la vie.

Ces souris sont aussi analysées dans une série de tests comportementaux en réponse à certains composés pharmacologiques, de traçage rétrograde, d'analyse de microglies ou d'injection locale de virus afin d'évaluer les modifications comportementales éventuelles induites par l'inactivation sélective de ces récepteurs.

Cette approche intégrée de l'impact de l'absence d'un sous-type de récepteur de la sérotonine sur le fonctionnement du système nerveux central nécessite d'utiliser des animaux pour pouvoir tirer des conclusions fonctionnelles.

Ce projet s'inscrit dans le cadre des 3R (remplacement, réduction, raffinement)

a) Remplacer :

De manière à réduire le nombre d'animaux utilisés, leur remplacement par une approche cellulaire est toujours privilégié, culture primaire de microglies mais aussi lignées cellulaires transfectées lorsque la question scientifique posée le permet. Cependant pour étudier les effets de mutations génétiques sur le comportement, nous devons utiliser le modèle murin qui est le seul modèle permettant de modéliser les pathologies du système nerveux central.

b) Réduire :

Une étude statistique a été réalisée pour déterminer le nombre d'animaux nécessaire pour chaque lot à partir de nos expériences précédentes à 10 souris par groupe d'études des comportements associés à la sérotonine. Ainsi nous avons réduit ce nombre au strict minimum nécessaire à atteindre la puissance statistique requise. Afin de restreindre encore la quantité, les animaux sont utilisés pour une série de test lorsque l'impact d'un premier test comportemental n'intervient pas sur les tests subséquents.

c) Raffiner :

Les animaux sont hébergés en groupe sociaux de 5 individus maximums et ils disposent dans chaque cage d'un enrichissement de nidification. Une surveillance quotidienne est réalisée pour vérifier la bonne santé des animaux. Dans le cas d'animaux importés de fournisseurs extérieurs, une période d'acclimation d'au moins 1 semaine est respectée.

Dans le cadre des procédures expérimentales la douleur est prise en compte par différents médicaments analgésiques. Un raffinement de la qualité de vie des animaux est obtenu, en réduisant la durée d'expérimentation et en prévoyant des anesthésiques et analgésiques en cas d'intervention invasive.

Le nombre d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats robustes non-contestables est de 1920 souris pour les cinq années à venir.

18042 La sérotonine est un neurotransmetteur du système nerveux central impliquée dans de nombreuses fonctions ; parmi les plus connues, on peut citer la dépression, les antidépresseurs ayant pour action l'élévation des niveaux de sérotonine dans le cerveau et par conséquent la stimulation de ses récepteurs. L'étude de l'élimination génétique d'un de ses récepteurs chez la souris reproduit en partie les changements de comportement associés à certaines mutations trouvées chez l'homme dans le gène codant pour ce même récepteur. De plus l'utilisation de composés bloquant ce récepteur pourrait avoir un intérêt thérapeutique. L'évaluation de l'impact de l'absence de ce récepteur sur le comportement, reproduisant ces variants génétiques chez l'animal est donc de première importance.

De manière complémentaire aux observations chez l'homme, des premières données chez la souris indiquent que l'absence de ce récepteur favorise une impulsivité anormale ainsi que les comportements dépressifs. Le but de nos travaux actuels est donc d'affiner nos données obtenues chez ces souris qui corroborent les données de clinique humaines afin de comprendre plus en détail les fonctions cérébrales contrôlées par ce récepteur et ainsi d'en comprendre les pathologies associées, incluant le comportement dépressif.

Une technique récemment développée permet de réduire l'impact éventuel d'anomalies développementales induite par la mutation des gènes d'intérêt qui pourrait être délétère pour l'animal. Elle consiste en l'utilisation d'inactivation conditionnelle des gènes permettant de la limiter à un tissu précis où se fait cette inactivation et de rendre les phénotypes de ces animaux non-dommageables.

Ce projet a donc pour but de comprendre comment un des récepteurs de la sérotonine intervient dans le comportement mais aussi dans certaines maladies à composantes génétiques comme la dépression. Pour cela nous prévoyons d'étudier les phénotypes observés après une invalidation conditionnelle du récepteur uniquement dans les neurones du cerveau produisant la sérotonine chez la souris.

Les souris sont aussi analysées dans une série de tests comportementaux en réponse à certains composés pharmacologiques, afin d'évaluer les modifications comportementales éventuelles

induites par l'inactivation du récepteur, réduction de l'anxiété par des antidépresseurs, activité locomotrice, réduction du réflexe de sursaut ou anhédonie.

Cette approche intégrée de l'impact de l'absence d'un sous-type de récepteur à un neurotransmetteur sur le fonctionnement du système nerveux central nécessite d'utiliser des animaux pour pouvoir tirer des conclusions fonctionnelles.

Ce projet s'inscrit dans le cadre des 3R (remplacement, réduction, raffinement)

a) Remplacer :

De manière à réduire le nombre d'animaux utilisés, leur remplacement par une approche cellulaire est toujours privilégié, culture primaire de neurones mais aussi lignées cellulaires transfectées lorsque la question scientifique posée le permet. Cependant pour étudier les effets de mutations génétiques sur le comportement, nous devons utiliser le modèle murin qui est le seul modèle permettant de modéliser les pathologies du système nerveux central.

b) Réduire :

Une étude statistique a été réalisée pour déterminer le nombre d'animaux nécessaire pour chaque lot à partir de nos expériences précédentes à 10 souris par groupe d'études des comportements associés à la sérotonine. Ainsi nous avons réduit ce nombre au strict minimum nécessaire à atteindre la puissance statistique requise. Afin de restreindre encore la quantité, les animaux sont utilisés pour une série de test lorsque l'impact d'un premier test comportemental n'intervient pas sur les tests subséquents.

c) Raffiner :

Les animaux sont hébergés en groupe sociaux de 5 individus maximums et ils disposent dans chaque cage d'un enrichissement de nidification. Une surveillance quotidienne est réalisée pour vérifier la bonne santé des animaux. Dans le cas d'animaux importés de fournisseurs extérieurs, une période d'acclimation d'au moins 1 semaine est respectée.

Dans le cadre des procédures expérimentales la douleur est prise en compte par différents médicaments analgésiques. Un raffinement de la qualité de vie des animaux est obtenu, en réduisant la durée d'expérimentation et en prévoyant des anesthésiques et analgésiques en cas d'intervention invasive.

Le nombre d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats robustes non-contestables est de 1120 souris pour les cinq années à venir.

18043 La sérotonine est un neurotransmetteur du système nerveux central impliquée dans de nombreuses fonctions ; parmi les plus connues, on peut citer la dépression, les antidépresseurs ayant pour action l'élévation des niveaux de sérotonine dans le cerveau et par conséquent la stimulation de ses récepteurs. L'étude de l'élimination génétique d'un de ses récepteurs chez la souris reproduit en partie les changements de comportement associés à certaines mutations trouvées chez l'homme dans le gène codant pour ce même récepteur. De plus l'utilisation de composés bloquant ce récepteur qui pourraient avoir un intérêt thérapeutique. L'évaluation de l'impact de l'absence de ce récepteur sur le comportement, reproduisant ces variants génétiques chez l'animal est donc de première importance.

Des premières données chez la souris indiquent que l'absence de ce récepteur favorise une impulsivité anormale ainsi que les comportements type autistique ou psychotique. Le but de nos travaux actuels est donc d'affiner nos données obtenues chez ces souris qui corroborent les données de clinique humaines afin de comprendre plus en détail les fonctions cérébrales contrôlées par ce récepteur et ainsi d'en comprendre les pathologies associées, impulsivité, autisme, ou encore comportement psychotique.

Une technique récemment développée permet de réduire l'impact éventuel d'anomalies développementales induite par la mutation des gènes d'intérêt qui pourrait être délétère pour l'animal. Elle consiste en l'utilisation d'inactivation conditionnelle des gènes permettant de la limiter à un tissu précis où se fait cette inactivation et de rendre les phénotypes de ces animaux non-dommageables.

Ce projet a donc pour but de comprendre comment un des récepteurs de la sérotonine intervient dans le comportement mais aussi dans certaines maladies à composantes génétiques et inflammatoires comme les troubles du spectre de l'autisme, la schizophrénie ou encore les maladies neurodégénératives. Pour cela nous prévoyons d'étudier les phénotypes observés après une invalidation conditionnelle du récepteur uniquement les cellules immunitaires du cerveau (microglies) de manière permanente ou à certains moments de la vie.

Ces souris sont aussi analysées dans une série de tests comportementaux en réponse à certains composés pharmacologiques, de traçage rétrograde, d'analyse de microglies ou d'injection locale de virus afin d'évaluer les modifications comportementales éventuelles induites par l'inactivation sélective de ces récepteurs.

Cette approche intégrée de l'impact de l'absence d'un sous-type de récepteur de la sérotonine sur le fonctionnement du système nerveux central nécessite d'utiliser des animaux pour pouvoir tirer des conclusions fonctionnelles.

Ce projet s'inscrit dans le cadre des 3R (remplacement, réduction, raffinement)

a) Remplacer :

De manière à réduire le nombre d'animaux utilisés, leur remplacement par une approche cellulaire est toujours privilégié, culture primaire de microglies mais aussi lignées cellulaires transfectées lorsque la question scientifique posée le permet. Cependant pour étudier les effets de mutations génétiques sur le comportement, nous devons utiliser le modèle murin qui est le seul modèle permettant de modéliser les pathologies du système nerveux central.

b) Réduire :

Une étude statistique a été réalisée pour déterminer le nombre d'animaux nécessaire pour chaque lot à partir de nos expériences précédentes à 10 souris par groupe d'études des comportements associés à la sérotonine. Ainsi nous avons réduit ce nombre au strict minimum nécessaire à atteindre la puissance statistique requise. Afin de restreindre encore la quantité, les animaux sont utilisés pour une série de test lorsque l'impact d'un premier test comportemental n'intervient pas sur les tests subséquents.

c) Raffiner :

Les animaux sont hébergés en groupe sociaux de 5 individus maximums et ils disposent dans chaque cage d'un enrichissement de nidification. Une surveillance quotidienne est réalisée pour vérifier la bonne santé des animaux. Dans le cas d'animaux importés de fournisseurs extérieurs, une période d'acclimation d'au moins 1 semaine est respectée.

Dans le cadre des procédures expérimentales la douleur est prise en compte par différents médicaments analgésiques. Un raffinement de la qualité de vie des animaux est obtenu, en réduisant la durée d'expérimentation et en prévoyant des anesthésiques et analgésiques en cas d'intervention invasive.

Le nombre d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats robustes non-contestables est de 2240 souris pour les cinq années à venir.

18044 La résistance des bactéries aux antibiotiques est devenu un enjeu majeur de santé publique qui pourrait, selon certaines estimations, devenir la première cause de mortalité en 2050. C'est un problème particulièrement accru pour le groupe de bactéries dit ESKAPE (comprenant *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, et les espèces *Enterobacter*) mais aussi notamment l'espèce *Klebsiella pneumoniae*. Face à ce problème de santé publique, il devient donc nécessaire de développer de nouveaux antibiotiques, mais aussi de mieux comprendre les interactions moléculaires et cellulaires entre les bactéries et l'hôte qu'elles infectent. Cette dernière connaissance nous permettra d'envisager de nouvelles et originales cibles thérapeutiques.

K. pneumoniae est composée de trois sous-espèces très proches, mais qui causent des pathologies très différentes. *K. pneumoniae* subspecies *pneumoniae* cause de nombreux types d'infection telles que pneumonies et septicémies. *K. pneumoniae* subspecies *ozaenae* cause l'ozène, une rhinite

atrophique chronique. *K. pneumoniae* subspecies *rhinoscleromatis* est l'agent responsable du rhinosclérome chez l'homme, une infection granulomateuse chronique des voies aériennes supérieures. *K. rhinoscleromatis* est atypique car c'est un pathogène considéré comme intracellulaire contrairement à *K. pneumoniae* qui est extracellulaire. Par histologie, on observe des cellules de Mikulicz, qui sont des macrophages spumeux, avec un cytoplasme comportant de nombreuses vacuoles dans lesquelles survivent et prolifèrent les bactéries.

Les caractéristiques physiopathologiques de *K. pneumoniae* et *K. rhinoscleromatis* font de ces bactéries un modèle d'étude intéressant et avantageux et représentent un paradigme d'infections aiguës et chroniques. Il existe en effet un bon modèle murin de pneumonie et de septicémie qui reflète parfaitement la maladie humaine pour *K. pneumoniae*. Nous avons de plus développé un modèle murin du rhinosclérome qui reproduit la formation des cellules de Mikulicz. Il nous est donc possible d'étudier et caractériser des mutants spécifiques, d'utiliser des animaux génétiquement invalidés ou transgéniques et de développer des méthodes innovantes d'analyses qui nous permettront de comparer la physiopathologie de ces deux bactéries.

Notre projet vise à comprendre plus précisément quels sont les facteurs de virulence spécifiques à *K. rhinoscleromatis* et *K. pneumoniae* et déterminer les mécanismes d'action de ces facteurs de virulence au niveau cellulaire et de l'organisme entier (effet sur le contrôle ou la modification de la réponse immune de l'hôte). Spécifiquement, nous étudierons ici les processus de recrutement des monocytes et leur maturation en cellules de Mikulicz lors d'infection par *K. rhinoscleromatis*, par comparaison avec *K. pneumoniae*.

La règle des 3R a été prise en compte dans ce projet.

Remplacement : L'utilisation du modèle animal est indispensable pour l'étude dans le contexte de l'organisme entier de ces facteurs de virulence et de la réponse de l'hôte. Ces réponses faisant appel à l'action de différents types cellulaires interagissant entre eux, elles ne peuvent être appréhendées que chez l'animal.

Réduction : les groupes d'animaux ont été réduits au minimum tout en permettant d'obtenir des résultats significatifs. Ainsi, l'étude de la réponse de l'hôte et en particulier le rôle des monocytes macrophages nécessitera un total de 450 souris. L'utilisation de chaque animal sera optimisée en effectuant différents types d'analyses sur un même animal (numération bactérienne, FACS et microscopie).

Raffinement : Le projet a été construit en intégrant les mesures permettant de réduire le stress et si possible, la souffrance des animaux (raffinement). Une période d'acclimatation d'une semaine dans la nouvelle animalerie est observée avant le début des expériences. De plus, un enrichissement sera utilisé et des méthodes pour réduire certains effets de l'infection, comme la déshydratation, sans interférer avec la pathologie, ont été mises en place.

18045 La formation du cortex cérébral dépend de la mise en place, lors du développement embryonnaire, des différents types neuronaux. Ces neurones subissent des migrations, régulées de manière spatiotemporelle, afin d'atteindre leur localisation au sein du cerveau mature. La perturbation de ces migrations neuronales peut entraîner des anomalies corticales, défauts fréquemment observés dans différentes pathologies neurologiques. Le présent projet vise à déterminer comment des anomalies du développement cortical peuvent influencer la progression d'une pathologie neurodégénérative tel que la maladie de Huntington. Cette maladie héréditaire est causée par une mutation du gène codant la huntingtine. Les symptômes typiques apparaissent chez l'adulte, et incluent une altération profonde et sévère des capacités physiques et intellectuelles (dont un dysfonctionnement moteur progressif, un déclin cognitif et des troubles psychiatriques). Les patients meurent habituellement 15-20 ans après l'apparition des premiers symptômes et il n'existe pas, à l'heure actuelle, de traitements efficaces pour prévenir ou retarder la progression de cette maladie. En France, 12.000 patients sont touchés et environ 6.000 personnes développeront la maladie dans les 20 prochaines années. Développer de nouvelles stratégies thérapeutiques nécessite donc la compréhension des mécanismes physiopathologiques de la maladie. Ce projet vise à étudier,

pendant 5 ans, le rôle de la huntingtine mutée depuis le développement du cortex cérébral jusqu'aux potentielles conséquences à l'âge adulte.

Nous avons pris soin de considérer les principes de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ».

Remplacer : l'utilisation de l'animal est indispensable. Il n'y a pas d'alternative par des modèles in vitro pour étudier la complexité du développement du cerveau.

Réduire : Le nombre d'animaux a été réduit au minimum pour pouvoir atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus. Le nombre d'animaux a été déterminé en prenant en compte les lignées murines génétiquement modifiées nécessaires à l'étude et en réduisant au maximum le nombre d'animaux afin d'obtenir des résultats significativement exploitables et valides.

Raffiner : Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries.

Paramètres environnementaux d'hébergement :

- Les cages sont maintenues en portoirs ventilés avec un système d'abreuvement automatique et un accès ad libitum à la nourriture

- Les conditions de température et d'hygrométrie sont contrôlées et monitorées.

- Le cycle d'éclairage est de 12h par jour (6h-18h)

- Les animaux sont hébergés avec leurs congénères (6 par cage maximum) et l'isolement est évité au maximum, et le milieu est enrichi avec un nid dans chaque cage

Les souris seront régulièrement observées et euthanasiées dans le cas d'une altération très grave du pelage avec ulcération et risque d'infection de la peau, ou un comportement de prostration dans la cage.

Les rongeurs bénéficieront d'une anesthésie générale fixe et les expériences seront menées afin de limiter au maximum la douleur de l'animal.

Sachant que le but de ce projet et de suivre le développement de ces animaux, nous allons nous focaliser sur les âges suivant : jour post-natal 0 et 10 (P0 et P10), lorsqu'une croissance axonale intense et une dendritogénèse se produisent et P21, lorsque le cortex est mature. Enfin, nous utiliseront des souris adultes à 6 mois et 12 mois pour considérer les effets tardifs de la mutation. Pour ce projet, nous prévoyons d'utiliser 520 souris (104 souris par an).

18046 Au-delà des fonctions énergétiques de l'ATP, cette molécule joue également un rôle physiologique fondamental en tant que messenger extracellulaire permettant aux cellules et aux tissus de communiquer les uns avec les autres. Bien que l'ATP puisse être libérée dans des conditions physiologiques par des mécanismes non lytiques, il peut également l'être suite à une nécrose cellulaire conditionnée par un choc traumatique, des lésions d'organes ou un développement tumoral. La présence d'ATP extracellulaire, au contact de cellules cancéreuses, peut alors entraîner leur mort et ainsi contrôler la progression tumorale. Les progrès de l'immunothérapie ont récemment levé un voile supplémentaire sur le rôle de l'ATP dans l'inhibition de la croissance tumorale. En effet, l'ATP, en plus d'agir directement sur les cellules cancéreuses, exerce également une attraction sur les cellules du système immunitaire qui viennent alors lyser les cellules tumorales. Notre objectif est de caractériser de nouvelles stratégies thérapeutiques capables d'accroître la concentration dans la tumeur de l'ATP extracellulaire afin d'augmenter l'efficacité des immunothérapies. Notre approche repose sur l'utilisation de petites molécules qui, contrairement, aux anticorps thérapeutiques, montrent, en raison de leur taille, une meilleure diffusion au cœur de la tumeur et représentent un coût financier limité pour la communauté.

Le présent projet est complémentaire à un projet déjà autorisé. Notre objectif est d'analyser par imagerie non invasive de Tomographie à Emission de Positons (TEP) couplé à de la Tomodensitométrie au rayons X (TDM ou scanner anatomique) au fluorodésoxyglucose 18F-FDG (analogue radiopharmaceutique du glucose) la consommation de glucose au niveau des tumeurs et de suivre l'efficacité des nouvelles stratégies thérapeutiques que nous proposons. En complément, l'imagerie moléculaire de TEP avec un radioligand de l'intégrine $\alpha\beta3$ pourrait donner

des informations sur l'angiogenèse des tumeurs. L'imagerie non invasive, in vivo, sous anesthésie permet des analyses et un recueil de données longitudinales qui contribueront à la réduction et au raffinement. A la fin de l'étude expérimentale, les animaux seront sacrifiés et les tumeurs prélevées pour poursuivre nos recherches sur l'action de nos molécules au niveau de l'infiltration tumorale des cellules du système immunitaire au sein des tumeurs prélevées. Au total, ce protocole nécessitera un effectif maximum de 144 souris issues d'un projet déjà autorisé sur une durée de 3 années.

Nous mettons tout en œuvre pour respecter la règle des 3R :

Remplacement : Des études in vivo déjà menées sur des souris immunodéficientes ont permis de sélectionner/affiner au mieux les conditions expérimentales du projet afin de réduire au maximum le nombre d'animaux impliqués dans cette étude. Néanmoins, l'étude de l'infiltration des cellules du système immunitaire ne peut être conduite qu'in vivo sur des modèles de souris immunocompétentes. Pour cela, nous avons choisi des modèles syngéniques de tumeurs au profil de réponse variable à l'immunothérapie afin d'évaluer l'effet de nos molécules sur l'infiltration des cellules du système immunitaire et l'intérêt de les combiner aux immunothérapies aujourd'hui utilisées. Aujourd'hui, il n'existe pas de modèles alternatifs au modèle animal proposé ici qui est le seul capable de recréer l'ensemble des acteurs impliqués dans le développement tumoral et l'action des traitements étudiés.

L'imagerie non invasive, in vivo, sous anesthésie permet des analyses et un recueil de données longitudinales qui contribueront à la réduction et au raffinement.

Réduction : Nous limitons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables. La taille des groupes a été déterminée sur la base du calcul de puissance tiré d'études similaires menées dans le passé sur des souris « nude ». A cause des variabilités inter-animales et intergroupes, un nombre trop restreint d'animaux engendrerait néanmoins des résultats trop variables et non valides. Le nombre de souris que nous avons déterminé nous permettra ainsi d'avoir suffisamment d'animaux pour avoir des statistiques. Les règles éthiques seront toujours respectées au cours de notre protocole et nous veillerons à surveiller les points limites que nous nous sommes fixés. A la fin de l'étude expérimentale, les animaux seront euthanasiés et les tumeurs prélevées pour poursuivre nos recherches sur l'action de nos molécules au niveau de l'infiltration tumorale des cellules du système immunitaire au sein des tumeurs prélevées.

Raffinement: Les conditions d'hébergement des souris sont conformes à la réglementation, les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum. Le milieu est enrichi à l'aide de maison de type igloo. Nous garantissons le bien-être des animaux en cours de procédure grâce à une surveillance attentive et des soins adaptés. Lors de l'anesthésie la respiration des animaux est fréquemment surveillée visuellement. Un tapis chauffant garde l'animal à une bonne température afin d'éviter l'hypothermie due à l'anesthésie. Tous les animaux sont stabulés dans une salle d'hébergement en surpression, en enceintes ventilées en pression positive et un accès ad libitum à la nourriture. Les conditions de température et d'hygrométrie sont contrôlées et monitorées. Les animaux sont hébergés avec leurs congénères.

18047 La maladie de Parkinson (MP) touche jusqu'à 4% des personnes âgées de plus de 65 ans et est la deuxième maladie neurodégénérative la plus répandue. Elle est causée par une perte de neurones dopaminergiques entraînant des symptômes moteurs. La reconstitution des niveaux normaux de dopamine via l'administration de L-Dopa est le traitement le plus courant de la maladie de Parkinson. La L-Dopa atténue de nombreux symptômes, mais induit des mouvements incontrôlables (dyskinésie) provoquant ainsi des effets secondaires débilissants, avec un taux d'incidence de 9 à 80% après 5 à 10 ans de traitement chronique.

Le champ de recherche de la maladie de Parkinson s'est également déplacé ces dernières années vers une meilleure compréhension des symptômes non-moteurs associés à la MP, à savoir la dépression dont 50% des patients en souffrent. La physiopathologie de la dépression liée à la maladie de Parkinson se distingue de la dépression mais, les causes ne sont pas bien comprises.

L'hypothèse de ce projet est que certains récepteurs de la sérotonine (neurotransmetteur impliqué dans la dépression) peuvent être des médiateurs importants des symptômes moteurs et des symptômes dépressifs de la maladie de Parkinson et peuvent donc constituer une nouvelle cible thérapeutique. Pour tester cette hypothèse, des souris C57Bl/6 ainsi que deux lignées transgéniques sur le même fond génétique seront utilisées. L'effet de la modulation de l'activité des récepteurs sérotoninergiques et de l'administration de L-Dopa sur la fonction motrice et la dépression dans un contexte maladie de parkinson seront évaluées par des tests de comportement et des analyses biochimiques.

Ce projet nécessite 1080 souris pour une durée de 5 ans. Ce projet sera réalisé dans le respect de la règle des 3Rs et met en jeu des procédures chirurgicales et des tests de comportement. Remplacer : L'utilisation d'un modèle animal est une nécessité car il n'y a pas de méthode alternative pour l'étude du cerveau dans sa globalité. Réduction : Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est le minimum nécessaire permettant une analyse statistique robuste des résultats. Raffinement : Pour éviter toute souffrance, les procédures de chirurgie se feront sous analgésie et anesthésie générale. Les souris seront observées régulièrement et une grille précise d'évaluation des points limites sera utilisée. Tout signe de douleur, souffrance, angoisse ou stress chez les animaux sera soulagé avec des analgésiques.

A terme, ce projet vise à identifier et à valider une nouvelle cible pour le traitement de la dyskinésie induite par la L-Dopa et de la dépression lié à la maladie de Parkinson.

18048 La ménopause accroît la mortalité cardiovasculaire du fait notamment d'une augmentation du risque de rupture des plaques d'athérosclérose. Les plaques qui se rompent sont caractérisées par la présence d'un important cœur lipidique, de cellules inflammatoires et de microcalcifications. Ces dernières exercent un stress mécanique sur la chape fibreuse et un stress inflammatoire sur les macrophages. Elles évoluent ensuite vers des macrocalcifications, stabilisatrices, dans les phases de résolution de l'inflammation. La raison pour laquelle un score calcique vasculaire élevé augmente le risque de mortalité reposerait sur la présence, chez un même individu, de plaques lourdement calcifiées stables et de plaques contenant des microcalcifications instables. Les femmes ménopausées développent également souvent une ostéoporose, dont la sévérité est corrélée au score calcique vasculaire. Beaucoup sont traitées par un fragment de la parathormone, le teriparatide, qui a un effet osseux anabolique. De façon surprenante, seule une étude préclinique a questionné de façon partielle l'effet du teriparatide sur la calcification et l'évolution des plaques d'athérosclérose. Nos objectifs sont donc de déterminer ses effets vasculaires et osseux chez la souris athérosclérotique ovariectomisée.

40 souris ApoE^{-/-} athérosclérotiques seront ovariectomisées pour mimer la ménopause, et traitées quotidiennement par le teriparatide. Le traitement sera arrêté à un âge précoce auquel les souris ne présentent que des microcalcifications, ou tardif auquel des métaplasies cartilagineuses minéralisées sont présentes. Nous quantifierons les calcifications (en histologie et par dosage de calcium), la métaplasie cartilagineuse (histologie, RT-qPCR), la charge lipidique (histologie), l'inflammation (histologie, RT-qPCR, ELISA) dans les plaques carotidiennes, de l'arche aortique et de l'aorte abdominale. Nous déterminerons également les effets du teriparatide sur le remodelage osseux (histomorphométrie et dosages sanguins) et l'architecture osseuse (μ CT).

Notre hypothèse est que 1) le teriparatide corrige la corrélation inverse qui existe entre le score calcique vasculaire et le contenu minéral osseux, et 2) que le teriparatide agit sur les microcalcifications (délétères) et/ou les macrocalcifications (stabilisatrices). La compréhension des effets vasculaires du teriparatide nous paraît cruciale, d'autant plus qu'un autre traitement ostéo-anabolique en cours de développement, le romosozumab, présente des effets délétères vasculaires chez les femmes âgées qui préoccupent la communauté des cardiologues.

Dans cette étude, le principe des 3R a été scrupuleusement pris en compte.

Remplacer les modèles animaux par d'autres modèles : le but du projet est de déterminer l'effet d'un traitement anti-ostéoporotique sur la calcification et la stabilité des plaques d'athérosclérose chez la souris ovariectomisée. Il s'agit d'un projet qui explore les effets secondaires vasculaires d'un

traitement à ciblage osseux, qui ne peut donc pas s'aborder avec des approches de cultures cellulaires. Les cultures cellulaires sont inadéquates pour reproduire la complexité de la plaque d'athérosclérose. La plaque est en effet un tissu hétérogène qui contient notamment un cœur lipidique et une région fibreuse, et héberge plusieurs types cellulaires dont des cellules musculaires lisses à différents stades de trans-différenciation, des macrophages qui montrent des signes progressifs de cellules spumeuses, et également des débris apoptotiques, nécrotiques et nécroptotiques. Le traitement par le téraparatide, en ciblant la calcification des plaques est susceptible d'impacter l'ensemble de ces paramètres, ce qui ne peut donc pas être appréhendé par des cultures ou même des co-cultures cellulaires.

Réduire le nombre d'animaux utilisés : le nombre d'animaux nécessaire a été déterminé statistiquement (détaillé dans le paragraphe 3. 3. 5).

Raffiner, réduire la douleur et le stress des animaux : les souris déficientes en apolipoprotéine E (il s'agit du principal modèle murin d'athérosclérose utilisé depuis plusieurs décennies) femelles seront livrées à l'âge de 8 semaines et acclimatées pendant 2 semaines dans l'animalerie avant d'être nourries par un régime riche en graisses pour permettre le développement de l'athérosclérose. Elles seront ovariectomisées à l'âge de 20 semaines afin d'induire une carence oestrogénique et l'installation d'une ostéoporose. Ce modèle a été utilisé de nombreuses fois pour se placer dans un contexte de vieillissement féminin associant ostéoporose et athérosclérose. Les souris seront traitées par le téraparatide (un traitement anti-ostéoporotique utilisé aujourd'hui en clinique humaine), qui n'a pas été rapporté induire de douleurs ou complications particulières. Nos souris seront sacrifiées en point final à un âge relativement jeune de 32 semaines, bien inférieur à l'âge de plus d'un an que ces mêmes souris atteignent sous traitement par téraparatide.

18049 La maladie de Kawasaki ou "Syndrome lympho-cutanéomuqueux". C'est une vascularite c'est-à-dire une maladie caractérisée par une inflammation systémique des vaisseaux sanguins qui peut être associée à des complications cardiaques à court, moyen et long terme.

L'un de nos partenaires a développé une molécule dans le cadre d'une autre application thérapeutique cardiaque, mais dont le mécanisme d'action unique permettrait de réduire l'incidence des complications cardiovasculaires.

Pour cela, nous souhaitons mettre en place un modèle animal de la pathologie et ensuite traiter les animaux avec ce composé. Actuellement, un modèle utilisant la Souris a été développé et décrit à plusieurs reprises dans la littérature. Il est induit par une injection d'un extrait de paroi cellulaire de la bactérie *Lactobacillus casei* (LCWE) et mime de manière assez spécifique les caractéristiques inflammatoires et histopathologique des lésions cardiovasculaires observées dans la maladie de Kawasaki.

Nous avons prévu dans un premier temps de valider ce modèle sur un nombre restreint d'animaux afin de mettre en évidence la chronologie d'apparition des dilatations et leurs amplitudes. Pour cela, nous prévoyons donc d'utiliser 10 souris qui recevront ce traitement au LCWE et seront suivis par échographie.

Ensuite, nous prévoyons une seconde étape, utilisant 75 animaux. Cela correspond à 3 groupes expérimentaux de 25 animaux : contrôles, traité au LCWE et traité au LCWE + composé

Ces 25 animaux dans l'effectif initial de chaque groupe sont nécessaires pour obtenir un suivi de la fonction cardiaque sur toute la durée du projet et permettre une analyse histologique à différents temps.

Des analyses fonctionnelles et histologiques sont ainsi prévues pour confirmer l'effet thérapeutique et essayer de mettre en évidence une nouvelle application du traitement.

REDUCTION : Pour l'étude de la fonction cardiaque, 10 animaux sont nécessaires. Cela correspond à l'effectif idéal en tenant compte de la variabilité observée dans la littérature pour ce modèle. 5 animaux sont requis pour l'analyse histologique. Un total de 85 animaux seront employés dans ce projet.

REPLACEMENT : Il n'existe actuellement pas de possibilité de modéliser l'efficacité thérapeutique des molécules sur cette composante de la maladie étudiée dans un modèle *in vitro* ou *in silico*. Le modèle Souris est le plus adapté et le mieux validé pour cet usage

RAFFINEMENT : tous les efforts sont entrepris pour permettre de maintenir un niveau de bien-être des animaux malgré l'apparition potentielle d'une fatigue et d'un risque d'anévrisme aortique. Ainsi, les animaux sont observés quotidiennement, pesés de manière hebdomadaire. En cas de baisse de poids sur une semaine, de prostration ou de diminution de la mobilité, une nourriture en gel sera placée dans la cage pour faciliter l'alimentation. De plus, durant les procédures d'échographie, une anesthésie gazeuse sera pratiquée pour permettre une absence de stress des animaux, les yeux seront humidifiés avec un gel ophtalmique pour éviter un dessèchement de la cornée.

18050 Contexte scientifique, médical et social :

Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) sont un enjeu majeur de santé publique en France car responsables de la troisième cause de mortalité et de la première cause de handicap acquis. La majorité des AVC est causée par la présence d'un caillot dans une artère du cerveau, on parle alors d'infarctus cérébral. Le seul traitement possible est de déboucher l'artère occluse. Bien que bénéfique, cela provoque également des lésions supplémentaires incluant la mort des cellules du cerveau, notamment les neurones. L'administration de traitement neuroprotecteur au moment de la ré-ouverture de l'artère reste la seule solution pour améliorer le devenir des patients. Une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents constitue donc un grand challenge pour les scientifiques afin d'identifier de nouvelles cibles pour les traitements.

Description des objectifs du projet :

Notre projet a donc pour objectif général d'isoler des cellules de cerveau (neurones notamment) d'embryons de souris afin d'une part, d'étudier les mécanismes au cours de l'AVC et d'autre part, de tester de nouveaux traitements. La mise en culture de cellules neuronales viables n'est en effet possible que sur embryons. L'analyse sur cellules de cerveau de souris est un modèle fondamental de référence pour étudier les mécanismes de l'AVC, qui est largement utilisé dans la littérature et maîtrisé par notre laboratoire. Aussi, cette étude préliminaire sur cellules (*in vitro*) nous permettra d'identifier de nouveaux traitements, avant d'envisager tout projet de grande envergure sur nos modèle de souris d'intérêt (*in vivo*), dans un souci de réduction. Ce projet comporte donc 1 procédure pour un total maximal de 192 souris (maximum) sur 1 an.

Conformité à la règle des 3R :

Remplacement: Notre étude ayant pour but de déterminer les mécanismes de l'AVC et d'évaluer l'effet neuroprotecteur de nouveaux traitements, le recours à l'expérimentation animale est nécessaire car il n'existe pas de lignée cellulaire avec la fonction du neurone.

Réduction: Le nombre d'animaux par procédure a été calculé à l'aide d'un logiciel de statistiques afin de déterminer le plus précisément possible le nombre minimal d'animaux permettant d'obtenir des résultats statistiquement exploitables, soit au maximum 192 animaux sur 1 an.

Raffiner: Dans le but d'améliorer le bien-être des animaux et ce, dès leur arrivée dans notre animalerie, un enrichissement de milieu et de nidification est mis en place et renouvelé très régulièrement. Les méthodes utilisées pour la mise à mort des animaux sont choisies parmi celles autorisées, à la fois rapides, indolores et compatibles avec les exigences du prélèvement de tissus fragiles.

18051 Les maladies métaboliques telles que le diabète peuvent entraîner diverses complications, notamment au niveau de la peau avec les ulcérations ou plaies cutanées chroniques. Plusieurs études ont mis en évidence une diminution de la cicatrisation des plaies chez des sujets diabétiques. Cette mauvaise réparation tissulaire est souvent la conséquence d'une altération au niveau du recrutement, de la prolifération des cellules et d'une perte des fonctions endothéliales et immunes, essentielles à la cicatrisation.

A travers cette étude, nous souhaitons évaluer les propriétés de 8 extraits de plantes sur la régénération tissulaire chez le poisson-zèbre. La toxicité de chacun de ces extraits a été déterminée

in vivo sur des embryons de poisson zèbre. Nous travaillerons à la concentration maximale non toxique de chacun de ces extraits.

Pour cela, nous souhaitons effectuer une amputation partielle de la nageoire caudale des poissons et les incuber (par balnéation) pendant 7 jours avec :

- Aucun extrait (contrôle) : 15 poissons transgéniques (Tg) mpeg:mcherry et 15 poissons Tg Fli :GFP
- L'extrait 1 : 15 poissons Tg mpeg:mcherry et 15 poissons Tg fli :GFP
- L'extrait 2 : 15 poissons Tg mpeg:mcherry et 15 poissons Tg fli :GFP
- L'extrait 3 : 15 poissons Tg mpeg:mcherry et 15 poissons Tg fli :GFP
- L'extrait 4 : 15 poissons Tg mpeg:mcherry et 15 poissons Tg fli :GFP
- L'extrait 5 : 15 poissons Tg mpeg:mcherry et 15 poissons Tg fli :GFP
- L'extrait 6 : 15 poissons Tg mpeg:mcherry et 15 poissons Tg fli :GFP
- L'extrait 7 : 15 poissons Tg mpeg:mcherry et 15 poissons Tg fli :GFP
- L'extrait 8 : 15 poissons Tg mpeg:mcherry et 15 poissons Tg fli :GFP

Un nombre total maximum de 270 poissons sera utilisé.

Cette étude répond aux 3R

Remplacement : il semble indispensable de passer au modèle animal pour mieux comprendre les effets in vivo de ces extraits de plantes sur la réparation cellulaire, qui est un processus complexe comprenant différentes étapes de ré-épithélialisation, fibroplasie et néovascularisation.

Réduction : les expérimentations ont été conçues afin d'utiliser le moins d'animaux possible. 3 expérimentations indépendantes seront réalisées afin de permettre la réalisation d'études statistiques (One-way ANOVA + Dunnet's test et test t de Student). Les expériences seront réalisées en triplicat : 3 lots x 5 poissons contrôles ou traités (soit 15 poissons Tg mpeg:mcherry et 15 poissons Tg fli:GFP pour chaque condition). Cela permettra d'arrêter l'expérimentation et de limiter le nombre de poissons utilisés si les résultats sont statistiquement suffisants ou si une toxicité insoupçonnée avait lieu. De plus, l'utilisation de poissons transgéniques nous permet de monitorer les activités biologiques in vivo. La lignée (mpeg:mcherry) permettra de visualiser les cellules immunitaires de type macrophage et la lignée (fli:GFP) permettra de visualiser le réseau vasculaire se mettant en place durant l'angiogenèse, pendant l'expérimentation.

Raffinement : les poissons seront placés dans des conditions optimales (cycle jour/nuit : 14h/10h ; température : 28. 5°C ; oxygénation, nourris plusieurs fois par jour à des horaires fixes). Ils seront surveillés quotidiennement. L'amputation de la nageoire caudale sera précédée d'une anesthésie générale. A la suite de cette procédure, les animaux seront surveillés plusieurs fois par jour et tout signe de souffrance sera étudié afin de prendre les mesures adéquates.

18052 Le mannitol est une molécule de la famille des polyols utilisée comme substitut du sucre par l'industrie agroalimentaire. Il présente aussi de multiples applications en médecine du fait de ses propriétés d'osmorégulation, c'est-à-dire de régulation de la pression osmotique exercée par les fluides de part et d'autre des membranes cellulaires. Il est administré aux patients dans certains cas de défaillance rénale afin d'améliorer la diurèse (élimination de l'urine). Il est aussi utilisé dans le traitement de certaines tumeurs cérébrales afin de faciliter le passage des molécules anticancéreuses à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE) protégeant le cerveau. Il permet aussi de réduire la pression intracrânienne survenant dans un contexte d'oedème cérébral c'est-à-dire d'accumulation anormale d'eau dans le tissu cérébral, en favorisant l'élimination d'eau. Le passage de molécules à travers la BHE ainsi que la résorption des oedèmes cérébraux résulteraient de l'action du mannitol sur les cellules de l'endothélium vasculaire. Il est admis que l'administration de mannitol favorise la déshydratation de ces cellules ce qui entraînerait l'ouverture de pores entre les cellules laissant passer les agents thérapeutiques et sortir l'eau. De nouveaux agents d'imagerie cérébrale permettant la reconnaissance spécifique de certaines populations cellulaires ou de lésions (exemple : cellules tumorales, cicatrice gliale...), ou l'imagerie et la destruction sélective de

ces cellules par des agents d'imagerie dits théranostiques sont en cours de développement. L'étude préclinique de la spécificité et de l'efficacité de ces agents ne peut se faire sans recourir à une méthode de vectorisation (les agents d'imagerie sont chimiquement associés à des peptides dits « vecteurs » favorisant le passage à travers la BHE) ou d'ouverture mécanique temporaire de la BHE (application d'ultrasons focalisés ou injection de mannitol). L'injection de mannitol présente l'avantage d'avoir fait ses preuves en clinique depuis de nombreuses années, ce qui serait susceptible d'accélérer l'évaluation en recherche clinique d'agents ayant démontré une efficacité dans les études précliniques.

Toutefois, bien que l'utilisation du mannitol chez l'homme soit relativement bien documentée, son emploi chez l'animal est peu décrit. De plus, il n'existe pas de consensus sur la voie d'administration (ex : intra-artérielle, intraveineuse, intrapéritonéale...), ni sur les doses administrées. Les doses mentionnées dans la littérature sont généralement peu physiologiques et souvent incompatibles avec la survie des animaux car entraînant une déshydratation sévère et sont donc inadaptées aux études longitudinales. Enfin, la dynamique du processus d'ouverture est inconnue, notamment en termes de délai d'attente post-injection et de durée de la fenêtre d'ouverture. Ces informations sont indispensables pour l'administration efficace d'agents d'imagerie et/ou thérapeutiques en recherche préclinique. Le but de ce projet de recherche est d'optimiser l'administration de mannitol chez la souris en privilégiant si possible la méthode la moins invasive. Nous déterminerons la dose permettant l'ouverture de la BHE sans compromettre la survie de l'animal et nous étudierons la dynamique de l'ouverture de la BHE par Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) cérébrale sous anesthésie avec injection d'un agent de contraste (Gd-DOTA). Il sera ainsi possible de suivre les changements de perméabilité de la BHE et de cartographier à la fois temporellement et spatialement son ouverture et sa fermeture. Ce projet nécessitera l'utilisation de 77 souris adultes au maximum sur 12 mois. Les animaux seront explorés sur un spectromètre imageur préclinique opérant à 7T dédié à la souris. Cette étude sera conduite dans le respect du principe éthique des 3 R. L'optimisation de l'administration de mannitol et l'étude de l'ouverture spatiale et temporelle de la barrière hémato-encéphalique nécessitent toutes deux le recours à l'animal. Il n'existe en effet aucune méthode alternative permettant d'étudier la dynamique de l'ouverture d'une barrière hémato-encéphalique complète et fonctionnelle en fonction du mode d'administration du mannitol (intrapéritonéale ou intraveineuse). Cette information ne peut être obtenue que sur le cerveau d'un animal vivant ayant une fonction cardiovasculaire préservée. Par ailleurs, l'identification d'une dose sans effets secondaires délétères requiert l'expérimentation sur l'animal. Nous réduisons le nombre d'animaux grâce à l'utilisation de l'IRM, une méthode non invasive permettant le suivi longitudinal d'un même animal, et l'emploi de tests statistiques pour le calcul de la taille des effectifs. Le raffinement concernera la diminution du stress et de la douleur. L'anesthésie sera utilisée pour les injections et les explorations par IRM. Les points limites préalablement définis seront strictement respectés. Un délai d'acclimatation minimum de 10 jours et une habitude à l'expérimentateur seront assurés. Les animaux seront hébergés en groupes sociaux (3 à 5 animaux par cage), avec cycle jour/nuit, nourriture et boisson ad libitum et enrichissement environnemental. Les cages contiendront des rondins de bois à ronger, du coton pour la nidification, un refuge en plastique, et une roue fast-track avec igloo afin de diminuer les comportements agressifs et réduire l'ennui, et favoriser l'expression d'un maximum de comportements naturels (interactions sociales, locomotion, élimination, marquage, repos, fabrication d'un nid, recherche de cachette...).

18053 Le cancer du poumon est la première cause de mortalité par cancer dans le monde et en France. La prise en charge de cette maladie a été révolutionnée par l'avènement des immunothérapies qui permettent d'accroître la réponse du système immunitaire des patients à l'encontre des cellules tumorales. Cependant, à ce jour seul 22% des patients répondent à ces traitements il est donc primordial de mieux déterminer quels sont les patients qui vont répondre à ces traitements et de proposer des combinaisons thérapeutiques permettant d'accroître le nombre de patients qui pourront en bénéficier. Dans ce but, et sur la base de résultats préliminaires obtenus *in vitro*, nous voulons étudier si une chimiothérapie couramment utilisée : le pemetrexed, peut permettre d'accroître la réponse à l'immunothérapie dans un modèle murin que nous maîtrisons bien au laboratoire et qui présente une forte résistance aux immunothérapies. Ce projet repose sur des données préliminaires

robustes obtenues in vitro et in vivo. En effet, nos résultats in vitro ont montré que le pemetrexed change le comportement des cellules cancéreuses qui libèrent alors des signaux de danger susceptible d'accroître le recrutement des cellules immunitaires dans les tumeurs. Ainsi les cellules tumorales seraient mieux détectées par le système immunitaire et les immunothérapies pourraient montrer une efficacité plus importante. Les résultats attendus seront cruciaux pour développer de nouvelles approches thérapeutiques et améliorer la prise en charge des patients atteints de cancer du poumon mais également d'autres types de cancer.

Nous allons transplanter des cellules cancéreuses à des souris présentant un système immunitaire intact. Notre expertise sur ce modèle de cancer du poumon nous permettra de réaliser ces expériences dans les meilleures conditions en suivant la progression de la maladie par scanner et examen des performances physiques et du bien être des animaux. Nous avons également une bonne maîtrise des drogues utilisés dans ces modèles animaux, ainsi ni la chimiothérapie (Pemetrexed), ni l'immunothérapie seront utilisées à des concentrations entraînant des effets secondaires. De plus elles seront administrées sur des durées adaptées pour minimiser les effets secondaires éventuels. Une surveillance particulière sera apportée aux animaux pour détecter précocement tout signe d'effet secondaire. L'intégralité de ce projet de recherche est conceptualisé suivant la règle des trois R : Remplacer, Réduira et Raffiner.

Remplacer :

En amont de ce projet de recherche préclinique chez la souris, nous avons réalisé de nombreuses investigations in vitro validant la nécessité d'aller plus loin pour proposer cette nouvelle combinaison thérapeutique. De plus, des analyses de données provenant de patients ont déjà été réalisées et démontrent l'intérêt de notre projet de recherche dans un contexte clinique. Puisque notre objectif est d'étudier la réponse immunitaire dans les tumeurs, il n'est pas possible de substituer l'animal à un modèle in vitro qui ne peut pas retranscrire la complexité des interactions entre le système immunitaire des patients et les cellules tumorales.

Réduire :

Le nombre d'animaux estimé à 344 individus s'explique par le fait que nous allons comparer 4 conditions de traitements sur 3 modèles cellulaires de cancer du poumon différents. Il est important de considérer que ce projet sera développé suivant quatre phases distinctes et sur une période de deux ans.

Pour réduire au maximum le nombre d'animaux, nous allons utiliser un scanner par tomographie à rayon X. Cette approche permet de suivre le développement des tumeurs du poumon de façon longitudinale et non invasive. Ainsi nous pouvons réduire au minimum le nombre d'animaux en déterminant avec précision le meilleur moment pour chaque intervention (administration de traitement, sacrifice) en fonction de la croissance tumorale. Pour l'analyse du microenvironnement immunitaire des tumeurs, nous avons développé une méthode permettant d'analyser plusieurs tumeurs par souris. Cette approche a nécessité une validation statistique préalable et a permis de montrer que des groupes de 8 souris permettent d'extraire des données robustes. Enfin, nous avons une bonne expertise dans la transplantation des lignées cancéreuses et des traitements qui seront utilisés, ainsi nous pouvons réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés.

Raffiner :

Les animaux seront hébergés (5 par cage) en milieux enrichis, la durée d'hébergement des animaux est réduite au minimum. Le comportement des animaux sera observé quotidiennement pour détecter tout signe de stress et d'agressivité. Si nécessaire un animal agressif pourra être isolé des autres mais pour une durée maximale de 5 jours. Les scanners par tomographie seront réalisés sous anesthésie gazeuse, il s'agit ici de la seule intervention nécessitant l'anesthésie des animaux. Le poids des animaux sera mesuré une fois par semaine et toute perte de poids importante (>10% du poids de l'animal) entraînera l'arrêt de l'expérimentation. Dans les conditions expérimentales définies, les animaux ne souffriront d'aucune difficulté à se mouvoir et à s'alimenter. Au cours de nos expériences antérieures, nous n'avons jamais observé de signe de prostration, de diarrhée ou de déshydratation induite par les traitements qui seront utilisés. Aucune administration d'analgésique ne devrait être nécessaire, notre pratique vise à réduire le plus possible les contacts

avec les animaux pour limiter les contentions et le stress qui y est associé. Perte de poids, diarrhée, prostration, difficulté respiratoire, agressivité et isolement sont tous des critères d'arrêt conduisant au sacrifice des animaux avant la fin du protocole.

18054 Titre: Détermination du connectome cortical à méso-échelle chez le macaque cynomolgus et développement d'une méthodologie connectomique non invasive.

Durée: 60 mois

Mots-clés: singe, anatomie, cerveau, neurone, connexions

Finalité: Recherche fondamentale ; Recherche translationnelle et appliquée

Objectifs et bénéfices escomptés.

Il y a deux raisons pour lesquelles la société bénéficiera d'une meilleure compréhension de l'intelligence biologique. Premièrement, les processus informatiques actuels approchent leurs limites. Mieux connaître les systèmes biologiques pourrait faire émerger plusieurs approches alternatives dans la construction des ordinateurs. Deuxièmement, un certain nombre de facteurs, dont le vieillissement, fragilisent la cognition humaine, faisant de l'amélioration des méthodes thérapeutiques actuelles un impératif de notre société.

Aspect fondamental de nos Recherches. Ces deux préoccupations sociétales nécessitent de progresser dans la compréhension de l'organisation anatomique du cerveau. Le cortex cérébral joue un rôle crucial dans la perception, la cognition, la mémoire et le contrôle moteur. Le signal électrique y est relayé par une succession des neurones individuels formant un dense réseau. Ce réseau du cortex concerne les connexions relayant les signaux entre les 150 aires corticales, chacune spécialisées dans la perception, la cognition ou le contrôle moteur. Connaître la connectivité du cortex permet la construction de son connectome, c'est à dire l'ensemble des connexions entre les aires. Notre objectif de recherche est double. Le macaque est un modèle de choix pour les neuroscientifiques du monde entier, il possède de nombreuses aires corticales similaires à celles de l'homme, avec des propriétés fonctionnelles comparables. En utilisant la technique de référence du traçage de voies neuroanatomiques, nous avons établi la connectivité complète pour 80 des 150 aires corticales. Notre objectif est de compléter l'étude des 70 aires restantes au cours de la période de recherche prévue.

Aspect d'orientation translationnelle du projet. L'expansion du cerveau au cours de l'évolution des espèces entraîne certainement des changements importants dans la connectivité. De fait, la connectivité humaine ne peut être complètement inférée via celle du singe, et le traçage de voie ne saurait être pratiqué chez l'humain. Étant donné qu'un certain nombre de troubles cérébraux impliquent des anomalies de connectivité, il est important de déterminer la connectivité du cerveau humain. Théoriquement, cela peut être réalisé en utilisant une technique d'imagerie (IRM de diffusion) dite technique de tractographie. Cependant, nos travaux ont montré, que la tractographie telle qu'elle est pratiquée actuellement n'est pas une méthode fiable. En effet, les mesures effectuées par tractographie chez le singe donnent une description relativement imprécise de la connectivité telle que déterminée par le traçage de voie. Par conséquent, un deuxième projet consiste à réaliser en parallèle une tractographie et le traçage de voie dans le même cerveau pour déterminer, comment les deux méthodes diffèrent. Cette approche nous permettra de mettre en œuvre des modifications paramétriques de la tractographie de manière à augmenter la convergence entre les deux techniques. Cela permettra à terme d'obtenir des mesures précises de connectivité humaine saine comme pathologique.

Nuisances prévues.

Chaque singe est soumis à 3 procédures successives nécessitant une anesthésie générale. La procédure 1 est une chirurgie avec des analgésiques pre et post-opératoire, les nuisances attendues sont minimales grâce à une surveillance rapprochée de l'animal et des traitements opératoires comparables à la médecine humaine. La procédure 2 consiste en un examen d'IRM de 3 heures sans nuisance puisque ce type d'examen est couramment pratiqué chez le patient et ne pose pas de problème chez l'homme et l'animal. Deux semaines plus tard, la procédure 3 implique l'injection des traceurs. L'ouverture du crâne peut provoquer des saignements qui doivent

impérativement être contrôlés pour le maintien de l'intégrité des tissus cérébraux. Une attention particulière est portée à l'animal après la chirurgie. Une fiche de suivi après les procédures 1 et 3 nous permet d'évaluer en fonction de critères spécifiques à l'espèce les signes indicateurs de gêne ou de souffrance et d'adapter le traitement antidouleurs. 11 à 13 jours après l'étape 3, délai nécessaire pour assurer le transport des traceurs dans le cerveau, l'animal est profondément anesthésié puis euthanasié pour pouvoir analyser le tissu cérébral.

Espèces et nombre d'animaux utilisés: 30 macaques cynomolgus au maximum avec le développement des techniques ce nombre pourra être réduit.

Degré de gravité des procédures : chaque animal va suivre chronologiquement les 3 procédures. La procédure 1 a un degré de gravité modérée, la procédure 2 est légère et la procédure 3 est modérée et se termine par l'euthanasie de l'animal

Remplacement De nos jours l'étude des connexions des neurones peut s'effectuer de deux manières : soit par l'observation microscopique, ce qui nécessite le sacrifice de l'animal, soit par la tractographie. Cette deuxième technique n'est malheureusement pas encore fiable. C'est pourquoi nous réalisons les 2 techniques simultanément, ce qui permettra d'améliorer le système d'analyse par tractographie pour obtenir un résultat identique à l'analyse de traçage neuro-anatomique. Cette stratégie nous permettra à terme de remplacer les expériences invasives en microscopie par l'imagerie.

Réduction Traditionnellement, la connectivité de chaque aire était étudiée en faisant la moyenne de résultats obtenus sur plusieurs individus. Ces études analysaient les tranches de cerveau tous les 1 mm. Nous avons démontré que les analyses réalisées tous les 0,25 mm donnent des résultats fiables et permet de faire 1 seule injection par aire corticale. En outre, nous avons amélioré l'automatisation de notre procédure pour nous permettre d'analyser 2 à 3 traceurs par animal. Au cours de la prochaine période expérimentale, nous procéderons à d'autres modifications afin de pouvoir analyser 3 à 6 traceurs par animal. Cela permettra de réduire considérablement le nombre d'animaux nécessaires. Les 70 aires restantes nécessiteront au maximum 30 singes.

Raffinement Une attention particulière est portée à l'animal après la chirurgie. Une fiche de suivi nous permet d'évaluer en fonction de critères spécifiques à l'espèce les signes indicateurs de gêne ou de souffrance et d'adapter le traitement antalgique si nécessaire. Le suivi de la douleur est évalué par 2 ou 3 personnes indépendantes (expérimentateurs et zootechniciens) ayant suivant les formations réglementaires (niveaux B et A) mais également des formations spécifiques en primatologie et/ou sur le bien-être animal.

18055 L'ostéosarcome est une tumeur osseuse qui touche essentiellement les enfants et les adolescents. Malgré les avancées de la médecine personnalisée, il n'y a eu que de faibles progrès dans le traitement des ostéosarcomes. Lorsqu'une cellule devient anormale, se retrouve hors de son tissu ou est en excès, elle est normalement éliminée par l'activation de signaux internes aboutissant à la mort cellulaire. La capacité à résister au déclenchement de sa propre mort est l'une des caractéristiques acquises par les cellules tumorales, et les ostéosarcomes ne font pas exception à la règle. Afin d'améliorer la prise en charge médicale des ostéosarcomes chez l'enfant et l'adolescent, notre projet a pour objectif de définir l'efficacité d'une thérapie basée sur l'activation d'une voie alternative de mort cellulaire, à l'aide d'un modèle qui va se localiser au niveau du même site anatomique (orthotopique) chez la souris. Cette voie alternative étant susceptible de déclencher une réponse immunitaire, nous étudierons également son efficacité à recruter le système immunitaire.

Les souris subiront une greffe intra-tibiale de cellules tumorales humaines ou murines. Lorsque les tumeurs atteindront 20 mm³, les souris recevront une injection d'un mélange de deux molécules : la première (IFN) induit l'expression d'un récepteur impliqué, en conditions physiologiques, dans la défense immunitaire innée, la seconde (poly(I:C)) entraîne l'activation de ce récepteur. En cas de volume tumoral supérieur à 50 mm³, les souris seront mises à mort. Le protocole sera arrêté lorsque 50% des animaux auront dépassé ce point limite ou en l'absence de développement tumoral 4 semaine après la greffe. Enfin, les tumeurs seront collectées après mise à mort des animaux pour

analyse afin de collecter un maximum d'informations et de données afin de restreindre l'utilisation d'animaux.

Tout au cours de ce projet, les précautions seront prises pour stresser au minimum l'animal. Dès leur arrivée, les souris seront hébergées par groupe de 5 animaux par cage. Dans le but de limiter le stress lié à la captivité, un enrichissement du milieu sera mis en place : du coton sera mis à disposition des souris pour faciliter l'expression d'un comportement naturel. Une période d'acclimatation sera respectée avant l'entrée des animaux dans l'une des procédures présentées ci-après. L'administration d'anesthésique et d'analgésique, un suivi adapté des animaux et la définition précise des points limites précoces et prédictifs d'un mal être, permettent de limiter au maximum la souffrance animale. Suite à la greffe, de la nourriture gélatinée sera ajoutée au fond de la cage au cas où les animaux présenteraient des difficultés à se déplacer. Dans ce projet nous utiliserons 227 souris. Ce nombre a été réduit au maximum pour permettre une analyse statistique des mesures de prise et de croissance tumorale entre les groupes.

Des méthodes *in vitro* et *in silico* font partie intégrante de ce projet ; cependant elles ne peuvent remplacer la totalité des études menées sur les animaux. En effet, la modélisation de la voie de signalisation de mort cellulaire entre le microenvironnement tumoral, le système immunitaire et la tumeur nécessite une étude *in vivo*.

18056 La maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT) correspond à un groupe hétérogène de neuropathies périphériques héréditaires. Bien que classée parmi les maladies rares, la maladie CMT est reconnue comme la pathologie neuromusculaire héréditaire la plus fréquente. Sa prévalence, qui varie en fonction de la localisation géographique, est estimée en France à 1 personne sur 2500 (soit environ 30 000 patients concernés). La maladie CMT résulte d'une grande variété de mutations (plus de 1000 rapportées à ce jour) affectant plus de 80 gènes différents. Ces gènes codent des protéines exprimées dans différents compartiments des nerfs périphériques : myéline compacte et non compacte, cellule de Schwann, axone. Le défaut d'expression ou la surexpression de ces protéines perturbe l'intégrité et le fonctionnement des nerfs périphériques, principalement au niveau des membres supérieurs et inférieurs. Ces atteintes nerveuses entraînent une diminution de la force musculaire, une atrophie des muscles des extrémités à l'origine de déformations des pieds, des troubles de la marche et de l'équilibre, une fatigue ainsi que des pertes de sensibilité. La forme la plus fréquente de la maladie est le sous-type 1A (CMT1A) qui représente à lui seul de 40 à 50% des cas. La mutation à l'origine de la forme CMT1A est une duplication du gène PMP22. Ce gène code une protéine de la myéline des nerfs périphériques, la protéine PMP22, dont la surexpression conduit progressivement à un défaut de myélinisation à l'origine de la maladie. À ce jour, il n'existe aucun traitement permettant d'inverser ou de freiner ce processus pathologique.

L'étude de la maladie CMT1A est rendue difficile par un accès très limité aux neurones de patients. Par ailleurs, les modèles cellulaires ne permettent pas de mimer les atteintes neurologiques des patients. Le recours à des modèles animaux est donc indispensable aux études visant à mieux comprendre la physiopathologie de la maladie CMT1A et à développer des stratégies thérapeutiques efficaces.

Le modèle rongeur (rat/souris) est particulièrement adapté à la production d'animaux génétiquement modifiés. Dans ce projet, nous allons utiliser une lignée de rats transgéniques hétérozygotes surexprimant le gène PMP22 de souris (« rats CMT1A ») et une lignée de souris transgéniques surexprimant le gène PMP22 humain (« souris C22 »). Ces animaux reproduisent fidèlement la physiopathologie de la maladie CMT1A. Ils constituent de ce fait d'excellents modèles précliniques dans la recherche de traitements pharmacologiques spécifiques.

Ce projet expérimental vise à maintenir les lignées de rats CMT1A et de souris C22 au sein de notre animalerie. L'entretien de chaque lignée sera assuré à partir d'un faible nombre d'animaux reproducteurs. Six couples de rats (6 rats mâles/femelles sauvages et 6 rats mâles/femelles hétérozygotes CMT1A) seront utilisés chaque année (soit 60 rats au total sur 5 années). De la même manière, 6 couples de souris (6 souris mâles/femelles sauvages et 6 souris mâles/femelles C22 hétérozygotes) seront utilisés par an (soit 60 souris au total sur 5 ans).

Les descendants générés par ses accouplements seront utilisés dans les projets de recherche de l'équipe.

18057 La formation sur les animaux de laboratoires est nécessaire dans le cadre de l'utilisation de cet animal à des fins scientifiques. En effet, avant d'exécuter ces techniques sur des études de toxicologie dans le cadre du développement pré-clinique des molécules, les techniciens se forment sur un petit groupe d'animaux. Lorsque la formation du personnel est adéquate, l'expérimentation qui en découle est de meilleure qualité, et permet de réduire au minimum l'inconfort de l'animal en expérimentation. La formation sur animal s'effectue en utilisant le minimum possible d'animaux pour permettre d'obtenir la compétence nécessaire pour répéter ces techniques sur un plus grand échantillon. Généralement, des animaux de stock sont utilisés, ou bien, la formation peut se faire sur des animaux déjà en étude, dans le but d'éviter l'utilisation de nouveaux animaux. Des rats, souris, cobayes, hamster, lapin, chien et mini-porcs peuvent être utilisés dans le cadre de ce projet. Des vidéos peuvent être tournées afin de limiter l'utilisation d'animaux, ou des méthodes de remplacement, comme l'utilisation de tissus de remplacement, de modèles non-vivant ou d'animaux euthanasiés, sont utilisés en priorité. Toute formation est sous la supervision d'un formateur ou d'un vétérinaire. Toutes ces techniques sont décrites dans des procédures spécifiques (SOP), et sont en accord avec les normes éthiques et les documents réglementaires. De plus, elles sont revues par le comité d'éthique.

Dans l'industrie pré-clinique, il est aussi essentiel de renouveler les techniques utilisées, ou d'en développer des nouvelles afin soit d'améliorer celles existantes ou soit de développer une nouvelle technique selon un besoin particulier d'un client, ou suite à l'évolution de la recherche médicale (nouveau type de traitement, nouvelle cible/technique chirurgicale). Il est donc nécessaire d'utiliser des animaux dans le cadre du développement de ces techniques. Généralement, peu d'animaux sont utilisés. Les techniques sont développées soit avec un expert technique ou un vétérinaire. L'animal doit être en bonne condition, et des soins adéquats (par exemple : analgésie, antibiothérapie) peuvent lui être prodigués au cours de la procédure. Avant de procéder au développement de la technique sur l'animal, la priorité sera donnée à l'utilisation d'un modèle non vivant ou sur des animaux morts. Selon la procédure, une anesthésie pourra être réalisée.

Lors de ces deux types de procédure, du sérum physiologique est généralement administré, en combinaison, si nécessaire, des produits associés à l'anesthésie, l'analgésie ou l'antibiothérapie. Les animaux sont hébergés (sauf cas dûment justifié) dans des cages conformes à l'arrêté du 9 décembre 2014 modifiant l'arrêté du 1er février 2013 avec enrichissement. Les animaux identifiés pour les formations et le développement de techniques sont observés tous les jours afin de s'assurer de leur bien-être et de leur bonne condition. Les paramètres suivants sont contrôlés régulièrement afin d'évaluer l'état de santé des animaux : poids corporel, consommation de nourriture et d'eau, température corporelle, signes cliniques, (liste non exhaustive). Toute anomalie est signalée au vétérinaire. Il lui incombe la décision de donner les traitements nécessaires ou d'euthanasier les animaux au vu des signes observés. Un animal pourra être ré-utilisé après accord vétérinaire. Ensuite, son devenir sera soit l'euthanasie soit le placement. Il est prévu d'utiliser un maximum de 1880 animaux dans ce projet.

18058 La radiothérapie et plus particulièrement la protonthérapie est une des options thérapeutiques les plus importantes dans le traitement des cancers. Initialement développée pour les tumeurs de l'œil et les tumeurs intracrâniennes, la protonthérapie connaît une forte évolution dans le monde avec un élargissement des indications, en particulier en pédiatrie en raison de la diminution du risque de séquelles.

Par ailleurs, une nouvelle technique de radiothérapie émerge actuellement, et consiste en une administration des rayonnements à très haut débit de dose, plusieurs ordres de grandeur plus élevés que ceux utilisés actuellement dans la radiothérapie clinique conventionnelle, et a le potentiel de révolutionner l'avenir du traitement du cancer. Cette technique induit un phénomène par lequel le rayonnement à ultra haut débit de dose réduit les toxicités tissulaires communément associées à la radiothérapie conventionnelle, tout en maintenant le contrôle local de la tumeur. Le ou les

mécanismes sous-jacents responsables de ce phénomène ne sont pas encore élucidés, mais l'hypothèse la plus communément admise actuellement repose sur une création de molécules nocives en quantité moins importante à très haut débit de dose. Ce phénomène a été confirmé dans de nombreuses études ces dernières années, à la fois in vitro et in vivo. Cependant, la plupart des études sur cette nouvelle technique de radiothérapie ont utilisé des faisceaux d'électrons qui ont une faible pénétration dans les tissus, ce qui présente une limitation pour la transposition dans la pratique clinique. Une autre méthode prometteuse d'administration de cette nouvelle technique de radiothérapie est la thérapie par faisceaux de protons, car la dose peut être déposée plus profondément dans le tissu. Cependant, les études sont actuellement peu nombreuses. Le but de notre projet est donc d'étudier ce nouveau procédé d'irradiation d'un point de vue des effets secondaires potentiels sur les tissus sains.

Remplacement : Ce projet a pour objectif d'étudier cette nouvelle radiothérapie par faisceaux de protons, pour permettre une meilleure prédiction de l'efficacité du traitement et de ses effets secondaires potentiels. Dans le cadre du projet, des études in silico ont été réalisées pour obtenir un maximum de données préliminaires. Il est par ailleurs très difficile d'observer les effets de cette nouvelle radiothérapie par faisceaux de protons in vitro car cela implique une maîtrise du niveau d'oxygénation des cellules en culture et aucun protocole n'a encore confirmé cet effet in vitro en protonthérapie, alors qu'il a été observé sur de multiples modèles animaux. Il est donc maintenant indispensable de poursuivre les études chez un modèle vivant, intégré et autonome.

Réduction : Deux séries de 48 souris saines seront irradiées au niveau du cerveau avec deux conditions de traitement différentes (débit de dose conventionnel vs nouvelle technique) lors de deux campagnes expérimentales. Ce projet nécessitera donc l'utilisation de 96 souris. Le nombre d'animaux a été statistiquement défini pour permettre l'obtention de résultats fiables avec le moins d'animaux possible.

Raffinement : Les souris seront hébergées dans un environnement contrôlé en continu, avec un enrichissement adapté à leur espèce. Une période minimale de 7 jours sera respectée entre l'arrivée des souris et l'application des procédures expérimentales pour leur permettre de s'acclimater à leur nouvel environnement et ainsi limiter leur stress.

Une grille de score va nous permettre d'évaluer de façon objective l'état de l'animal et de prendre les mesures adéquates pour arrêter immédiatement sa souffrance.

18059 Les lymphomes sont des tumeurs malignes qui se développent à partir des lymphocytes (B le plus souvent) c'est-à-dire des cellules sanguines qui constituent un sous-groupe de globules blancs. Les lymphomes cérébraux primitifs (LCP) se développent dans le système nerveux central (cerveau, œil, liquide céphalorachidien et moelle épinière) sans atteinte des autres organes. C'est une maladie rare (environ 300 nouveaux cas par an en France) peu connue et de mauvais pronostic avec les traitements actuels. Le traitement actuel du LCP repose sur des associations de chimiothérapie comportant du Méthotrexate à fortes doses. Les rechutes ne sont pas rares.

Actuellement, l'IRM cérébrale (imagerie par résonance magnétique) avec injection d'un agent de contraste est l'examen radiologique de référence pour orienter le diagnostic de LCP et en suivre l'évolution. Mais cette technique d'imagerie n'est pas optimale. Différentes tumeurs cérébrales peuvent se présenter avec le même type d'images IRM. A ce jour, la biopsie cérébrale reste indispensable pour établir le diagnostic de LCP. Parfois, cette biopsie n'est pas possible. De plus, l'IRM ne peut montrer que les lésions tumorales les plus importantes, sans rendre compte de l'infiltration cérébrale diffuse des LCP. Il est donc nécessaire de mettre au point une technique d'imagerie non invasive et spécifique du LCP, qui permettrait d'établir un diagnostic fiable au stade initial et de suivre la progression tumorale afin de mieux ajuster le traitement à la réponse aux traitements.

Des études récentes ont démontrés l'intérêt d'une molécule dérivée du glucose (FDG) dans la détection initiale du LCP, par imagerie TEP (tomographie par émission de positons). Mais le FDG n'est pas spécifique des tissus lymphoïdes et ne différencie pas le lymphome de l'inflammation, ni des autres tumeurs cérébrales. Nous proposons de tester un nouveau traceur, différent du FDG et,

plus spécifique des lymphomes, sur des études précliniques de modèles murins de LCP. Ce traceur permettrait ainsi de différencier les lymphomes des autres tumeurs cérébrales, et de mieux évaluer la réponse thérapeutique.

Plus précisément ce projet vise à répondre aux questions suivantes :

- 1) Evaluer la sensibilité et la spécificité du traceur à détecter le LCP, en comparaison avec les imageries par TEP-FDG et IRM.
- 2) Evaluer la réponse thérapeutique par imagerie TEP avec le traceur, afin de l'utiliser comme outil pharmacodynamique.

Remplacement : Les travaux pour répondre à ces questions nécessitent d'effectuer des tests in vivo précliniques et devront utiliser des modèles murins de LCP. Les expériences in vitro ne sont donc pas pertinentes dans le cadre de cette étude. Les modèles seront générés par inoculation intracérébrale de lignée cellulaire de lymphomes humains ou de biopsie cérébrale de patients atteints du LCP.

En effet, la spécificité et la sensibilité du traceur seront évaluées par les données d'imagerie TEP sur nos modèles murins, in vivo. Le suivi de la réponse thérapeutique sera évalué par l'imagerie TEP sur ces modèles, en comparant la croissance tumorale chez les animaux traités avec celle des animaux contrôles, au cours du temps. Le traitement choisi est l'ibrutinib pour son efficacité connue sur ces modèles et sa bonne tolérance.

L'objectif de cette étude est de développer une méthode d'imagerie capable de mieux différencier les LCP des autres tumeurs cérébrales, ce qui pourrait éviter la biopsie cérébrale aux patients trop fragiles et de mieux évaluer la réponse thérapeutique en temps réel afin de mieux ajuster les traitements aux besoins des patients.

Réduction : Ce projet nécessitera l'utilisation de 216 souris. Ce nombre a été statistiquement défini pour permettre l'obtention de résultats fiables avec le moins d'animaux possible.

Raffinement : Des signes cliniques liés au développement de la tumeur sont attendus chez l'animal (perte de poids, troubles neuroaux). Une grille de score a été établie pour évaluer de façon objective l'état de l'animal et prendre les mesures adéquates pour arrêter immédiatement sa souffrance.

En accord avec les recommandations internationales dans le domaine de la cancérologie, les conditions d'hébergement des animaux seront optimisées pour limiter leur stress. De plus, ils seront suivis 5 fois par semaine afin d'assurer leur bien-être et les expérimentations seront arrêtées avant la souffrance des animaux.

18060 L'arthrose est une maladie des articulations synoviales qui, lorsqu'elle devient symptomatique, est responsable de douleurs très invalidantes tant chez l'Homme que chez l'animal. Pourtant, il n'existe à ce jour aucune thérapie efficace, le traitement est uniquement symptomatique avec une prise en charge de la douleur. Par conséquent, il est primordial de développer des recherches innovantes dans ce domaine.

Dans la présente demande, nous allons étudier l'efficacité de nouveaux traitements contre l'arthrose chez les rongeurs (souris, rats et cobayes). Les modèles de gonarthrose (arthrose du genou) chez le rat montrent une asymétrie d'appui, ressemblant à la tendance des patients à éviter l'appui sur un genou arthrosique.

Ces modèles d'arthrose chez les animaux de laboratoire sont largement utilisés dans la littérature. L'arthrose expérimentale induite par section du ligament croisé antérieur (LCA) chez le rat est un modèle reproduisant les conditions physiopathologiques rencontrées en clinique chez l'Homme.

Le modèle spontané d'arthrose du genou chez le cobaye est un modèle expérimental, dit « naturel » qui développe spontanément de l'arthrose. Ce modèle présente les mêmes caractéristiques morphologiques et épidémiologiques (l'obésité est un facteur prédisposant chez les deux espèces) que chez l'Homme.

Les modèles expérimentaux décrits dans cette demande sont donc complémentaires, ils permettent de mieux valider les médicaments candidats.

Ce projet consiste à évaluer l'efficacité ainsi que la tolérance du traitement contre l'arthrose chez les rongeurs. Il complète un projet antérieur possédant déjà une validation in vitro. Des études in vivo sont indispensables pour caractériser les propriétés des médicaments testés dans les tissus vivants. Même si dans certains cas une évaluation des réponses de différentes lignées cellulaires peut être réalisée in vitro, l'évaluation de la réponse d'un organisme entier apporte des données à la fois supplémentaires et indispensables sur les propriétés des médicaments testés dans les tissus vivants. La complexité des mécanismes biologiques de l'arthrose fait que les modèles animaux choisis ne peuvent être remplacés par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants.

Afin d'obtenir des résultats statistiquement valables tout en réduisant au maximum le nombre d'animaux, les groupes expérimentaux seront constitués de 8 animaux.

Chaque procédure sera constituée de 5 groupes expérimentaux. Parmi les 5 groupes expérimentaux, il y aura un groupe contrôle qui ne reçoit pas le traitement et les groupes traités avec différentes doses. L'objectif est de déterminer l'effet thérapeutique des molécules testées des groupes traités par rapport au groupe contrôle. Les traitements seront appliqués par deux voies principales: intra-articulaire et orale. Des examens cliniques des animaux (comportements, gonflement de genoux, signes cliniques, etc.), des prises de sang et des analyses histologiques seront effectuées.

Deux procédures maximum seront réalisées chaque année pour les rats et les cobayes et 4 procédures maximum pour les souris.

Sur 5 ans le projet inclura donc au maximum 400 rats, 400 cobayes et 800 souris.

Tout au long de ces études in vivo, nous allons respecter la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). Nous nous limiterons aux seules expériences considérées comme absolument indispensables chez l'animal. Avant toute expérimentation, un protocole expérimental sera soigneusement rédigé avec des points limites et transmis aux personnels techniques. Des anesthésiques et analgésiques seront utilisés afin de réduire au maximum les éventuelles souffrances des animaux pendant les expériences.

Les animaux seront suivis quotidiennement afin de respecter leur bien-être. Nous appliquerons le même protocole et les mêmes règles d'éthiques sur tous les modèles animaux.

18061 L'objectif de la présente demande est d'obtenir des anticorps polyclonaux (AcP) et/ou monoclonaux (AcM) de haute affinité capables de lier une grande diversité d'épitopes de nature différente. Ces anticorps sont très majoritairement obtenus par l'immunisation d'un animal avec un antigène spécifique contre lequel le système immunitaire de l'animal va réagir comme moyen de défense.

Il a été observé que les anticorps produits par les lapins présentent généralement de hautes affinités pour l'antigène cible, grâce notamment à la mise en place de mécanismes propres à l'espèce, plus efficaces que chez les rongeurs. Ils présentent également une capacité de lier une très grande diversité d'épitopes. Ils constituent ainsi une classe de réactifs à très haute valeur ajoutée pour des applications en recherche et dans le domaine du diagnostic telles que la détection de petites molécules (haptènes) et molécules non protéiques ou la détection de modifications post-traductionnelles (phosphorylation, acétylation, etc.), par exemple.

Alors que le lapin reste l'espèce la plus couramment utilisée en laboratoire pour la production d'AcP, les demandes d'isolement d'AcM de lapins sont de plus en plus fréquentes. Cependant l'obtention de tels AcM s'est longtemps heurtée à un frein technologique, la technologie des hybridomes étant difficilement applicable à cette espèce. Nous avons développé une approche alternative passant par la construction et le criblage de banques de fragments d'anticorps présentés à la surface de phages (Phage display), qui sont dérivées de lapins immunisés.

Aussi, nous souhaitons poursuivre le développement de notre plateforme d'immunisation de lapins à des fins de production d'AcP et d'AcM, selon les demandes de nos clients.

La production d'AcP a été internalisée à BIOTEM début 2019, elle était auparavant effectuée en sous-traitance. Ces expérimentations seront réalisées (1) de façon à réduire au maximum le nombre

d'animaux utilisés, sans compromettre les projets, et (2) de s'assurer du bien être de ces animaux au sein de nos locaux. La capacité de notre zone d'accueil est de 48 animaux par tranche de 6 mois donc, compte tenu de ces paramètres, un total de 480 lapins au maximum pourra être utilisé sur une période de 59 mois.

Nous appliquons la règle des 3R.

1) Remplacer : Il n'existe pas de méthodes alternatives à l'immunisation d'animaux pour l'obtention d'anticorps de haute affinité, les techniques de criblage de banques naïves ne permettent pas d'obtenir les affinités escomptées.

Les anticorps polyclonaux sont obtenus à partir de la purification du sérum de l'animal. Aucune alternative n'est donc possible.

2) Réduire : il n'est utilisé que le nombre d'animaux strictement nécessaire à la production demandée

3) Raffiner : Les lapins sont hébergés selon les normes en vigueur avec de l'enrichissement, et 2 animaux socialement compatibles par cage. Ils sont anesthésiés lorsque nécessaire et euthanasiés si le point limite de souffrance est atteint.

18062 Notre capacité à répondre au stimuli extérieur est essentielle à notre survie. Les récepteurs chimiosensoriels convertissent les signaux chimiques de l'environnement en signaux neuronaux. L'hétérogénéité des récepteurs est issue de duplications aléatoires répétées de gènes d'un ou de plusieurs gènes ancestraux. Des études menées sur différentes espèces ont montré que des récepteurs olfactifs ont été trouvés dans différents tissus, comme les reins et le cœur chez l'homme et les rongeurs. Cependant, on ne sait pas si cette expression ectopique est conservée chez d'autres animaux ou quelle est leur fonction dans les tissus non-olfactifs.

Nous cherchons à caractériser l'expression de récepteurs olfactifs au sein du système nerveux central sur embryon entier, il n'est donc pas possible de produire cette étude in vitro. Nous avons choisi le poisson zèbre comme modèle. Comme il y a moins de 150 gènes de récepteurs olfactifs chez le poisson zèbre, la caractérisation de leur expression est réalisable, contrairement à la souris, qui possède un nombre élevé de récepteurs olfactifs (environ 1300) et le système nerveux du poisson zèbre présente une grande homologie avec celui des mammifères.

Pour l'ensemble du projet, nous utiliserons 14120 poissons au maximum (essentiellement des larves à 7 dpf). Il a été montré dans de nombreuses études que le stade larvaire autonome est atteint à 5 dpf dans des conditions d'élevage optimale. Dans nos conditions de température d'élevage et de densité de larves par boîte, on observe un léger retard dans le développement des larves, le stade larvaire autonome sera atteint à 6 dpf.

Le poisson-zèbre présente de nombreux avantages par rapport à la souris. Une femelle de poisson zèbre peut pondre de 100 à 200 œufs par semaine. De plus, le développement embryonnaire hors de la femelle, permet de travailler sans sacrifier la mère. Enfin la transparence des embryons aux stades qui nous intéressent permet des études en imagerie sans recours à la chirurgie invasive.

Les expérimentations sont limitées au minimum requis pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Nous réduirons au maximum la fréquence des accouplements et l'ensemble des embryons sera utilisé. Nous assurons également une veille scientifique continue, évitant toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature.

Les conditions d'hébergement des animaux sont contrôlées afin de préserver le bien-être de l'animal et d'enrichir son environnement. Nous veillons au bien-être des animaux. Nous surveillons l'état de santé des animaux lors des différentes procédures. Des fiches de suivies (étude du comportement/aspect des poissons) sont établies afin de nous assurer que les procédures ne nuisent pas aux animaux.

Nous satisfaisons à la règle des 3R de la directive 2010/63/UE et du décret N°2013-118 sur la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques.

18063 Lors de cette procédure, l'impact de protéines impliquées dans la régulation de la mort cellulaire sur le stress hépatique induit par une alimentation riche en graisse, en lien avec la maladie du foie gras non alcoolique (NASH) sera étudié. Comme aucun modèle cellulaire ne permet de répondre à nos questions scientifiques, des souris génétiquement modifiées ont été générées. Ces souris, 18 mois après leur naissance, se reproduisent normalement et ne présentent pas de phénotype particulier. Ces souris ainsi que des souris normales (contrôle) seront soumises dès l'âge de 9 semaines, soit à un régime dit "normal", soit à un régime riche en graisse, en sucre et en protéines. La durée totale de cette procédure sera de 16 semaines maximum, en fonction du poids pris par les souris pour éviter toute souffrance des animaux. L'impact de ce régime alimentaire gras sur les animaux sera évalué en continu afin de limiter le stress et la souffrance des animaux. Les animaux seront observés au moins deux fois par semaine et pesés une fois par semaine ce qui permettra de suivre l'effet des différents régimes. L'incidence de la prise de poids sur la mobilité de l'animal, l'apparition de plaies cutanées et d'oedèmes aux pattes seront évalués. En cas de douleur observée en raison du surpoids du paracétamol sera ajouté dans l'eau de boisson. L'apparition de plaies et/ou d'oedèmes au niveau des pattes fera l'objet d'un suivi plus fréquent et un traitement adapté sera mis en place.

Tout au cours de ce projet, les précautions seront prises pour réduire le stress de l'animal. A la fin de la procédure (16 semaines de régime), une anesthésie profonde sera réalisée pour le prélèvement sanguin terminal avant euthanasie et des tests biochimiques seront réalisés sur le foie, le tissu adipeux et le sang de ces souris.

L'administration d'anesthésiques, un suivi adapté des animaux et la définition précise des points limites précoces et prédictifs d'un mal être, permettent de limiter au maximum le risque de souffrance animale. 96 souris seront nécessaires à la réalisation de ce projet avec un nombre d'animaux par groupe défini à minima sans mettre en péril une interprétation statistique des résultats.

18064 Les papillomavirus humains (HPV) ces virus commensaux des épithéliums cutané et muqueux qui infectent les kératinocytes. Certains types d'HPV dits à « haut risque » (e. g. HPV16) sont très connus car ils causent les cancers du col de l'utérus, troisième cancer féminin dans le monde, responsable de plus de 200 000 décès annuels. L'évolution des techniques de séquençage a permis d'identifier plus de 200 types d'HPV à ce jour et d'établir que ces virus sont des commensaux des épithéliums humains, majoritairement associés à des infections asymptomatiques. Cependant dans certains contextes, encore mal compris, qui dépendent à la fois du type d'HPV et de l'individu infecté, certains HPV normalement commensaux comme HPV38 causent des lésions (i. e. verrues) qui peuvent évoluer en lésions précancéreuses et éventuellement en cancers.

Plusieurs gènes humains sont impliqués le contrôle de la bascule des infections par les HPV vers le développement de lésions et de cancers, offrant des pistes thérapeutiques pour contrecarrer cette évolution. Dans ce projet, nous nous focaliserons sur la chimiokine CXCL12 et ses récepteurs membranaires CXCR4 et ACKR3, dont le rôle dans le contrôle des HPV a été établi notamment chez des patients souffrant d'une immunodéficience rare (WHIM), qui développent des pathologies dues à HPV de façon sélective et accrue.

Afin d'étudier le rôle de ces récepteurs et l'effet de leur inhibition sur développement de la pathologie due à HPV, nous devons avoir recours à l'expérimentation animale chez la souris, qui permet d'étudier à la fois la composante immunitaire et les lésions cutanées. En effet, même si les HPV ne peuvent pas se multiplier chez la souris, des souris transgéniques exprimant certaines protéines des HPV dans leurs kératinocytes développent des lésions qui miment les stades pré-cancéreux identifiés chez l'homme sans induire de souffrance chez les animaux (modèles largement utilisés par la communauté scientifique et dont nous avons déjà la maîtrise). Nous disposons de souris transgéniques pour HPV16, virus infectant les muqueuses et reconnu pour son pouvoir oncogène et de souris transgéniques pour HPV38, virus infectant la peau qui peut engendrer des lésions précancéreuses dans certaines conditions (facteurs génétiques de l'hôte ou exposition UV). Nous avons également établi un modèle murin transgénique du syndrome WHIM, qui exprime la forme mutée du récepteur CXCR4 identifiée chez un patient, et que nous croiserons avec les souris

transgéniques HPV16 et HPV38. Nous étudierons l'impact de la modulation de CXCR4 et ACKR3 sur l'évolution des lésions pré-cancéreuses chez ces souris. Nos objectifs, développés dans le cadre de projets financés, et selon quatre procédures, sont d'étudier : 1) de potentielles aggravations dans la cinétique d'apparition et l'étendue des lésions dues à HPV chez les souris WHIM et 2) le bénéfice thérapeutique de 2 nouveaux traitements ciblant les récepteurs CXCR4 et ACKR3 sur l'évolution de ces lésions en utilisant différents modes d'administration (injection, application cutanée ou via l'alimentation).

Notre projet a été conçu en tenant compte de la règle des 3R.

1) Remplacer : nous avons entamé une étude complète des effets des inhibiteurs de CXCR4 et ACKR3 sur les propriétés oncogènes des HPV in vitro, qui renseignera notamment sur les effets de ces inhibiteurs sur les kératinocytes et le développement des épithéliums.

2) Réduire : le nombre minimum de souris requis pour obtenir des données statistiquement exploitables (Mann Whitney & Kruskal-Wallis avec test de Dunn post-hoc) a été calculé, sur la base de nos expériences précédentes déjà publiées avec ces modèles.

3) Raffiner : les animaux seront hébergés dans un environnement enrichi et nos études seront essentiellement basées sur une observation non invasive des lésions (cinétique d'apparition ou régression éventuelle) dues à HPV sur les 7 semaines de traitement. A la fin de ces études, des prélèvements de tissus et d'organes seront réalisés sur les animaux euthanasiés.

Le nombre total de souris utilisées pour ce projet sera de 456 animaux.

18065 La neurotoxicité des molécules de chimiothérapie anticancéreuse est à l'origine de neuropathies périphériques chimio-induites (NPIC) pouvant se manifester par des douleurs neuropathiques. Les NPIC sont fréquentes et présentent un fort impact sur la mise en œuvre des traitements et des protocoles de chimiothérapie, conduisant à une perte des chances de survie des patients traités. Les NPIC, qui dépendent de l'agent utilisé et de la dose sont principalement des polyneuropathies à prédominance sensitive longueur dépendantes réversibles ou persistant plusieurs années après l'arrêt du traitement. Elles se manifestent par l'apparition de douleurs neuropathiques ; paresthésies (fourmillements, picotements), hyperalgésie (sensation de douleur exagérée en réponse à un stimulus douloureux), allodynie (sensation de douleur en réponse à un stimulus indolore) ou diminution de la sensibilité. Ces troubles peuvent avoir un impact particulièrement délétère sur les activités du quotidien. La seule prévention actuelle repose sur le dépistage de neuropathies préexistantes et/ou la détection précoce de signes de neuropathie chez des sujets traités par chimiothérapie neurotoxique, mais il n'existe aucun traitement des NPIC. Il est donc évident que prévenir leur développement est une priorité pour améliorer la qualité de vie des patients et permettre le suivi optimal du traitement anticancéreux. Parmi l'arsenal d'agents anticancéreux utilisés en clinique humaine, la vincristine (VCR) est le plus neurotoxique des vinca-alcaloïdes. La VCR est indiquée notamment dans le traitement des cancers de l'enfant, des leucémies aiguës lymphoïdes et des lymphomes non hodgkiniens. La neuropathie induite par la VCR (NPIV) touche entre 30 et 40 % des patients et représente donc un enjeu de santé publique. La NPIV est une polyneuropathie à prédominance sensitive et dose-dépendante induisant des paresthésies, des hyperalgésies et des allodynies tactiles. L'administration prolongée de VCR induit quasi-systématiquement une allodynie des membres inférieurs.

Une analyse transcriptomique, réalisée sur les ganglions rachidiens dorsaux (GRD) de souris traitées par la VCR et ayant développé une allodynie mécanique, a mis en évidence la dérégulation de l'expression de plusieurs gènes. Le gène CCK2R, qui code pour le récepteur à la cholécystokinine de type 2 (CCK2R), est surexprimé. Particulièrement présent dans le système gastro-intestinal et dans le système nerveux central, ce récepteur est impliqué dans la satiété, l'anxiété et la douleur. Son action sur la douleur serait due notamment à sa dimérisation avec les récepteurs opioïdes. Une étude sur des souris déficientes pour le récepteur CCK2R suggère que les sensibilités mécanique et douloureuse ainsi que le développement de la douleur neuropathique sont régulés par des interactions antagonistes entre récepteurs CCK et récepteurs opioïdes. Le proglumide (PRGL), un antagoniste des récepteurs CCK (de type 1 et 2), a permis d'inverser

l'allodynie mécanique dans un modèle murin de douleur induite par la brûlure. Le proglumide fait actuellement l'objet d'un essai clinique (Phase I) dans le cadre de la prise en charge de la stéatose hépatique non-alcoolique (clinicaltrials.gov, NCT04152473). Outre le proglumide, plusieurs autres antagonistes de CCK2R ont vu le jour. Parmi eux, le netazepide (NZP) et le ceclazepide (CZP), ont fait l'objet de plusieurs essais cliniques, notamment dans la prise en charge des tumeurs gastriques neuroendocrines (clinicaltrials.gov NCT01339169) et sont bien tolérés chez l'Homme. Cibler CCK2R serait une stratégie efficace pour prévenir l'apparition de douleurs neuropathiques induites par la VCR et améliorer ainsi la qualité de vie du patient et ses chances de survie face au cancer. Nous souhaitons donc évaluer l'effet neuroprotecteur du proglumide (antagoniste non-spécifique de CCK2R), du netazepide et du ceclazepide (antagonistes spécifiques du CCK2R) dans un modèle murin de NPV. Il n'existe, à ce jour, aucune méthode alternative à l'expérimentation animale disponible qui reproduit l'ensemble des mécanismes mis en jeu à la génération d'une douleur induite par des cytotoxiques anticancéreux. En effet, les modèles in vitro ne permettent pas de modéliser la complexité de la réponse d'un organisme entier face à l'administration d'agents de chimiothérapie.

La neuropathie sera induite par des injections quotidiennes de VCR pendant 7 jours. Les traitements au proglumide, au netazepide et au ceclazepide seront administrés 24h avant la première injection de VCR puis chaque jour d'injection de VCR. Une analyse fonctionnelle et morphologique sera réalisée afin de caractériser le développement de la neuropathie induite par la VCR et l'effet des traitements. Le degré de gravité et la cinétique de la neuropathie sensitive seront évalués à l'aide d'un test comportemental les jours suivant l'injection de l'agent anti-tumoral. Seul un test d'évitement sera utilisé pour l'évaluation de la sensibilité.

Une première étude pilote sera réalisée sur des petits groupes d'animaux (n = 3) afin de vérifier l'effet du traitement sur l'état général de l'animal ayant reçu de la VCR dans nos conditions d'hébergement. Si les traitements induisent des signes de souffrance ou de toxicité, évalués à l'aide d'une grille de suivi quotidien, alors cette étude pilote sera renouvelée avec des doses deux fois inférieures. Si aucun signe de souffrance ou de toxicité n'est observé au cours de cette étude pilote, alors nous procéderons à l'étude principale.

Pour l'étude principale, 9 groupes de 10 animaux seront utilisés (CTRL, VEH, VCR, PRGL, VCR+PRGL, NZP, NZP+VCR, CZP, VCR+CZP). Le nombre de 10 animaux par groupe a été calculé à partir de résultats (moyenne et écart-type) obtenus au cours de l'étude correspondant au projet APAFIS#11280-2017091510483336.

Le nombre d'animaux total pour l'ensemble du projet s'élèvera donc à 99. Les animaux seront élevés dans des conditions d'hébergement (température et hygrométrie de l'environnement, densité d'animaux, présence systématique d'enrichissement, change régulier de la litière, nourriture et eau ad libitum, surveillance quotidienne de l'état général des animaux) qui respectent leur bien-être. L'ensemble des procédures sera réalisé de manière à limiter le stress et la souffrance des animaux (anesthésie, détermination d'une limite haute au-delà de laquelle l'animal sera soustrait au stimulus pour les tests de sensibilité).

18066 Le cancer du pancréas est un cancer très meurtrier. Asymptomatique et métastatique, il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement efficace, l'espérance de vie du patient excède rarement 6 mois. Le glioblastome (GBM) est le cancer du cerveau le plus courant et le plus agressif chez les adultes, pour lequel la thérapie actuelle (résection chirurgicale + radiothérapie + chimiothérapie à base de témozolomide) n'est pas efficace et la plupart des tumeurs réapparaissent en quelques mois. L'urgence à laquelle la recherche est confrontée nous a amené à développer de nouveaux agents pour imager, dépister et traiter les cancers du pancréas et du cerveau.

La nanomédecine est une stratégie prometteuse qui peut apporter de nouvelles thérapies pour le traitement du cancer. Une piste particulièrement intéressante réside dans la conception de nanosystèmes permettant d'intégrer des plates-formes thérapeutiques et diagnostiques. Cette approche dite «théranostique» permet le diagnostic, la stratification et le traitement du cancer, ainsi que la surveillance par imagerie de la réponse au traitement pour évaluer l'efficacité thérapeutique

de la médecine personnalisée. Dans cette perspective, nous avons développé des agents nanothérapeutiques pour la détection et le traitement des cancers du pancréas et de cerveau.

Quatre agents thérapeutiques basés sur des dendrimères amphiphiles ont été sélectionnés. Les dendrimères sont des molécules synthétiques présentant des ramifications ressemblant à des branches d'arbres d'où leur nom. Les dendrimères amphiphiles ont la capacité de s'assembler et de former des structures sphériques appelées micelles dont la cavité peut servir à véhiculer l'agent thérapeutique. Ces agents thérapeutiques améliorent la détection des tumeurs par imagerie par résonance magnétique (IRM), une modalité d'imagerie biomédicale non-invasive permettant le suivi longitudinal d'un même sujet, et contiennent soit du paclitaxel soit de la doxorubicine, deux agents anti-cancéreux.

Il est primordial de tester *in vivo* l'efficacité et la sensibilité de ces agents thérapeutiques. Nous avons choisi les souris nude xenogreffées avec des tumeurs humaines comme modèle préclinique. Deux modèles de cancer issus d'une lignée cellulaire du pancréas (L-IPC) et d'une lignée cellulaire cérébrale (glioblastome U87) seront induits chez les souris.

Le projet sera conduit dans le respect de la règle des 3R. Nous avons tenté d'utiliser toutes les méthodes substitutives possibles notamment les approches cellulaires, mais nous ne pouvons pas nous passer du recours à l'animal. Nous réduisons le nombre d'animaux grâce à l'utilisation de tests statistiques permettant d'optimiser la taille des effectifs, et nous raffinons les procédures en diminuant autant que possible le stress et la douleur des animaux. Le nombre total d'animaux pour ce projet est estimé à 856 souris. L'implantation des tumeurs comme la procédure d'imagerie seront réalisées sous anesthésie générale afin de réduire le stress et la douleur des animaux.

Un délai d'acclimatation et une habitude à l'expérimentateur seront assurés. Le raffinement portera également sur les conditions d'hébergement (groupes sociaux, cycle jour/nuit, nourriture et boisson *ad libitum*) et l'enrichissement environnemental. Les souris seront hébergées dans des cages contenant des rondins de bois à ronger et un refuge afin de diminuer les comportements agressifs et réduire l'ennui, et favoriser l'expression d'un maximum de comportements naturels (interactions sociales, locomotion, élimination, marquage, repos, recherche de cachette...). L'ensemble de ces mesures conduira à favoriser au maximum le bien-être des souris. Les animaux seront surveillés au quotidien pour détecter le moindre signe de souffrance. Des points limites et des grilles de score sont prévus et seront suivis afin de garantir le bien-être animal. Une échelle clinique adaptée au modèle tumoral d'implantation sous-cutanée permettra de suivre chaque animal et de déceler des signes de souffrance. Une analgésie pourra être mise en place selon le score clinique afin de réduire la douleur. Les animaux seraient euthanasiés s'ils atteignaient un score clinique limite.

18067 CONTEXTE

La stérilisation tubaire est une technique de stérilisation féminine définitive à visée contraceptive. 11% des femmes à travers le monde souhaitent recourir à une obstruction tubaire en vue d'une contraception permanente (Trends in contraceptive use worlwide, 2015, United Nation, <https://www.un.org/en/development/desa/population/publications/pdf/family/trendsContraceptiveUse2015Report.pdf>). Ces demandes de stérilisation définitive sont encadrées avec la signature d'un consentement par la patiente ainsi qu'un délai de réflexion de 4 mois. Ces techniques ont ensuite été détournées pour une autre utilisation : le traitement des hydrosalpinx. En effet, en assistance médicale à la procréation, l'écoulement secondaire de l'hydrosalpinx dans la cavité utérine, empêche l'implantation embryonnaire. Le but est de créer une barrière physique entre les spermatozoïdes et l'ovocyte au niveau de la trompe et par conséquent, éviter la fécondation". Le but de cette recherche est en fait le traitement des hydrosalpinx mais cela passe nécessairement par une première phase d'obstruction tubaire et donc de stérilisation définitive. Actuellement la méthode de référence est la ligature des trompes ou la pose de clip nécessitant une chirurgie invasive par coelioscopie. En 2000, une nouvelle technique, la méthode Essure®, émergeait, et permettait une obstruction tubaire par voie hystéroscopique c'est à dire par voie naturelle sans incision ni anesthésie, réalisable en hospitalisation de jour. Elle consistait à mettre en place un ressort composé de nitinol dans chaque trompe. Ce ressort obstruait les trompes en créant une

inflammation locale. Suite à l'observation d'effets secondaires dus, probablement, à la matière de l'implant (nickel et titane), cette méthode n'est plus commercialisée en Europe depuis 2017.

La méthode de référence reste donc à ce jour la ligature des trompes ou pose de clip par chirurgie. En s'inspirant de la méthode Essure®, il est proposé ici de tester un matériau biocompatible naturel connu dans le domaine de l'agroalimentaire et médical. L'hypothèse est qu'un granulome inflammatoire sera formé en 3 mois ce qui obstruera les trompes et empêchera la fécondation.

OBJECTIF

Le but de ce projet est d'obtenir une contraception définitive à court terme (3 mois) et moyen terme (12 mois).

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

Ce projet de recherche translationnel mettra en œuvre 19 lapins New Zealand à travers deux procédures de sévérité modérée. Les animaux subiront une petite incision de 2 cm au niveau du bas de l'abdomen qui permettra d'atteindre les trompes dans lesquelles sera injectée la solution puis les animaux seront observés jusqu'à 11 mois puis seront mis à mort afin d'effectuer des analyses histologiques.

CONFORMITE AVEC LES 3R :

Réduction

La phase de mise au point de la chirurgie (geste chirurgical) a été testée d'abord sur cadavre. Le projet sera réalisé en séquentiel (2 procédures) afin de vérifier de ne pas engager trop d'animaux si jamais, l'hypothèse n'était pas vérifiée.

Raffinement

Les lapins bénéficient d'un programme de sociabilisation dans un enclos enrichi plus spacieux que leur cage d'hébergement par session de 30 minutes qui leur permet de stimuler leur comportement de curiosité. Lors de la chirurgie, le mélange anesthésique/analgésique sera complété par un anesthésique local qui permet de réduire les douleurs chroniques.

Remplacement

Le fait d'utiliser un produit dont la biocompatibilité est connue permet d'éviter toute une batterie de test sur animaux. Cependant, l'hypothèse à vérifier concerne l'inflammation autour de l'injection d'une solution et l'effet contraceptif de celle-ci. Ces deux mécanismes ne peuvent pas être vérifiés in vitro.

18068 Parmi les tissus des vertébrés, le muscle squelettique est l'un des plus remarquables : il présente un développement et une croissance prodigieuse et possède de grandes capacités régénératrices. Ces capacités de croissance et de régénération font de lui un organe très plastique. À l'origine de cette plasticité musculaire se trouve un réservoir de cellules souches, dont les plus étudiées à ce jour sont les cellules satellites qui, comme leur nom l'indique, se localisent en périphérie des fibres musculaires. Ces cellules satellites ont une activité qui dépend de leur environnement et des interactions qu'elles entretiennent avec les autres types cellulaires contenus dans un muscle et nécessaire pour que la régénération soit efficace.

L'objectif de notre étude porte sur la caractérisation des différents types cellulaires d'un muscle au cours du processus de guérison musculaire par la technique de cytométrie de masse. Cette technique utilise des dizaines d'anticorps pour examiner le comportement de toutes les cellules dans le muscle. Nous utiliserons des modèles souris pour la cytométrie de masse pour examiner le rôle d'une voie de signalisation dans les macrophages et les cellules satellites. Le processus de guérison musculaire sera modélisé dans nos animaux par un protocole standard largement utilisé dans le domaine de recherche du muscle qui permet de suivre toutes les étapes de la réparation tissulaire avec un timing connu et précis. Nos résultats devraient permettre le développement de nouvelles approches thérapeutiques pour les maladies musculaires grâce au ciblage direct des cellules souches.

Cette étude utilisera un maximum de 586 animaux repartis sur 3 procédures expérimentales. Tout au long de nos procédures, la règle des 3R sera respectée :

A chaque étape les hypothèses sont testés au préalable in vitro avant toute application chez l'animal afin de réduire le nombre d'expériences incontournables réalisées sur l'animal. Cependant la validation finale in vivo reste incontournable car nous avons montré que les cellules souches in vitro, donc sorties de leur contexte environnemental naturel, présentent des différences significatives par rapport à leurs homologues in vivo. Par conséquent, nous utilisons ici une approche génétique qui permet la manipulation des voies de signalisation directement dans l'environnement physiologique des cellules, c'est-à-dire dans les muscles. Les protocoles expérimentaux chez la souris sont établis afin de pouvoir minimiser le nombre d'animaux soumis à expérimentation en utilisant les mêmes contrôles pour différents lots lorsque cela est possible tout en conservant une masse suffisante pour assurer la reproductibilité et la cohérence statistique des observations. Les animaux étant étudiés dans le contexte du muscle blessé potentiellement douloureux, une prévention de la douleur sera assurée par un traitement analgésique approprié et les animaux seront suivis quotidiennement pour vérifier leur bien-être et la survenue d'un des points limites déterminés pour chaque procédure. Tout signe témoignant d'une mauvaise tolérance au traitement (par exemple perte de poids, souffrance, apathie, déshydratation des animaux) conduira à l'interruption de la procédure.

18069 Le cancer du poumon est une cause majeure de décès dont le taux de survie globale à 5 ans n'est que de 15%, ce qui en fait le cancer le plus meurtrier au monde avec plus de 1,8 millions de patients qui en décèdent chaque année. Malgré les progrès récents et la mise en place de stratégies thérapeutiques innovantes et ciblées, visant à éradiquer spécifiquement les tumeurs pulmonaires, il est indispensable de mieux comprendre le développement de ce cancer en mettant en place de nouvelles approches novatrices pouvant mener à une stratégie thérapeutique alternative.

La mitochondrie est une organelle dynamique essentielle qui fournit l'énergie nécessaire à différents processus cellulaires clés, tels que la survie, la prolifération et la migration. Les mitochondries permettent une adaptation cellulaire aux stress environnementaux, tels que la privation en nutriments et en oxygène, qui vont conduire à son dysfonctionnement, étape clé dans la perte de viabilité cellulaire. Cependant, une des caractéristiques des cellules tumorales est leur habilité à échapper à la mort, et à s'amplifier de façon incontrôlée. Pour y parvenir, ces cellules ont mis en place un système de protection consistant à éliminer spécifiquement les mitochondries qui ne sont plus fonctionnelles par un processus appelé mitophagie, permettant ainsi de ne conserver que des mitochondries saines et fonctionnelles, et ainsi favoriser la survie des cellules cancéreuses. Ainsi, la mitophagie joue un rôle essentiel dans la survie des cellules de cancer du poumon in vitro, et participe à la régulation de la réponse inflammatoire, que l'on sait être un acteur clé de la progression tumorale. Toute réponse inflammatoire repose sur le recrutement et l'activation des cellules du système immunitaire qui sont des médiateurs importants et nécessaires de ce processus.

Ainsi, une meilleure compréhension du rôle de la mitophagie dans la tumorigenèse permettra selon nous d'ouvrir la voie à de nouvelles perspectives thérapeutiques plus efficaces pour traiter les cancers du poumon chez l'homme.

L'objectif de notre projet de recherche a pour but de définir le rôle du processus par lequel les cellules cancéreuses éliminent spécifiquement les mitochondries endommagées dans le développement du cancer de poumon et la réponse aux traitements chimiothérapeutiques. Ce projet est soutenu financièrement par des organismes de recherche publics.

Les mécanismes de cancérisation à l'œuvre chez la souris sont très proches de ceux observés chez l'humain, ce qui en fait un modèle de choix pour l'étude de ces mécanismes d'autant que l'on dispose chez la souris de nombreuses possibilités d'analyses au niveau cellulaire et moléculaire. Ce projet fait appel à des lignées de souris génétiquement modifiées qui ne présentent pas de phénotype dommageable. Il implique également des modèles murins expérimentaux d'allogreffes qui sont bien caractérisés et modélisent fidèlement la pathologie humaine, que nous soumettrons à des traitements médicamenteux pour voir leur efficacité, et le lien avec la mitophagie des cellules

tumorales. Bien que nous nous intéressons à tous les stades du développement tumoral, toutes les procédures menées avec ce modèle seront interrompues avant l'apparition de signes cliniques douloureux pour les animaux. D'autres interventions telles qu'injection et prélèvement sous anesthésie sont prévues. Assortie des mesures de réduction et de raffinement prévues qui limitent la sévérité des procédures, l'ensemble des dommages causés aux animaux sont estimés acceptables au regard des bénéfices escomptés de ce projet pour la santé humaine.

Le cancer du poumon est une pathologie complexe où les cellules cancéreuses interagissent étroitement avec le microenvironnement pulmonaire, et notamment les cellules immunitaires infiltrant la tumeur. Ainsi, il n'existe pas à ce jour d'autre alternative que l'utilisation des souris pour l'étude in vivo des mécanismes moléculaires impliqués dans la tumorigenèse.

Bien qu'il n'existe à ce jour pas de méthode de remplacement pour réaliser ces études, il est évident que nous sommes très vigilants à minimiser et à optimiser le nombre d'animaux utilisés dans nos expériences. Nous avons réalisé une étude statistique préalable de façon à définir de façon adéquate le nombre d'animaux strictement nécessaire pour répondre clairement à notre question scientifique en garantissant la justesse des résultats obtenus. En termes de réduction, nous utiliserons, lorsque l'expérimentation le permet, indifféremment les mâles et les femelles. Par ailleurs, des études préalables in vitro permettent de sélectionner des gènes d'intérêt afin de réduire le nombre tester in vivo. Enfin, l'ordre de réalisation des procédures servira à comparer différentes conditions afin de sélectionner la plus efficace pour réduire le nombre d'animaux utilisé dans certaines procédures.

Une grande importance sera accordée au bien-être des animaux. Les animaux sont hébergés en groupe avec un milieu enrichi. Le recours à l'anesthésie lorsque nécessaire et la mise en place de points limites précoces et adaptés à chaque procédure, basés sur une observation détaillée des animaux au cours de chaque procédure permettront de limiter la sévérité de celles-ci. L'utilisation de modèle génétiques inductibles nous permet par ailleurs de maîtriser le développement de la pathologie, et donc suivre au plus près les animaux de façon adéquate.

Cette étude utilisera au maximum 5460 souris sur 5 ans.

18070 Parmi les tissus des vertébrés, le muscle squelettique est l'un des plus remarquables : il présente un développement et une croissance prodigieuse et possède de grandes capacités régénératrices. Ces capacités de croissance et de régénération font de lui un organe très plastique. À l'origine de cette plasticité musculaire se trouve un réservoir de cellules souches, dont les plus étudiées à ce jour sont les cellules satellites qui, comme leur nom l'indique, se localisent en périphérie des fibres musculaires. Ces cellules satellites ont une activité qui dépend de leur environnement et des interactions qu'elles entretiennent avec les autres types cellulaires contenus dans un muscle et nécessaire pour que la régénération soit efficace.

L'objectif de notre étude porte sur l'identification des morceaux d'ADN qui régulent des gènes clés des cellules satellites. Nos résultats devraient permettre le développement de nouvelles approches thérapeutiques pour les maladies musculaires grâce au ciblage direct des cellules souches.

Cette étude utilisera un maximum de 40 animaux avec une seule procédure expérimentale. Tout au long de nos procédures, la règle des 3R sera respectée :

A chaque étape les vecteurs viraux sont testés au préalable in vitro avant toute application chez l'animal afin de réduire le nombre d'expériences incontournables réalisées sur l'animal. Cependant la validation finale in vivo reste incontournable car nous avons montré que les cellules souches in vitro, donc sorties de leur contexte environnemental naturel, présentent des différences significatives par rapport à leurs homologues in vivo. Les protocoles expérimentaux chez la souris sont établis afin de pouvoir minimiser le nombre d'animaux soumis à expérimentation en utilisant les mêmes contrôles pour différents lots lorsque cela est possible tout en conservant une masse suffisante pour assurer la reproductibilité et la cohérence statistique des observations. Les animaux étant étudiés dans le contexte du muscle injecté potentiellement douloureux, une prévention de la douleur sera assurée par un traitement analgésique approprié et les animaux seront suivis quotidiennement pour vérifier leur bien-être et la survenue d'un des points limites déterminés pour

chaque procédure. Tout signe témoignant d'une mauvaise tolérance au traitement (par exemple perte de poids, souffrance, apathie, déshydratation des animaux) conduira à l'interruption de la procédure.

18071 Intitulé du projet : Effets fonctionnels et cellulaires de trois suppléments nutritionnelles naturelles sur les phases précoce et tardive de réparation musculaire après une lésion induite par un exercice d'intensité élevée

Durée du projet : 24 mois

Mots clés : cellules souches musculaire, force musculaire, agents naturels, supplémentation nutritionnelle, régénération musculaire.

Finalité du projet : recherche fondamentale

Objectifs et bénéfices escomptés du projet

La réparation ou régénération musculaire faisant suite à une blessure implique, entre autres, un type particulier de cellules, les cellules souches du muscle strié squelettique. Lors d'une lésion, les cellules souches s'activent, se multiplient et fusionnent pour former de nouvelles fibres musculaires et restaurer la fonction du tissu musculaire. Les lésions musculaires induites par l'exercice ont un coût élevé pour les sociétés et sont dommageables dans certaines conditions, comme le vieillissement. Dès lors, la possibilité d'utiliser des agents naturels pour promouvoir la fonction des cellules souches musculaire et favoriser/accélérer la réparation musculaire est extrêmement pertinente d'un point de vue thérapeutique pour le muscle sain (e. g. , athlètes de haut niveau) et pathologique (e. g. , arthroplastie totale de hanche, patients atteints de dystrophie, personne âgée) mais également au plan socio-économique (e. g. , récupération fonctionnelle plus rapide post-chirurgie orthopédique, réduction du nombre de chutes chez la personne âgée).

Les objectifs de ce projet de recherche fondamentale sont de mettre en évidence i) l'influence de trois suppléments nutritionnelles naturelles (Approches X, Y et Z, données industrielles confidentielles) sur les phases précoce et tardive de la réparation musculaire en nous appuyant sur un modèle préclinique standardisé de lésions musculaires physiologiques induites par un exercice d'intensité élevée ; ii) à identifier les mécanismes cellulaires sous-jacents.

Nuisances prévues

Les trois suppléments naturels seront administrés par gavage un jour avant et jusqu'à 14 jours après l'exercice d'intensité élevée.

Le protocole de lésions musculaires induites par l'exercice d'intensité élevée et le suivi longitudinal de la force musculaire maximale sont systématiquement réalisés sous anesthésie générale (durée maximum < 15-20 minutes).

Brièvement, les animaux anesthésiés sont placés sur une couverture chauffante pour les maintenir à température physiologique. Le pied de l'animal est positionné sur une pédale qui permet d'enregistrer la force produite par les muscles du mollet en réponse à des stimulations électriques. Celles-ci sont délivrées de manière non-invasive à l'aide de deux électrodes positionnées à la surface des muscles du mollet, la première étant située juste au-dessus du tendon d'Achille, la seconde étant positionnée sous le genou. Ce dispositif expérimental s'apparente aux électrostimulateurs utilisés chez l'Homme et disponibles commercialement. Dans un premier temps, la force musculaire maximale est mesurée dans des conditions isométriques (i. e. , sans modification de la longueur du complexe muscle-tendon) en réponse à des stimulations répétées (ou trains de stimulations) à une fréquence de 150 Hz pendant une durée de 300 ms. Ce paramètre est considéré comme le meilleur marqueur indirect des lésions musculaires. Dans un second temps, le protocole de lésions musculaires est réalisé et consiste en 30 trains de stimulation au cours desquels les muscles du mollet sont étirés grâce à un mouvement rapide de rotation de la pédale sur laquelle le pied de l'animal est positionné. Chaque train de stimulation est séparé par une période de repos de 10 secondes. La durée maximale du protocole d'exercice est donc de 5 minutes (i. e. , 30 trains de stimulation séparés par 10 secondes de repos).

Dans un troisième temps, un suivi longitudinal de la force musculaire maximale est réalisé à J1, J2, J3, J4, J5, J6, J7 et jusqu'à J14 afin d'évaluer les effets fonctionnels des trois stratégies nutritionnelles.

Notre expérience montre que le protocole d'exercice d'intensité élevée n'induit aucune altération de la fonction et de la structure musculaire ainsi qu'aucun changement de mobilité, d'activité et de comportement des animaux. Aussi, les anesthésies répétées à l'isoflurane liées au suivi longitudinal de la force musculaire n'induisent pas de troubles anxieux ou de modifications du comportement, de l'activité et de la mobilité des animaux. Les animaux ne présentent aucun signe de prostration ou d'amaigrissement et sont en mesure de se mouvoir, de s'alimenter et de s'hydrater normalement dès leur réveil et dans les jours suivant le protocole d'intensité élevée. De manière générale, ce protocole d'exercice d'intensité élevée se traduit par une absence de signes cliniquement observables.

Nous prévoyons d'utiliser un maximum de 120 souris et nous estimons le degré de gravité de notre procédure expérimentale comme modérée. L'ensemble des animaux sera mis à mort afin de réaliser des analyses biologiques post-mortem (histologie).

Application de la règle des « trois R »

1. Remplacement

Pour ce projet, les modèles animaux sont indispensables car la procédure implique un protocole d'exercice d'intensité élevée qui est impossible à reproduire in vitro. Aussi, les études de physiologie nécessitent l'utilisation de modèles animaux car seule l'analyse du tissu, voire de l'organisme entier permet d'identifier le réel impact de ces interactions moléculaires et cellulaires sur la fonction de l'organe.

2. Réduction

Nous utilisons un dispositif expérimental totalement non-invasif qui permet de réaliser des protocoles d'exercice d'intensité élevée et de réaliser un suivi longitudinal de la force musculaire sur les mêmes animaux rendant les préparations chirurgicales totalement obsolètes (et réduisant ainsi le nombre d'animaux utilisés).

Des banques biologiques informatisées issues des expérimentations limitent l'utilisation de nouveaux animaux car elles permettent les études histologiques pour plusieurs analyses. Des prélèvements multiples sont réalisés après euthanasie sur le même individu pour des tests parallèles.

3. Raffinement

Notre protocole d'exercice d'intensité élevée est en soi un raffinement du modèle de lésion toxique, utilisé dans la majorité des laboratoires de recherche s'intéressant aux mécanismes de régénération musculaire, et à l'origine d'une lésion de la totalité (100%) des fibres musculaires des 2 muscles tibialis anterior

Les protocoles les moins invasifs et les moins douloureux possibles sont privilégiés. Les procédures expérimentales utilisées incluent un recours systématique à l'anesthésie générale profonde lors de l'exercice et du suivi longitudinal de la force musculaire. Des mesures sont prises pour améliorer les conditions d'élevage afin d'enrichir l'environnement des souris. Aussi, une pesée et un suivi quotidiens des animaux permet d'éviter toute souffrance inutile et de prendre les mesures adéquates dans le cas d'un éventuel phénotype dommageable.

Nous utilisons une lignée de souris C57BL/6. Nous travaillons sur des animaux adultes mâles. Les animaux seront utilisés entre 10 et 16 semaines d'âge.

18072 Le syndrome d'Ondine est une maladie génétique rare, constatée dès la naissance : le nouveau-né diminue sa respiration parfois jusqu'à l'arrêt complet pendant le sommeil. Une caractéristique majeure du syndrome est l'absence du réflexe d'augmentation de la respiration à l'inhalation de gaz carbonique (réponse au CO₂). La maladie est provoquée par une mutation sur une des deux copies d'un gène déterminant pour les fonctions vitales comme la respiration. Actuellement, il n'existe aucun traitement pharmacologique et le recours à une ventilation mécanique à vie pendant le

sommeil est nécessaire. Récemment, l'administration d'une hormone contraceptive chez deux patientes atteintes du syndrome d'Ondine a fait apparaître une réponse au CO₂ suggérant la contribution de cette hormone à rétablir cette sensibilité. Cette piste thérapeutique est prometteuse pour être analysée. L'utilisation d'un traitement pharmacologique permettrait de réduire le recours à la ventilation mécanique et ainsi les risques dus à un arrêt accidentel pendant le sommeil ou à une ventilation inadaptée.

Deux modèles génétiques murins permettent d'étudier la maladie : les souris portant la mutation retrouvée chez l'homme (mutant noté souris KI) et les souris où la mutation est restreinte à une région régissant la réponse au CO₂ (mutant noté souris CKI). Les deux mutants ne répondent pas au CO₂ à la naissance. Les souris KI meurent dans les heures qui suivent la naissance tandis que les souris CKI survivent et récupèrent partiellement une réponse au CO₂ à l'âge adulte. Les souris CKI permettent de comprendre la récupération fonctionnelle de la réponse au CO₂ et de trouver les traitements qui stimulent cette récupération.

L'objectif de l'étude est de comprendre les mécanismes de cette récupération fonctionnelle. Nous testerons l'hypothèse que cette hormone pourrait la favoriser c'est à dire une apparition de la réponse au CO₂ (dans les deux modèles) ou une augmentation de la réponse au CO₂ (cas des mutants CKI). Cette étude 1/ consoliderait les résultats déjà trouvés chez certains patients et 2/ nous guiderait sur les pistes d'amélioration de la prise en charge du syndrome d'Ondine.

Le projet s'étend sur 36 mois et nécessite l'utilisation de 528 souriceaux. Nous utiliserons deux procédures pour caractériser l'effet de l'hormone sur la respiration :

- Caractérisation des apnées des souriceaux KI et CKI à la naissance : apnée obstructive, apnée centrale et/ou mixte.
- Évaluation du traitement hormonal sur les apnées et la réponse au CO₂ des souriceaux KI et CKI. L'hormone est diluée dans de l'huile de tournesol et on laisse le souriceau téter jusqu'à aspiration du volume nécessaire ce qui permet d'éviter le gavage. 5 doses seront évaluées sur les souriceaux CKI et leurs congénères qui servent de contrôles. La dose qui donne une meilleure efficacité sur le plan respiratoire sera testée sur les souriceaux KI et les contrôles.

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

- Remplacement : L'étude préclinique concerne l'expérimentation animale, permet d'obtenir les informations de toxicité et d'efficacité avant l'administration chez l'Homme. l'utilisation d'animaux en développement est un préalable recommandé par l'Agence européenne de médicament pour les stratégies thérapeutiques pharmacologiques notamment pédiatriques.
- Réduction : Nous utilisons l'effectif qui permet d'avoir une puissance statistique (lot de 30 souriceaux par groupe) pour tester nos hypothèses. Nous privilégions une étude longitudinale ce qui réduit le nombre d'animaux utilisés.
- Raffinement : Nous utilisons des techniques de mesures 1/ non invasives et contrôlées (durée, température) pour minimiser une possible angoisse des animaux, 2/ avec acquisition de plusieurs paramètres en simultané ce qui réduit les manipulations. La durée de séparation maternelle pour les mesures n'excède pas une heure pour réduire une possible angoisse. Nos cages sont enrichies en papier doux pour le nid.

Nos expériences ne sont pas douloureuses et ne doivent pas entraîner de souffrances aux animaux. Toutefois nous avons établi des critères points limites adaptés à l'âge des souriceaux nous permettant d'identifier et de limiter la souffrance. L'euthanasie en fin d'expérience ou dans le cas de points limites atteints sera effectuée selon les méthodes réglementaires.

18073 Le syndrome d'Ondine est une maladie génétique rare, constatée dès la naissance : le nouveau-né diminue sa respiration parfois jusqu'à l'arrêt complet pendant le sommeil. Une caractéristique majeure du syndrome d'Ondine est l'absence du réflexe d'augmentation de la respiration en réponse à l'inhalation de gaz carbonique (absence de réponse au CO₂). La maladie est provoquée par une mutation sur une des deux copies du gène PHOX2B. Ce gène est déterminant dans le contrôle des grandes fonctions vitales comme la respiration. Actuellement, il n'existe aucun traitement

pharmacologique et le recours à une ventilation mécanique à vie pendant le sommeil est nécessaire. Chez certains patients, le diagnostic est tardif pendant l'enfance ou plus rarement à l'âge adulte. La maladie se déclare à l'occasion d'une anesthésie générale, ou plus rarement lors d'une infection pulmonaire. Les mécanismes du déclenchement tardif de la maladie ne sont pas connus et restent à élucider. La création d'un modèle génétique murin spécifique permettrait d'y répondre.

Le projet consiste à caractériser ce modèle murin en terme d'adaptation à la vie extra-utérine et de réponse ventilatoire au CO₂. Chez les patients, cette réponse au CO₂ est absente. Pour cela, nous utilisons des techniques de mesures non invasives pour mesurer la respiration des souriceaux. Ces techniques sont mises en œuvre dès la naissance. Ces techniques permettent de mesurer les paramètres ventilatoires : le volume respiratoire inhalé et la fréquence respiratoire.

Le projet s'étale sur deux ans, utilise 280 souris et met en œuvre deux procédures.

1/ Maintien de la lignée permettant de générer les souris mutantes avec mesure de la respiration et suivi longitudinal de la naissance à 21 jours sur 120 souris

2/ Caractérisation des souriceaux mutants : adaptation à la vie extra-utérine (observation), caractérisation des apnées à la naissance, mesure de la réponse ventilatoire aux stimuli gazeux avec suivi longitudinal de la naissance à 21 jours, caractérisation des structures cérébrales défectueuses pouvant expliquer les défauts respiratoires observés. Cette procédure nécessite 160 souris.

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

- Remplacement : L'étude préclinique concerne l'expérimentation animale, permet d'obtenir les informations de toxicité et d'efficacité avant l'administration d'un traitement chez l'Homme. De plus, l'utilisation d'animaux en développement est un préalable recommandé par l'Agence européenne de médicament pour les stratégies thérapeutiques pharmacologiques notamment pédiatriques. L'utilisation de l'animal ne peut être évitée

- Réduction : Nous utilisons l'effectif qui permet d'avoir une puissance statistique pour tester nos hypothèses. Nous privilégions une étude longitudinale ce qui réduit le nombre d'animaux utilisés. Un lot expérimental (génotype) pour les variables respiratoires nécessite 30 souriceaux pour mettre en évidence une différence biologiquement significative.

- Raffinement : Nous utilisons des techniques de mesures non invasives et contrôlées (durée de la mesure, température dans les chambres de mesure) pour minimiser une possible angoisse des animaux. Les cages avec les portées sont enrichies en papier absorbant doux pour le nid.

Nos expériences ne sont pas douloureuses et ne doivent entraîner de souffrances aux animaux. Toutefois nous avons établi des critères points limites adaptés à l'âge des souriceaux nous permettant d'identifier et de limiter la souffrance. L'euthanasie en fin d'expérience ou dans le cas de points limites atteints sera effectuée selon les méthodes réglementaires.

Ce projet permettra de valider un modèle génétique murin pour comprendre les mécanismes physiopathologiques du syndrome d'Ondine notamment dans la forme tardive de la maladie et tester des stratégies thérapeutiques pharmacologiques chez les patients. L'utilisation d'un traitement pharmacologique réduirait le recours à la ventilation mécanique et ainsi les risques dus à un arrêt accidentel pendant le sommeil ou à une ventilation inadaptée. Les retombées de ce travail sont ainsi directement utiles en termes de prévention et d'implications thérapeutiques.

18074 Le syndrome respiratoire aigu sévère coronavirus 2 (SRAS-CoV-2) a été signalé pour la première fois fin 2019 en Chine et est l'agent causal de la pandémie de la maladie à coronavirus 2019 (COVID-19). Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS) le 15 décembre 2020, plus de 70 millions de personnes ont été infectées et près de 1,6 million sont décédées.

Les vaccins sont l'un de nos outils les plus puissants dans la lutte contre les épidémies. Le développement de vaccins peut aider à sauver des vies, à protéger les sociétés et à rétablir les économies. En raison de l'urgence posée par la pandémie, des efforts sont en cours pour développer et étudier les vaccins COVID-19 afin de les approuver et de les rendre disponibles le

plus rapidement possible avec une production d'un nombre suffisant de doses vaccinales pour protéger la population mondiale.

Les campagnes de vaccination contre le Covid-19 ont débuté dans une cinquantaine de pays, 7 vaccins sont approuvés et les chercheurs testent actuellement 63 vaccins dans le cadre d'essais cliniques sur des humains, et 18 ont atteint les étapes finales des tests et au moins 85 vaccins précliniques sont en cours d'investigation chez les animaux.

Le SARS-CoV-2 est à même de subir rapidement des modifications génétiques obligeant à un échappement à la réponse immunitaire, conduisant alors à modifier régulièrement les antigènes utilisés dans les vaccins ou à utiliser des nouvelles cibles.

Le présent projet se propose d'évaluer l'efficacité d'un vaccin produit à partir d'une protéine conservée au sein de la famille des coronavirus, qui oriente la réponse immunitaire vers une réponse cellulaire (en plus de la production d'anticorps) en stimulant certaines catégories de cellules (les lymphocytes T) responsables de la destruction des cellules infectées. Pour évaluer l'immunogénicité de ce candidat-vaccin des souris qui présentent un système immunitaire bien caractérisé seront utilisées pour évaluer les mécanismes de nouvelles molécules thérapeutiques, ou de vaccins. Les vaccins seront testés seuls ou en association avec des adjuvants (substances permettant d'augmenter la réponse immunitaire). Des groupes de 6 souris seront donc vaccinés à deux reprises à 21 jours d'intervalle, par voie intramusculaire, pour étudier la réponse immunitaire spécifique au vaccin. A l'issue de l'expérimentation, la capacité du vaccin à produire des anticorps spécifiques au vaccin et à stimuler la réponse des lymphocytes T sera évaluée.

La compréhension de l'activation de la réponse immunitaire, notamment le trafic des lymphocytes et la génération d'une mémoire immunitaire efficace est ici primordiale. C'est pourquoi, suite aux données préliminaires obtenues, le modèle expérimental chez la souris est indispensable et ne peut pas être remplacé. En effet, la réponse immunitaire est un phénomène biologique complexe faisant intervenir de multiples types de cellules avec une activation de cytokines permettant la communication entre les cellules qui rend impossible son étude dans des tests *in vitro*. Toutefois, toutes les procédures expérimentales ont un caractère de stricte nécessité et ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales et sont planifiées suivant la règle des 3R "Réduire, Remplacer et Raffiner", de manière à utiliser le moins d'animaux possible, permettant d'obtenir des résultats exploitables statistiquement des diverses expériences sans compromettre les objectifs du projet. Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée contribuent au bien-être animal pour causer le moins possible de douleur, de souffrance, d'angoisse ou de dommages durables que pourraient ressentir les animaux.

Ce projet nécessitera l'utilisation de 144 souris au maximum.

18075 Les infections ostéo-articulaires (IOA) sont des infections qui posent un problème majeur de santé publique (>40. 000 cas par an en France, plus d'un million dans le monde), et pour lesquelles les options de traitement sont insatisfaisantes. Ces infections nécessitent souvent une prise en charge importante, avec des chirurgies multiples, de nombreuses périodes d'invalidité et d'antibiothérapies, causant une morbidité importante et des problèmes de tolérance. Les causes de l'augmentation du nombre de ces infections sont multifactorielles : augmentation du nombre de pose de prothèses, gestes médicaux invasifs... rendant l'identification de nouvelles approches/cibles thérapeutiques nécessaires.

Staphylococcus aureus (*S. aureus*), aussi appelé Staphylocoque doré, est une des bactéries responsables de ces IOA créant la destruction osseuse et des inflammations localisées. Certaines souches de *S. aureus* deviennent de plus en plus résistantes aux antibiotiques existants et deviennent l'une des causes principales d'infections acquises en milieu hospitalier. Des facteurs de virulence exprimés par la bactérie font que ces infections évoluent d'une forme aigue classique (infection soudaine, symptômes rapides) sous une forme chronique (maladie à longue durée de vie, évolutive) qui devient très difficile à traiter. Cette chronicisation résulte de la capacité des bactéries à former des biofilms ou leur capacité à s'internaliser dans des réservoirs intracellulaires (comme les cellules de moelle osseuse), et ainsi échapper au système immunitaire de l'hôte.

Les réponses immunitaires participent au contrôle de la croissance des pathogènes. Notamment, les lymphocytes cytotoxiques sont spécialisés dans la reconnaissance et la destruction de cellules infectées par des pathogènes intracellulaires. Cependant, *S. aureus* a développé un moyen de leur échapper. Ainsi, dans le cadre d'un réservoir bactérien intracellulaire, la manipulation de la réponse immunitaire et donc des lymphocytes cytotoxiques, semble très intéressante mais les connaissances fondamentales sur ces mécanismes immunitaires dans cette pathologie restent peu connues.

Également, l'absence de biomarqueurs fiables des IOA chroniques empêche la compréhension des mécanismes de persistance de cette bactérie : difficulté pour identifier les patients sains des patients infectés asymptomatiques, difficultés pour l'inclusion des patients dans les essais cliniques, difficultés de suivi de guérison des patients suivant les traitements existants.

Pour cette étude, nous utiliserons un modèle murin d'infection à *S. Aureus* qui reproduit l'infection ostéo-articulaire associée à *S. aureus* chez la souris. Ce modèle déjà développé dans un laboratoire allemand, a été mis en place au sein de notre animalerie. A la suite d'une infection par *S. aureus* (réalisée sous anesthésie gazeuse), les souris subissent une perte de poids pendant les 7 premiers jours pouvant entraîner l'atteinte d'un point limite, et seront donc surveillées quotidiennement. Elles reprennent leur poids initial environ 14 jours après infection. Le modèle mimant les infections ostéo-articulaires, *S. aureus* entraîne également des destructions osseuses chez la souris, se caractérisant par une réduction de la densité osseuse. Ces dommages osseux ne touchent pas l'ensemble des os de la souris, mais seulement ceux où les bactéries s'implantent. Ces dommages corporels peuvent entraîner, de manière rare, des difficultés pour se mouvoir. En cas d'observation de ces signes cliniques et afin d'améliorer le bien être des souris, nous pourrions mettre à disposition de l'eau et de la nourriture directement dans la cage.

Cette étude a donc plusieurs buts :

- Caractériser la réponse immunitaire lors de l'infection à *S. Aureus* et en particulier la réponse des lymphocytes cytotoxiques.
- Etudier le potentiel thérapeutique de la réponse des lymphocytes cytotoxiques dans le modèle d'infection chronique à *S. Aureus* et en particulier
- Etudier l'efficacité d'anticorps, utilisés actuellement dans les immunothérapies, qui vont permettre de lever l'inhibition des lymphocytes cytotoxiques.
- Identifier des marqueurs précoces pour diagnostiquer le passage d'une forme aiguë à une forme chronique pour envisager le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Le projet nécessitera l'utilisation de 1180 souris. Le choix du modèle souris est imposé par son utilisation dans les tests pré-cliniques des compagnies pharmaceutiques et par la nécessité de pouvoir utiliser des animaux génétiquement modifiés. La réponse immunitaire est un phénomène biologique complexe faisant intervenir de nombreuses cellules immunitaires différentes et une organisation spatiale qui rend impossible son étude dans des tests in vitro.

Des études préliminaires in vivo ont permis montrer que le pourcentage d'infection des souris est proche de 50%. Le nombre d'animaux utilisé est réduit au minimum en tenant compte de cette donnée, afin que les groupes de souris soient suffisant pour l'interprétation statistique des résultats.

18076 Ce projet innovant vise à découvrir de nouveaux rôles d'une protéine clé impliquée dans la maladie d'Alzheimer (MA), la protéine précurseur du peptide amyloïde (APP). Nous savons que le dysfonctionnement de l'APP affecte la mémoire des patients malades mais la fonction de cette protéine est peu connue. Au cours de la dernière décennie, il a été suggéré un déséquilibre des systèmes de communication entre les neurones du cerveau. Nous chercherons quel rôle peut jouer l'APP dans la communication inhibitrice entre les neurones. Nous postulons que la perturbation des fonctions de l'APP dans la communication inhibitrice contribue à la pathologie de la MA. Ce projet permettra donc de mieux comprendre la maladie et à terme d'identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques. La réalisation du projet est basée sur la modification génétique des neurones étudiés dans leur tissu natif (tranches de cerveau de souris), c'est-à-dire dans un contexte physiologique. Nous supprimerons le gène encodant la protéine APP dans les neurones étudiés

avant d'analyser si la communication inhibitrice entre les neurones est perturbée par l'absence d'APP. Ces modifications génétiques seront réalisées grâce à l'utilisation de ciseaux moléculaires injectés dans les neurones du cerveau afin d'enlever ou de remplacer le gène encodant pour l'APP. Ces injections cérébrales auront lieu sur des souris anesthésiées par une procédure appelée « chirurgie stéréotaxique ». Nous utiliserons la lignée de souris APP/APLP2dkoc qui n'a pas de phénotype dommageable. Chaque semaine, une session de chirurgie stéréotaxique permettra d'injecter cette lignée de souris qui seront par la suite utilisées au cours d'expériences d'enregistrement de l'activité des neurones (électrophysiologie) ou des expériences d'imagerie cellulaire et moléculaire.

Tout au long du projet, nous appliquerons la règle des 3R (Réduction, Raffinement, Remplacement). (1) Le même animal sera utilisé pour différents protocoles d'électrophysiologie ou d'imagerie afin de récolter un maximum de données scientifiques pour chaque souris (réduction). (2) Des protocoles expérimentaux simples avec un nombre limité de conditions seront employés. Tous les protocoles sont optimisés pour soulager le stress et la douleur des animaux tout au long de cette étude. Ainsi la chirurgie stéréotaxique est réalisée sous anesthésie générale avec une couverture antalgique (Lidocaine en local et buprenorphine en sous-cutanée) qui permettra une limitation de la douleur pendant et après le réveil de l'animal ainsi que l'utilisation d'un tapis chauffant. Les animaux seront surveillés quotidiennement par les zootechniciens et les expérimentateurs avec une surveillance renforcée après la chirurgie et la mise en place d'une réhydratation et d'un réchauffement. Des points limites sont définis et décrits dans les procédures pour éviter la souffrance des animaux. De plus, un enrichissement des cages constitué de maisons en papier mâché et de tunnels seront utilisés pour permettre aux animaux de se cacher et établir des liens sociaux entre eux (raffinement). (3) Les modèles de remplacement in vitro actuellement disponibles ne récapitulent pas l'architecture du cerveau et ne permettent pas d'étudier les mécanismes de communication au sein de réseau de neurones. D'autre part, la souris est à ce jour le seul modèle mammifère dont le génome est facilement modifiable.

880 souris seront nécessaires à la réalisation de ce projet essentiel à une meilleure compréhension de la maladie d'Alzheimer.

18077 Les équipages des missions spatiales habitées rapportent parfois des perturbations de leurs fonctions cérébrales. Dans le cadre des projets d'explorations humaines de l'espace, il est nécessaire de mieux comprendre les altérations du fonctionnement cérébral sur des modèles animaux de façon à pouvoir proposer des méthodes pour limiter les effets du vol spatial par l'étude des modifications cellulaires et moléculaires, au sein du tissu cérébral, qui sont induites par la modification de l'environnement gravitaire. L'exposition au vol spatial étant difficile à mettre en œuvre, la recherche a développé des modèles de microgravité simulée qui consiste à suspendre l'animal par le train arrière au moyen d'un harnais. Ce modèle reproduit chez le rat le déconditionnement cardiovasculaire, les pertes osseuses et musculaires des membres inférieurs observés chez les spationautes. Le rat a le corps un angle de 45° du corps par rapport au sol de la cage, et un système de poulie permet le déplacement de l'animal dans la cage en marchant sur ces pattes avant ; le protocole de suspension pouvant durer 21 jours au maximum. Il dispose d'eau de boisson en permanence et sa nourriture est donnée quotidiennement et son bien-être de l'animal est suivi quotidiennement durant la totalité de l'exposition à la suspension.

Ce projet souhaite investiguer l'hypothèse selon laquelle la simulation de la microgravité pourrait engendrer une altération des concentrations de neurotransmetteurs tels que la dopamine ou la sérotonine dans les zones cérébrales impliquées dans la régulation des mouvements volontaires ou des processus cognitifs comme la prise de décision. Le développement des techniques de mesures permet aujourd'hui d'établir des cartes cérébrales des concentrations de ces neurotransmetteurs donnant accès ainsi aux liens fonctionnels entre des régions cérébrales. Cela nous permettra de localiser et modéliser les altérations potentielles des voies de signalisations de ces neurotransmetteurs. Les effectifs minimaux et maximaux d'animaux par groupe sont basés sur nos expériences antérieures et les données de la littérature : pour une démonstration convaincante d'un point de vue statistique 10-12 animaux par groupe seront nécessaires. Pour le respect de la règle

des 3R : REMPLACEMENT : la cartographie des concentrations des différents neurotransmetteurs ne peut se faire que sur des animaux donc il n'est pas possible de remplacer le modèle animal par un autre organisme ou par une lignée cellulaire.

REDUIRE : ce projet vise à réduire considérablement le nombre d'animaux inclus dans ce type d'étude, puisque les techniques de neurochimie que nous utiliserons dans ce projet permettront d'effectuer des mesures dans de nombreuses zones cérébrales et nous pourrions prélever d'autres organes pouvant être mis à disposition de la communauté scientifique s'intéressant aux problématiques de vie dans l'espace (muscle, os, cœur et vaisseaux, foie, plasma et cellules sanguines).

RAFFINER : La mise en place de la microgravité simulée pouvant être une source de stress, nous avons particulièrement porté notre attention au raffinement des protocoles de façon à assurer aux animaux un minimum de contraintes et un maximum de bien-être. Ce dernier suivi et apprécié, tous les jours, dans une fiche de score (paramètres de stress et de comportement) au cours des expériences (manipulation biquotidienne des animaux, suivis de paramètres physiologiques : poids, température, consommation de nourriture et de boisson, activité physique, ...).

Ce projet utilisera au maximum 192 animaux sur 2 ans, de sexe mâle et femelle répartis dans les différents groupes expérimentaux. Parmi ces animaux, les animaux contrôles ne seront pas soumis à la suspension.

18078 Le traitement de nombreuses pathologies cancéreuses ou bénignes nécessite, en complément d'un traitement médicamenteux, de la chirurgie.

La chirurgie conventionnelle passant par une ouverture cutanée, et communément appelée chirurgie ouverte, présente des risques pour le patient. En effet un temps de récupération long, des douleurs post opératoires intenses et une augmentation du risque infectieux sont les inconvénients majeurs d'une telle intervention.

Depuis de nombreuses années des techniques dites mini invasives, comme la coelioscopie, se développent. Cette technique, devenue depuis un standard en chirurgie, présente un avantage majeur, celui de diminuer les contraintes rencontrées en chirurgie ouverte, mais présente certaines limites. Lors d'une intervention chirurgicale coelioscopique, les instruments utilisés sont totalement rigides dépourvus d'articulation, l'endoscope (caméra) qui permet la vision sera contrôlé, non pas par le chirurgien opérateur, mais par un tiers. Durant toute la totalité de l'intervention chirurgicale, le chirurgien sera debout au-dessus du patient dans une position inconfortable ce qui pourrait avoir un impact sur la concentration et l'état général de ce dernier.

Voilà pourquoi une nouvelle forme de chirurgie mini invasive a vu le jour, la chirurgie mini invasive robotique assistée. Cette dernière approche va combiner les avantages des deux autres et en apporter de nouveaux. Le chirurgien va travailler assis à une console, avec une vue en trois dimensions, contrôlant des instruments complètement articulés et cela en toute autonomie.

Aujourd'hui, les chirurgiens qui souhaitent accéder à la robotique doivent se former.

Il existe du personnel qualifié en robotique travaillant dans des centres spécialisés qui permettent la prise en main de ces nouveaux dispositifs et proposent différents modèles de chirurgie.

Après des phases de formation en simulation virtuelle, sur modèles en plastique, il reste une étape indispensable pour que ces chirurgiens soient prêts à opérer des patients. Afin de leur permettre de réaliser une intervention en toute sécurité sur l'Homme, une formation technique sur tissus vivants est nécessaire voir incontournable.

En effet des applications comme l'utilisation d'énergie visant à coaguler un vaisseau, disséquer ou exposer un tissu n'a de sens que sur un modèle vivant. Le modèle porc a été retenu du fait de sa taille adaptée aux instruments laparoscopiques et son homologie anatomique avec l'homme.

Ainsi 100 animaux seront nécessaires pour ce projet de formation, pour former tous les chirurgiens des établissements hospitaliers qui s'équipent en chirurgie robotique assistée en Europe et ailleurs.

Les animaux seront utilisés dans le respect de la règle des 3Rs :

Remplacement : Les premières phases de formation se feront par l'utilisation de méthodes alternatives (simulation virtuelle, modèle en plastique). Une fois le chirurgien prêt, il évoluera vers un apprentissage technique sur animal en suivant un protocole strict. L'enseignement comprend aussi des sessions sur sujet anatomique afin de compléter les objectifs de formation. De plus les chirurgiens qui souhaitent accéder à la robotique doivent se former sur l'équipement avant de pouvoir mettre en pratique les gestes opératoires assistés par le robot sur des patients.

Réduction : Le nombre de porcs sera réduit au minimum, à raison d'un animal par binôme avec une optimisation de chaque animal sur lequel plusieurs gestes chirurgicaux par temps opératoire pourront être effectués.

Raffinement : Les porcs sont préalablement hébergés en groupe sociaux selon la réglementation en vigueur, ils disposent d'enrichissements leur permettant d'exprimer leurs comportements naturels comme le fouissage, l'exploration d'objets à mâchouiller, le repos sur une aire dédiée. Une surveillance et des soins quotidiens sont apportés par une équipe qualifiée.

Le protocole prévoit des procédures mini-invasives réalisées sous anesthésie générale par un chirurgien sous la supervision d'un formateur qualifié.

Tous les animaux seront soumis à des procédures sans réveil. Toute anomalie pouvant impacter le bien-être des animaux est signalée au vétérinaire désigné qui prendra les dispositions de soins nécessaires.

18079 Ce projet innovant vise à découvrir de nouveaux rôles d'une protéine clé impliquée dans l'épilepsie et la maladie d'Alzheimer (MA). On sait que les patients atteints de la MA ont une incidence accrue de convulsions épileptiques. Au cours de la dernière décennie, on a suggéré un déséquilibre des systèmes de communication entre les neurones du cerveau. Cette perturbation de l'activité du réseau peut causer de l'épilepsie et peut être une cause de déclin cognitif dans la MA. La protéine SV2A a été associée à la physiopathologie de l'épilepsie et a été une cible moléculaire de médicaments antiépileptiques. SV2A, de par sa localisation, participerait à la communication entre les cellules nerveuses. Nous chercherons quel rôle peut jouer SV2A dans la neurotransmission. Nous postulons que le dérèglement des fonctions de SV2A dans la neurotransmission peut aussi participer à la pathologie de la MA. Ce projet vise à mieux comprendre le rôle de SV2A dans l'orientation épileptique de la maladie et, en fin de compte, à identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement de l'épilepsie et de la MA. La réalisation du projet est basée sur la modification génétique des neurones étudiés dans leur tissu natif (tranches de cerveau de souris), c'est-à-dire dans un contexte physiologique. Nous supprimerons le gène encodant la protéine SV2A dans les neurones étudiés avant d'analyser si la communication entre les neurones est perturbée par l'absence de SV2A. Ces modifications génétiques seront réalisées grâce à l'utilisation de ciseaux moléculaires injectés dans les neurones du cerveau afin d'enlever ou de remplacer le gène encodant pour SV2A. Ces injections cérébrales auront lieu sur des souris anesthésiées par une procédure appelée « chirurgie stéréotaxique ». Nous utiliserons la lignée de souris SV2A^{ko} qui n'a pas de phénotype dommageable. Chaque semaine, une session de chirurgie stéréotaxique permettra d'injecter des souris qui seront par la suite utilisées au cours d'expériences d'enregistrement de l'activité des neurones (électrophysiologie) ou d'expériences d'imagerie cellulaire et moléculaire.

Tout au long du projet, nous appliquerons la règle des 3R (Réduction, Raffinement, Remplacement). (1) Le même animal sera utilisé pour différents protocoles d'électrophysiologie ou d'imagerie afin de récolter un maximum de données scientifiques pour chaque souris (réduction). (2) Des protocoles expérimentaux simples avec un nombre limité de conditions seront employés. Tous les protocoles sont optimisés pour soulager le stress et la douleur des animaux tout au long de cette étude. Ainsi la chirurgie stéréotaxique est réalisée sous anesthésie générale avec une couverture antalgique (Lidocaine en local et buprenorphine en sous-cutanée) qui permettra une limitation de la douleur pendant et après le réveil de l'animal ainsi que l'utilisation d'un tapis chauffant. Les animaux seront surveillés quotidiennement par les zootechniciens et les expérimentateurs avec une surveillance renforcée après la chirurgie et la mise en place d'une réhydratation et d'un réchauffement. Des points limites sont définis et décrits dans les procédures pour éviter la

souffrance des animaux. De plus, un enrichissement des cages constitué de maisons en papier mâché et de tunnels seront utilisés pour permettre aux animaux de se cacher et établir des liens sociaux entre eux (raffinement) (3) Les modèles de remplacement in vitro actuellement disponibles ne récapitulent pas l'architecture du cerveau et ne permettent pas d'étudier les mécanismes de communication au sein de réseau de neurones. D'autre part, la souris est à ce jour le seul modèle mammifère dont le génome est facilement modifiable.

780 souris seront nécessaires à la réalisation de ce projet essentiel à une meilleure compréhension de l'épilepsie et la maladie d'Alzheimer.

18080 Notre laboratoire étudie le système immunitaire, sa régulation et les pathologies associées. Notre objectif est la compréhension des mécanismes moléculaires de la biologie et de la physiopathologie du lymphocyte B. Ces études nécessitent l'utilisation de souris génétiquement modifiées, modèles indispensables pour une compréhension globale des systèmes complexes et multi-localisés tel que le système immunitaire. Les modifications génétiques permettent d'appréhender le rôle d'un gène en particulier dans le développement normal et tumoral du système immunitaire B ce qui peut donner des pistes d'intervention thérapeutique innovante pour les lymphomes. Les souris sont utilisées pour ces études car leur génome (ensemble de leurs gènes) et leur système immunitaire est proche de celui de l'Homme. Les études in vitro utilisant des lignées cellulaires ou des études in silico ne peuvent pas remplacer l'animal pour ces études car elles ne permettent pas de retranscrire toutes les interactions existantes au sein du système immunitaire et entre le système immunitaire et d'autres systèmes physiologiques.

A cette fin, le laboratoire génère régulièrement de nouvelles lignées transgéniques permettant des avancées majeures dans le domaine de l'immunologie et de l'onco-hématologie. La technique de congélation d'embryons est une méthode de conservation permettant de sauvegarder les lignées obtenues ou établies par le laboratoire tout en diminuant le nombre d'animaux respirant nécessaire au maintien de la lignée.

Cette technique consiste à accoupler des mâles avec des femelles, à récupérer les embryons après euthanasie des les femelles fécondées et à procéder à la congélation de ces derniers par un processus de refroidissement lent.

Cette technique permet de préserver le travail effectué au sein du laboratoire tout en respectant la règle des 3R, à savoir :

-Remplacer : la congélation en elle-même et la création d'un stock d'embryons permet de remplacer les accouplements d'animaux vivants par la réimplantation d'embryons.

-Réduire : les animaux vont suivre un traitement hormonal permettant l'augmentation du nombre d'embryons produits par femelle et la réduction du nombre de femelles euthanasiées. Les mâles ainsi que les femelles non utilisées pour la récupération d'embryons seront rendues à leur propriétaire. De plus, notre laboratoire possède une grande expérience dans l'élevage des lignées murines destinées à la recherche ce qui permet la production minimale d'animaux pour effectuer les diverses expériences.

-Raffiner : les animaux sont élevés dans des conditions d'hébergement (température et hygrométrie de l'environnement, densité d'animaux, présence systématique d'enrichissement, change régulier de la litière, nourriture et eau ad libitum, surveillance quotidienne de l'état général des animaux) qui respectent leur bien-être. De plus, l'ensemble des procédures sera réalisé de manière à limiter le stress et la souffrance des animaux. La personne en charge des injections et des prélèvements est une personne qualifiée de par son expérience et les différentes formations obtenues: formation à l'expérimentation animale et formation chirurgie.

Sur 5 ans, il est prévu de congeler les 120 lignées d'animaux déjà présentes au sein de notre animalerie et de créer 10 nouvelles lignées par an, soit l'utilisation de 3400 animaux. Les mâles seront rendus à leur propriétaire après accouplement (1700 mâles) et seules les femelles bouchées seront euthanasiées pour la récupération d'embryons, soit 1700 femelles au maximum.

18081 L'émergence du nouveau coronavirus SARS-CoV-2 en fin décembre 2019, a conduit à une crise sanitaire mondiale majeure ayant occasionné une mortalité importante en raison des complications pulmonaires sévères engendrées par la maladie appelée COVID-19. Le SARS-CoV-2 surprend par son haut niveau de transmission, atteignant le stade de pandémie en moins de 4 mois.

Pour lutter contre cette pandémie le plus vite possible, en complément des mesures de confinement mises en œuvre dans de nombreux pays, plusieurs études précliniques ont été lancées à travers le monde pour comprendre l'évolution du virus et les conséquences physiopathologiques de son infection afin d'identifier les molécules thérapeutiques cibles et de mettre en œuvre des thérapies innovantes.

Dans l'urgence de la situation, nos laboratoires proposent un projet visant à développer une nouvelle approche thérapeutique reposant sur l'apport local de nanoparticules constituées d'apolipoprotéine A1 (apoA1), par instillation, pour une délivrance rapide dans les poumons. L'apoA1 est une protéine endogène constituant les lipoprotéines de haute densité (HDL-cholestérol communément qualifié de « bon cholestérol »). Nous avons déposé un projet plus large en réponse à un appel à projets national de recherche visant à réagir face au COVID-19. Nous avons proposé dans celui-ci de mettre en place les différents modèles *in vitro* et *in cellulo* permettant de tester la capacité des nanoparticules d'apoA1 à limiter l'infection par le SARS-CoV-2 sur cellules (en tâche 1) et l'infection pulmonaire associée aux complications chez les rongeurs (en tâche 2). La tâche 1, nous permettra d'observer si l'effet des molécules thérapeutiques que nous proposons est bénéfique ou pas face au virus, ce qui conditionnera la poursuite ou pas du projet sur les animaux.

Nos résultats préliminaires ont montré, en préclinique sur des modèles murins, que l'instillation par voie intranasale (voie d'administration non invasive) a permis l'absorption et la persistance des nanoparticules d'apoA1 (jusqu'à 72h) dans les poumons. Il faut aussi savoir que la molécule d'apoA1 présente des effets anti-inflammatoires importants qui peuvent limiter la réponse immuno-inflammatoire excessive de l'hôte (viro-induite par SARS-CoV-2 et nocive pour ses poumons et qu'elle pourrait posséder une activité antivirale intrinsèque.

Des souris transgéniques exprimant un récepteur humain du virus ont été développées pour l'étude du SARS-CoV, mais sont pour l'instant difficiles à obtenir et nécessitent d'être validées pour l'étude des thérapies possibles contre le SARS-CoV-2. Plusieurs publications ont utilisé le hamster doré, mentionnant qu'il pouvait constituer un bon modèle d'infection, mimant les symptômes du Covid-19.

Ainsi l'objectif de cette expérimentation animale est de développer une nouvelle approche thérapeutique reposant sur l'instillation de nanoparticules apoA1 (N-apoA1) dans un modèle hamster doré infecté par le SARS-CoV-2. Nous souhaitons renforcer les effets possiblement protecteurs des nanoparticules d'apoA1 en les enrichissant en molécules antivirales siRNA – small interfering RNA – (N-apoA1 + siRNA). Le design de ce projet permettrait d'étudier l'effet antiviral d'une part et l'effet anti-inflammatoire d'autre part de chacune de ces deux molécules (N-apoA1 et N-apoA1 + siRNA).

Dans un premier temps, des mises au point sont nécessaires afin de déterminer quelques paramètres d'étude et de valider le modèle. Ainsi la biodisponibilité des nanoparticules d'apoA1 marquée au Technicium radioactif (N-apoA1_99mTc) sera d'abord validée chez le hamster doré. Aussi, l'infection du hamster sera confirmée après viro-induction au SARS-CoV-2.

Dans un second temps, et pour répondre concrètement à la problématique, les hamsters seront infectés puis traités avec les 2 molécules thérapeutiques.

Pour mener à bien ce projet nous prévoyons alors un total de 75 hamsters dorés mâles âgés de 6-10 semaines répartis dans les groupes suivants :

>>pour les mises au points

-4 hamsters non infectés + traitement N-apoA1_99mTc en imagerie du petit animal pour entraînement technique sur le modèle d'étude

-8 hamsters non infectés + traitement N-apoA1_99mTc en imagerie du petit animal pour l'évaluation de la biodistribution tissulaire et sanguine

-15 hamsters infectés au SARS-Cov 2 pour la mise au point du modèle dans l'animalerie de confinement 3

>>et pour atteindre l'objectif du projet (en animalerie de confinement 3)

Effet antiviral :

-8 hamsters infectés au SARS-CoV-2 + instillation PBS 1X

-8 hamsters infectés au SARS-CoV-2 + traitement N-apoA1

-8 hamsters infectés au SARS-CoV-2 + traitement N-apoA1 + siRNA

Effet anti-inflammatoire :

-8 hamsters infectés au SARS-CoV-2 + instillation PBS 1X

-8 hamsters infectés au SARS-CoV-2 + traitement N-apoA1

-8 hamsters infectés au SARS-CoV-2 + traitement N-apoA1 + siRNA

Pour répondre aux principes de 3Rs :

Remplacement. Comme précisé précédemment, des expériences in vitro et in cellulo (tâche 1) sont effectuées en amont de cette expérimentation animale permettant de valider les effets des nanoparticules ; cependant il sera important d'observer l'effet de nos traitements sur un organisme entier tel que le hamster dont l'infection par SARS-CoV-2 n'est ni modélisable ni observable autrement qu'in vivo. De plus, l'emploi de cette thérapie chez l'homme doit d'abord pouvoir être validé en préclinique.

Raffinement. L'instillation, comme d'autres procédures qui pourraient induire un stress chez les hamsters seront effectuées sous anesthésie générale des hamsters. Suite à cette infection, ils pourraient recevoir une dose d'analgésique afin de supprimer toutes les douleurs potentielles liées à l'infection. Les hamsters seront observés tous les jours afin de détecter les moindres signes de souffrances. Des séances d'habituation des animaux seront prévues.

Réduction. Au vu des études précédentes et de la littérature, 8 animaux par groupe est le minimum que nous pouvons nous autoriser afin de collecter une quantité suffisante de données permettant l'interprétabilité des résultats. L'étude sera scindée en plusieurs expériences séparées dans le temps, afin de ne pas commander et mettre à mort des animaux inutilement, dans le cas où les procédures de mise au point s'avèreraient non-concluantes.

In fine, notre projet permettrait une transposition rapide en application clinique, d'autant plus que les nanoparticules d'apoA1 sont déjà disponibles sous forme injectable pour application chez l'homme.

Aussi, les patients admis dans les unités de soins intensifs (USI) présentant un syndrome respiratoire aigu plus ou moins sévère, pourraient être éligibles à ces traitements. La plupart des patients dans une USI auront besoin d'un soutien respiratoire et l'instillation des particules d'apoA1 pourrait réduire considérablement le temps d'hospitalisation.

18082 CCONTEXTE

Le cancer du sein est le 1er cancer de la femme dans le monde, avec plus de 58000 nouveaux cas diagnostiqués en France en 2018. Si on note une augmentation de son incidence ces 30 dernières années, sa mortalité diminue via l'amélioration des thérapeutiques (chirurgie, radiothérapie, traitement systémique). La qualité de vie des patients touchés par un cancer du sein fait partie intégrante de leur plan de soins. Si dans la majorité des cas, un traitement chirurgical conservant le sein est possible, 40% des patients bénéficieront d'une mastectomie totale, induisant des séquelles physiques et psychologiques.

Après mastectomie totale, des études récentes mettent en évidence une amélioration significative de la qualité de vie des patients lorsqu'une reconstruction mammaire est réalisée. Cette reconstruction mammaire peut se faire au cours de la même chirurgie que la mastectomie totale, soit lors d'une 2ème intervention chirurgicale. Deux grands types de reconstruction mammaire existent actuellement : celle utilisant la mise en place d'un implant mammaire (ou prothèse), et celle

dite autologue, utilisant les tissus de la patiente, via des lambeaux et/ou lipomodelage (greffe de tissus gras). Chaque technique présente des avantages et des limites.

L'utilisation d'une prothèse s'associe à la nécessité de changer la prothèse tous les 10-15 ans, impliquant de nouvelles interventions chirurgicales espacées dans le temps, avec un risque d'évolution asymétrique entre les deux seins. La technique par lambeaux nécessite des cicatrices supplémentaires pour prendre les tissus nécessaires à la reconstruction du sein, un nombre plus d'important de chirurgies pour obtenir le résultat souhaité. L'avantage principal des lambeaux repose sur l'évolution à long terme de la reconstruction qui sera plus naturelle et symétrique par rapport au sein controlatéral, sans nécessité de nouvelles chirurgies dans le temps.

C'est dans ce contexte que se développe des bioprothèses aux propriétés biodégradables, favorisant la régénération tissulaire. Cette bioprothèse se mettrait en place comme une prothèse. Elle permettrait d'obtenir une reconstruction mammaire autologue sans corps étranger de par son aspect biodégradable, tout en laissant place au tissu du patient via sa capacité de régénération tissulaire, avec un moindre nombre de chirurgies. Un lipomodelage serait réalisé dans le même temps opératoire et/ou lors d'une 2ème intervention chirurgicale. Le lipomodelage consiste en un prélèvement de tissu gras du patient (comme une technique de liposuccion réalisée au niveau des cuisses, de l'abdomen...), centrifugé, puis injecté au niveau de la bioprothèse. Ce lipomodelage favoriserait la régénération tissulaire au contact de la bioprothèse. Cette bioprothèse associe donc les avantages des techniques de reconstruction mammaire existantes, sans les inconvénients.

Notre étude cherchera à développer la procédure chirurgicale pour réaliser une reconstruction mammaire par bioprothèse, de manière à favoriser les propriétés de celle-ci.

OBJECTIF

Le but du projet est de mettre au point la procédure chirurgicale la plus adaptée pour l'implantation d'une bioprothèse de reconstruction mammaire sur un modèle animal porcin.

L'étude portera également sur la capacité de la bioprothèse à favoriser le développement des tissus de l'hôte, sa dégradation et sa tolérance seront analysées cliniquement, biologiquement et en anatomopathologie.

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

Il s'agit d'un projet de recherche translationnelle qui impliquera au maximum 2 miniporcs, de sexe féminin pour une durée maximale de 5 ans.

La procédure expérimentale permettra de décrire la meilleure technique d'implantation d'une bioprothèse sur un miniporc.

Il est envisagé une mise à mort de l'animal à la fin du projet.

CONFORMITE AVEC LES 3R :

Une étude préalable a été menée chez le rat pour évaluer la tolérance et la résorption du biomatériau utilisé.

Des études in vitro préalables permettront d'évaluer les caractéristiques de la bioprothèse et une étude anatomique (sur animaux morts) a permis de déterminer les meilleurs paramètres à tester lors de l'étude in vivo.

Le protocole d'anesthésie a été mis au point afin d'éviter toute souffrance. La chirurgie sera effectuée par des chirurgiens expérimentés.

Un animal est le strict minimum nécessaire pour mettre au point la technique chirurgicale la mieux adaptée pour l'étude préclinique de la bioprothèse mais un 2ème animal est prévu en secours en cas de problème indépendant de la procédure.

18083 Le projet s'inscrit dans le domaine des productions piscicoles et vise à favoriser la diversité des espèces en élevage pour produire de façon plus durable et plus efficiente des poissons d'eau douce. Fondé sur des principes agroécologiques, le projet porte sur l'élevage multi-espèces de poissons (ou polyculture) pour plusieurs raisons. La polyculture favorise une utilisation optimale de toutes les ressources, qu'elles soient trophiques (avec l'association d'espèces ayant différents régimes

alimentaires), spatiales (en associant des espèces occupant différentes zones dans le milieu aquatique) ou temporelles (combinaison d'espèces diurnes et nocturnes). L'élevage multi-espèces peut aussi diminuer les réponses aux stress des poissons (effet apaisant de certaines espèces vis-à-vis d'autres). Pour ce faire, la polyculture nécessite que les espèces à élever ensemble soient compatibles (c'est-à-dire qu'elles puissent partager le même espace de vie, avec une absence d'interactions néfastes et de compétition pour les ressources) et éventuellement complémentaires (c'est-à-dire en capacité d'exploiter différentes ressources et/ou développer des interactions positives). Une méthode *in silico* a été développée sur la base des caractéristiques morphologiques (par exemple taille, masse), physiologiques (p. ex. le taux de croissance), phénologiques (comme la durée de vie) et comportementales (p. ex. l'activité de nage) d'un grand nombre d'espèces de poissons, ces informations étant disponibles dans différentes bases de données. Le développement de cette méthode permet ainsi de définir de façon prospective des paires d'espèces selon un gradient contrasté de compatibilité, allant de 0 pour des espèces incompatibles à 1 pour des espèces parfaitement compatibles, prenant aussi en compte leur stade de développement. Si cette méthode vise clairement à limiter les approches de type essais-erreurs et donc l'expérimentation sur animaux (s'inscrivant clairement dans une logique de REMPLACER l'expérimentation animale), elle nécessite toutefois une validation préalable, avec le recours à des poissons. Cette phase de validation sera conduite avec l'application de trois tests en circuit d'élevage en eau recirculée. Chaque test (durée : 4 mois) est établi à partir d'une espèce phare, à partir de laquelle il a été décidé d'associer deux autres espèces. Pour valider au mieux la méthode, à partir d'une espèce phare, chaque test comprendra 4 modalités : 1) Monoculture (élevage de l'espèce phare seule), 2) Polyculture avec un indice de compatibilité théorique élevé, 3) Polyculture avec un indice de compatibilité théorique moyen et 4) Polyculture avec un indice de compatibilité théorique plus faible.

Les trois tests mobiliseront des espèces phares différentes, l'objectif étant de valider la méthode sur différentes espèces phares (carassin argenté, gardon et sandre). Sachant que la densité des poissons est à adapter au volume d'élevage et à la capacité de filtration des unités d'élevage, deux tests seront conduits dans des aquariums de 300 L. Le choix des tests en aquarium vise à REDUIRE le nombre de poissons nécessaires alors que le troisième test sera appliqué dans des bassins de 2 m³, un choix justifié par la nécessité de s'approcher au mieux des conditions réelles d'élevage de pisciculteurs. Le nombre total de poissons nécessaires pour le projet est de 6146. Trois procédures expérimentales seront appliquées correspondant à des suivis zootechniques et physiologiques. Le projet sera conduit avec le souci permanent de respecter les exigences physiologiques et comportementales de l'ensemble des espèces de poissons, avec l'application de points limites dans un objectif de RAFFINER le parcours expérimental et tous les actes portés sur les poissons.

18084 L'équilibre du sel dans l'organisme est extrêmement régulé. Les apports alimentaires excédentaires en sel sont excrétés par les reins. Un déséquilibre entraîne des modifications importantes de la quantité de sel (chlorure de sodium) retenue par l'organisme et peut avoir des conséquences pathologiques importantes. De nombreuses études chez l'homme et chez l'animal ont montré qu'un apport excessif en sel est un facteur de risque aggravant les conséquences de l'hypertension ou du diabète. La restriction de l'apport en sel est souvent proposée à ces patients permettant notamment de limiter les atteintes rénales et cardiovasculaires.

Il a été récemment décrit que la peau stocke du sodium et qu'elle joue un rôle important dans la balance sodée en plus du rein. L'objectif de notre étude est de déterminer si le stock de sodium dans la peau est mobilisable lors d'une perte rénale chronique en sel induite chez la souris. Les souris seront traitées avec deux diurétiques différents également utilisés chez l'homme et connus pour induire une perte en sel. Nous étudierons le contenu en sel de la peau de ces animaux et nous faisons l'hypothèse que la mobilisation de ce stock pourrait être bénéfique pour le maintien de l'équilibre du sel dans l'organisme. Nous étudierons également la capacité des vaisseaux sanguins cutanés de ces souris à se dilater lors de l'utilisation de plusieurs stimuli mécaniques et pharmacologiques. Cette fonction de dilatation est un moyen de tester l'intégrité de ces vaisseaux. L'exploration de la quantité de sodium dans la peau et l'étude de la réactivité vasculaire cutanée nécessite une approche *in vivo*. Aucune méthode alternative ne peut donc se substituer à l'utilisation

d'animaux pour la réalisation de notre projet car il requiert une approche intégrée avec la participation de différents organes (intestin, rein, peau). Le nombre de souris nécessaire a été réduit au minimum sans compromettre l'interprétation statistique de nos résultats. Le poids des souris sera suivi pendant le traitement aux diurétiques et des points limites sont clairement définis.

Ce projet concernera 162 souris au maximum.

18085 Les neuropathies périphériques induites par la chimiothérapie (NPICs) sont des neuropathies à prédominance sensitive. Aujourd'hui, la seule prévention contre les NPICs repose sur le dépistage des neuropathies préexistantes et sur la détection précoce de signes cliniques chez des sujets soumis à une chimiothérapie neurotoxique. La mise en évidence d'une NPIC justifie parfois un changement de stratégie thérapeutique vers d'autres molécules non ou moins neurotoxiques lorsque celles-ci sont disponibles. Il apparaît évident que prévenir les NPICs ainsi que leur développement par une thérapeutique appropriée est une priorité pour assurer le maintien et donc l'efficacité des traitements anti-cancéreux et améliorer la qualité de vie des patients. Un des concepts émergents est l'implication de mécanismes immuns dans la physiopathologie des NPIC. De plus en plus d'études suggèrent que la stimulation de mécanismes inflammatoires par les chimiothérapies serait responsable du développement des NPIC. Les immunoglobulines humaines polyvalentes à usage thérapeutique par voie intraveineuse (IgIV) exercent une activité anti-inflammatoire par la régulation des niveaux de cytokines, du niveau de NFkB et de l'activité et du nombre de cellules immunitaires. Ainsi, l'administration d'IgIV de façon préventive dans les protocoles de chimiothérapie anticancéreuse pourrait être une stratégie efficace dans la prévention du développement de NPIC, du fait des propriétés anti-inflammatoires et immunomodulatrices des IgIV. Les modèles *in vitro* ne permettent pas de modéliser la complexité de la réponse immunitaire d'un organisme entier face à l'administration de cytotoxiques. Le modèle animal, en tant que système intégré, reste le choix obligatoire pour étudier la neuropathie induite par la chimiothérapie, et présente les avantages ; de se rapprocher de la clinique humaine et d'être peu invasif pour l'animal. Ce projet de recherche est validé par l'HCERES.

L'objet de ce projet est d'évaluer l'effet des IgIV sur le développement de la neuropathie périphérique induite par la vincristine (VCR), le paclitaxel (PTX) et l'oxaliplatine (OXP) chez la souris. Cette première étude fonctionnelle sera focalisée sur les effets du traitement par IgIV sur l'apparition et l'intensité d'éventuelles douleurs neuropathiques induites par la chimiothérapie : la neuropathie induite par la VCR (NPIC) sera générée par des injections intrapéritonéales quotidiennes de VCR pendant 7 jours, la neuropathie induite par l'OXP (NPIO) par trois injections intrapéritonéales d'OXP, réalisées tous les trois jours, la neuropathie induite par le paclitaxel (NPIP) par 4 injections intrapéritonéales de PTX, réalisées tous les deux jours. Pour étudier l'effet neuroprotecteur des IgIV sur les NPIC, les animaux recevront une injection intrapéritonéale d'IgIV à différentes doses (0,5 g/kg, 1 g/kg et 2 g/kg) 24 h avant la première injection de l'agent anticancéreux et une fois par semaine jusqu'à la fin de l'expérimentation. Pour les modèles de souris NPIC et NPIO, l'étude fonctionnelle dure respectivement 10 jours et 14 jours, de sorte que les souris recevront 2 injections d'IgIV. Pour l'étude NPIP (3 semaines), les souris recevront 3 injections d'IgIV (cf Figures 1-3).

Ainsi, 20 groupes de 10 animaux (cf Tableau 1) seront ainsi utilisés pour l'étude principale. Le nombre de 10 animaux par groupe a été calculé à partir de résultats (moyenne et écart-type) obtenus au cours de l'étude correspondant au projet APAFIS#11280-2017091510483336. Le degré de gravité et la cinétique de la neuropathie sensitive seront évalués à l'aide de tests comportementaux réalisés pendant et suivant les jours d'injection de l'agent anti-tumoral. Seuls des tests d'évitements seront utilisés pour l'évaluation de la douleur. Une valeur limite est établie pour chaque test à partir de laquelle l'animal est soustrait au stimulus même s'il ne présente aucun signe de douleur. Les tests choisis vont permettre la détection d'une allodynie ou d'une hyperalgésie mécanique (test des filaments de von Frey) et l'évaluation de la réponse nociceptive au chaud et au froid (test de la plaque chaude/froide, jump test).

Des études antérieures ont montré que l'injection répétée d'IgIV humaine (hIgG) chez des souris C57/Bl6 ne provoquait pas d'anomalies cliniques ou histopathologiques, ni de maladie sérique.

D'autres ont montré que l'hlgG pouvait modifier les conditions de santé chez les souris BALB/c et dans un modèle murin de la maladie de Parkinson. Ainsi, une étude préliminaire sera menée pour évaluer si les IgG de la souris (mlgG) sont plus appropriées ou équivalentes aux hlgG dans notre souche de souris ; des souris Swiss. Cette étude préliminaire sera menée sur 10 souris ; 5 recevront trois injections de 2 g/Kg de hlgG à 5 jours d'intervalles et 5 autres recevront la même quantité de mlgG. L'état général et le poids seront suivis quotidiennement pendant 15 jours avec l'élaboration d'une grille d'évaluation. Si l'administration d'hlgIV chez les souris Swiss est mal tolérée et induit des anomalies cliniques ou histopathologiques associées à une réaction immunitaire, alors l'étude principale sera réalisée avec des immunoglobulines de souris.

Les animaux (soit 210 au total) seront élevés dans des conditions d'hébergement (température et hygrométrie de l'environnement, densité d'animaux, présence systématique d'enrichissement, change régulier de la litière, nourriture et eau ad libitum, surveillance quotidienne de l'état général des animaux) qui respectent leur bien-être. L'ensemble des procédures sera réalisé de manière à limiter le stress et la souffrance des animaux (anesthésie, détermination d'une limite haute au-delà de laquelle l'animal sera soustrait au stimulus pour les tests fonctionnels). Les modèles murins de neuropathie induite par la VCR, le PTX et l'OXP reproduisant les symptômes observés en clinique humaine, ont été mis au point et caractérisés au sein de l'équipe de recherche par une analyse fonctionnelle et morphologique (APAFIS#11280-2017091510483336). Ainsi, l'équipe de recherche maîtrise les modèles de neuropathie chimio-induite et les tests de sensibilité associés qui requiert un savoir-faire et un suivi précis des réactions de l'animal.

18086 L'autoimmune PolyEndocrinopathy - Candidiasis - Ectodermal - Dystrophy est une maladie auto-immune héréditaire rare qui reste aujourd'hui mortelle et incurable. Les patients atteints de cette pathologie présentent une déficience pour la protéine autoimmune regulator qui est le régulateur de la transcription clé de la sélection négative. Lorsque AIRE n'est pas exprimée les thymocytes auto-réactifs échappent à la délétion clonale ce qui conduit au développement d'auto-immunité en périphérie.

Récemment notre équipe a généré le premier modèle de rat déficient pour la protéine AIRE. Contrairement aux modèles déjà existants, celui-ci présente des symptômes similaires à la pathologie humaine. Notre équipe a de plus étudié la capacité du traitement anti-CD45RC à réguler le développement des symptômes sur ce modèle de rat.

Plusieurs études montrent le rôle de l'IL-2 et de la prednisolone sur la régulation des lymphocytes T Régulateurs, ce qui est aussi le cas pour le traitement anti-CD45RC testé par notre équipe, et qui a montré des résultats prometteurs.

L'objet de cette saisine est donc d'évaluer le potentiel thérapeutique de la prednisolone ou d'un traitement d'IL-2 à faible dose (IL-2 low dose) sur les symptômes autoimmuns présentés par le modèle de rat Aire^{-/-} du syndrome APECED, et de comparer l'efficacité de ces traitements à celle observée avec l'anti-CD45RC.

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

- Remplacer : Des études fonctionnelles ont été réalisées in vitro, les résultats sont prometteurs mais sont limités par l'absence du contexte physiologique et de la complexité du système immunitaire et ne peuvent remplacer les études in vivo.

- Réduire : Le nombre d'animaux par groupe est réduit au nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs (Log Rank test pour les courbes de survie, description des tests statistiques utilisés détaillée ci-après). Le nombre de groupes a été réfléchi de sorte à avoir les contrôles suffisants pour pouvoir conclure quant aux résultats obtenus.

- Raffiner : Les animaux atteignant une perte de poids de 20% par rapport à leur poids initial seront euthanasiés, ainsi que les animaux montrant des signes physiques caractéristiques d'un mal être tel qu'un changement de comportement. Durant le protocole, les animaux seront suivis pour leur poids, le développement des symptômes de l'APECED (vitiligo, alopecie et dystrophie onguulaire). Tous les animaux traités avec l'une des molécules et ceux des groupes contrôles seront analysés afin d'en obtenir un maximum d'information post mortem, au niveau anatomopathologique pour les

lésions dans les organes dues à l'auto-immunité et par immuno-histologie pour étudier l'infiltration des cellules dans les tissus inflammés.

Dans l'ensemble de ce projet 340 rats seront utilisés, toutes souches et génotypes confondus. Grâce à ce "n", les résultats obtenus dans chaque procédure pourront être statistiquement significatifs.

18087 La mucoviscidose est une maladie génétique qui induit un défaut d'efflux chlorures lié à la déficience du gène qui code pour une protéine appelée CFTR et la principale cause de morbidité et de mortalité est liée à une obstruction des voies aériennes. À l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement efficace pour tous les patients et d'autres stratégies thérapeutiques doivent être envisagées. Une solution proposée est d'activer d'autres canaux chlorures qui compenseraient le défaut de CFTR. Une activation d'autres canaux permettrait une restauration des efflux chlorures de façon indépendante à la protéine CFTR.

Il a été montré qu'il était possible d'activer ces autres canaux par une molécule thérapeutique en agissant sur des petits ARN sur des cellules des voies aériennes.

Ces résultats nous ont conduits à effectuer une étude pilote chez la souris dans laquelle nous avons pu mettre en évidence que la technique d'administration intranasale était bien tolérée et qu'elle se révélait active chez la souris au niveau de la trachée sans entraîner de conséquences négatives observables (comportement, poids...).

Des travaux récents du laboratoire ont montré in vitro que notre molécule était également active sur des cellules d'autres organes (os, pancréas...) ce qui nous amène à penser qu'une administration systémique pourrait être envisagée pour corriger l'ensemble des problèmes liés à la mucoviscidose. Les souris atteintes de mucoviscidose meurent au moment du sevrage d'une obstruction digestive qu'il est possible de compenser en leur donnant un laxatif. Le projet a pour but de traiter les animaux par injections sous-cutanées de notre molécule au moment du sevrage et tous les 15 jours.

Type d'animaux : 129. Cftrtm1Eur

Nombre d'animaux :

Avant l'utilisation du modèle murin, des modèles cellulaires ont été utilisés pour valider l'approche. Le modèle murin est actuellement le seul modèle expérimental qui permette de travailler dans un organisme vivant représentatif de la pathologie de la mucoviscidose. Ce modèle ne peut être substitué par un autre modèle non animal. Ce projet impliquera l'utilisation d'un nombre maximal de 24 souris pour une durée maximale de 2 ans. Ce projet nécessitera 8 souris adultes (+/-) qui n'ont pas de caractères dommageables pour la reproduction et de 24 souriceaux (-/-). L'utilisation de ce modèle nous oblige à utiliser des points limites afin de limiter la souffrance de l'animal. Nous avons limité la manipulation des animaux au strict minimum afin de limiter le stress. Les souris seront maintenues dans les conditions réglementaires d'élevage.

Remplacement-Réduction-Raffinement :

Dans le cadre de la procédure de remplacement, nous avons effectué de nombreuses expériences sur des lignées cellulaires ainsi que sur des cellules primaires de patients atteints de mucoviscidose. Nous avons atteints la limite des modèles in vitro c'est la raison pour laquelle nous devons passer à des modèles in vivo. L'expérimentation in vivo permettra de travailler sur un animal entier, ce qui n'est pas possible avec les modèles in vitro.

Dans le cadre de ce projet, nous avons réduit le nombre d'expérimentations au minimum en tenant compte des résultats escomptés afin que cela puisse être significatif et que nous n'ayons pas à refaire d'expérimentations ultérieurement. Ce nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrits au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal. Afin de limiter au maximum le recours aux animaux. Nous avons au préalable effectué de nombreuses expériences in vitro et ex vivo (cultures de cellules issues de patients) qui ont montré des résultats positifs de l'utilisation du

produit que l'on veut et qui ont été publiés. Dans le cadre de cette étude, nous utiliserons des techniques déjà établies et publiées qui permettent de limiter le nombre de souris aux expériences indispensables permettant d'avoir assez de données pour une analyse statistique. De plus, grâce à notre projet précédent sur la souris qui a reçu les autorisations nécessaires, nous savons que notre molécule n'a pas de conséquences sur la perte de poids ou sur son comportement lors d'une administration intranasale ou sous-cutanée. Par ailleurs, des travaux de la littérature utilisant des molécules similaires ont montré que l'administration systémique était possible chez la souris sans induire d'effets secondaires. Nous nous sommes basés sur ces articles et sur une étude de toxicité effectuée par une CRO indépendante avec la molécule que l'on veut tester.

Les animaux sont hébergés dans les conditions standard de l'animalerie.

Ils sont stabulés en portoirs ventilés avec un système d'abreuvement automatique et un accès ad libitum à la nourriture. Les conditions de température et d'hygrométrie sont contrôlées et monitorées. Le cycle d'éclairage est de 12h par jour (6h-18h). Les animaux sont hébergés avec leurs congénères (6 par cage maximum) et l'isolement est évité au maximum. Le milieu est enrichi avec au choix : lanières de papier Kraft, maisons en carton, tunnel en carton ou carré de coton compacté. Une prise de poids et une évaluation comportementale seront effectuées quotidiennement pour vérifier l'état général des souris pour les procédures les plus à risques.

18088 Malgré des avancées majeures dans le traitement du mélanome métastatique, avec l'arrivée des thérapies ciblant les anomalies moléculaires dans les cellules tumorales puis de l'immunothérapie visant à remobiliser les défenses immunitaires, beaucoup de patients ne répondent pas favorablement à ces traitements. En effet, ils présentent une résistance dès le début du traitement (résistance dite primaire) ou après avoir répondu favorablement pendant un certain temps (résistance secondaire).

Notre équipe a montré, il y a quelques années, qu'un complexe protéique appelé eIF4F était impliqué dans la résistance de tumeurs de patients aux thérapies ciblées dans le mélanome métastatique.

Nous souhaitons désormais étudier l'implication de ce complexe dans la réponse immune antitumorale. Les premiers tests in-vitro, en laboratoire, sur des modèles cellulaires montrent que ce complexe joue un rôle dans la régulation de certaines protéines qui jouent un rôle dans l'inhibition de la réponse immunitaire. Ainsi, en bloquant ce complexe nous pourrions bloquer ces protéines et lever l'inhibition pesant sur le système immunitaire. Ces résultats sont encourageants.

La question posée par ce projet nécessite d'avoir accès à la complexité de l'environnement microtumoral. Ceci n'est possible que sur un animal vivant entier. De même, ce projet fait appel à des études en lien avec la réponse immune dans l'organisme entier.

Les contraintes pour les animaux seront l'implantation de tumeurs par voie sous-cutanée. Ces tumeurs seront suivies strictement quotidiennement et les expériences arrêtées précisément à l'atteinte de signes prédéfinis (dont la taille maximale de tumeur). Nous réaliserons des expériences sur des souris en analysant un maximum de paramètres sur un maximum d'organes afin d'optimiser au mieux l'utilisation de chaque animal dans le respect de la règle des 3R. Le nombre de souris total maximal prévu est de 2912 sur 5 ans. Ce nombre pourra être revu à la baisse grâce à une étude pilote qui permettra de définir les meilleures conditions et le nombre minimum de souris permettant d'observer des résultats statistiquement significatifs.

Les résultats obtenus pourront être appliqués ensuite dans des études cliniques, chez l'humain, avec des molécules inhibitrices en cours de développement. Tous ces travaux ont pour objectif de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques contre le cancer.

18089 La radiothérapie (RT) fait partie des traitements les plus utilisés chez les patients atteints de cancer. A l'heure actuelle, en France, 60% des patients diagnostiqués pour un cancer sont traités par RT. Cependant, pour certaines tumeurs, la RT à base de rayons X (RX) présente des bénéfices limités en termes de contrôle de la tumeur et de survie et qu'elle peut présenter des effets délétères sur les tissus non tumoraux.

Lors d'études précédentes, et ce en accord avec d'autres travaux, nous avons montré que l'irradiation aux RX pouvait modifier l'inflammation des tumeurs cérébrales en favorisant notamment les macrophages protumoraux. De plus, plusieurs études ont également montré des effets de la radiothérapie sur les leucocytes circulants, effets appelés lymphopénie.

Contrairement à la RT conventionnelle qui utilise des photons (rayons X), l'hadronthérapie, qui comprend notamment la protonthérapie (PT) utilise des particules chargées 2000 fois plus lourdes. Parce qu'elle peut déposer de façon précise des doses d'irradiation dans le tissu, la protonthérapie peut être utilisée pour : i) limiter les risques de radiotoxicité en réduisant l'exposition du tissu sain et ii) augmenter la dose déposée à la cible pour accroître la probabilité du contrôle tumoral.

Récemment, il a été proposé que l'hadronthérapie en général et la protonthérapie en particulier pourraient agir sur la composante inflammatoire.

Le but de ce projet est d'appréhender si au-delà des avantages précisés précédemment, la PT pourrait présenter des avantages en termes d'inflammation anti-tumorale, notamment en nous intéressant aux effets sur les leucocytes circulants.

Pour ce faire, nous souhaitons comparer les effets de l'irradiation cérébrale à base de photons aux effets de l'irradiation cérébrale à base de protons sur les cellules immunitaires circulantes. Nous utiliserons dans ce projet des souris syngéniques immunocompétentes C57/Bl6. 90 souris seront nécessaires. 40 animaux seront irradiés en Rayons X, 40 animaux seront irradiés en Protons, 10 animaux serviront de contrôle. Après les irradiations, les taux de cellules inflammatoires circulantes seront ensuite suivis à Caen.

Ainsi, la projet étant réalisé sur deux établissements dépendant de deux comités d'éthique différents, 2 autorisations de projet sont déposées.

Pour ce projet la règle des 3R sera utilisée.

Concernant le remplacement, nos études précédentes réalisées sur les cultures primaires et lignées de macrophages doivent maintenant être confirmées *in vivo* car les effets de la PT doivent être confirmés pour les leucocytes en incluant le flux sanguin lors de l'irradiation qui ne saurait se faire sans passer par l'expérimentation animale.

L'utilisation de la méthodologie de dosage des sous types de leucocytes permet de réduire fortement le nombre d'animaux puisque chaque animal peut-être suivi à différents temps post-irradiation.

Concernant le raffinement, le protocole a été pensé de manière à limiter au maximum la souffrance animale et ainsi augmenter le bien-être animal avec par exemple des applications de xylocaïne pour les prélèvements du sang ou l'utilisation d'anesthésie pour les irradiations cérébrales afin d'éviter un maximum le stress de l'animal.

18090 En vue de contribuer à la transition écologique deux modes de production d'aliments se montrent particulièrement prometteurs : l'agriculture biologique et l'association de la production végétale et animale. Si l'interdiction de l'usage de pesticides pour le contrôle des nuisibles constitue le principal atout de l'agriculture biologique, le recyclage des sous-produits et le bouclage des cycles de nutriments constituent les avantages d'associer la production végétale à la production animale. Cependant, rares sont les exemples de rapprochement des vertus de ces deux modes de production.

C'est avec l'objectif d'intégrer ces deux logiques et d'apporter des connaissances scientifiques sur les plans technique et humain, que l'idée d'associer l'arboriculture fruitière (pommiers) et l'élevage des lapins en agriculture biologique est née. Sur le plan technique, l'hypothèse générale est que l'association des lapins à un verger de pommiers apporte des bénéfices pour les plantes et pour les animaux. Le choix du lapin présente plusieurs avantages : herbivore de petite taille, le lapin est capable de pâturer une grande quantité d'herbe sans risque de tassement du sol. Il est aussi capable de tolérer une grande quantité de cuivre ce qui est compatible avec l'usage de cuivre comme fongicide en arboriculture biologique. Nous évaluerons si la présence des lapins dans un verger de pommiers permet : (i) le désherbage sans risque de tassement du sol, (ii) la rupture du

cycle biologique de certains bio-agresseurs, (iii) l'amélioration de composantes de la fertilité des sols, et (iv) une meilleure valorisation de l'espace agricole, via la diversification de la production. Réciproquement, nous évaluerons dans quelle mesure le verger contribue à : (i) nourrir les lapins, (ii) améliorer leur bien-être (microclimat, milieu de vie plus diversifié), (iii) les protéger contre les prédateurs (abri, refuges), (iv) favoriser leur santé digestive (parasitisme, apport de fibres), et (v) réduire l'apport d'intrants (granulés). Cependant, si nous partons de l'hypothèse que l'association apportera des bénéfices, la complexification des systèmes peut également entraîner l'apparition de dysfonctionnements. Ainsi, le lapin pourrait ravager les cultures, attirer les prédateurs ou être malade.

Remplacement :

Ce projet est à visée agronomique. Afin d'atteindre les objectifs d'évaluation des bénéfices réciproques de l'association culture et élevage, l'expérimentation animale est essentielle.

Réduction / Raffinement :

Nous prévoyons d'utiliser dans ce projet un total de 281 lapins (44 femelles reproductrices, 12 mâles reproducteurs et 225 lapereaux sevrés). Le projet est construit de façon à mettre au point les conditions d'hébergement des lapins de façon progressive (3 phases de prototypage) en exposant un petit nombre d'animaux (45 lapereaux) aux nouvelles conditions d'élevage en plein air avant de déployer l'essai sur un plus grand nombre (180 lapereaux). Les conditions de vie des lapins en plein air devront permettre de respecter leurs besoins (abris, protection contre les prédateurs et les aléas climatiques, expression des comportements propres à l'espèce, nourriture) et les contraintes du travail du verger. Les animaux auront accès à un abris, à une aire herbagée et recevront un complément de nourriture (granulés et foin) de façon à ce que leurs besoins nutritionnels soient bien couverts. Les prototypes seront testés pendant trois semaines.

Chacun des prototypes successifs sera évalué et soumis à la discussion de professionnels (éleveurs et arboriculteurs) afin d'apporter les améliorations et modifications nécessaires. Ces trois tests nous apporteront des informations très pertinentes permettant le raffinement des conditions de logement des lapins en plein champ. La santé (problèmes de santé éventuels), le comportement et la croissance (pesées) des animaux seront suivies ce qui permettra de définir les conditions optimales pour déployer l'essai final qui vise la quantification et qualification des bénéfices et contraintes de l'association arboriculture fruitière - élevage de lapins. Cet essai final prévoit l'utilisation de 180 jeunes lapins pendant 8 semaines (entre 42 et 100 jours) : avec un groupe contrôle (lapins plein champ sans verger) et un groupe expérimental (lapins plein champs sous verger de pommiers).

Le projet ne prévoit pas de gestes invasifs. Toutefois, l'élevage en plein air risque d'exposer les jeunes lapins à des aléas météorologiques (stress thermique) et à des problèmes de santé (troubles digestifs, parasitisme). En cas d'intempéries excessives, ou de maladies, les animaux seront placés dans un bâtiment, réchauffés et soignés si nécessaire. Les logements seront conçus de façon à protéger les animaux du vent et de la pluie. Ils pourront se réfugier dans un abris et se serrer les uns contre les autres pour se réchauffer ce qui constitue un comportement naturel des lapins. Les animaux seront vaccinés contre la myxomatose et la maladie hémorragique du lapin, maladies virales mortelles pour les lapins. Ils seront protégés des prédateurs par des filets et clôtures électrifiées. Enfin, les lapins seront amenés dans le verger dans des cages de transport sécurisées et prévues pour les lapins avec accès à de l'eau et de la nourriture pendant l'entièreté du trajet (450 km). Le véhicule est équipé pour le transport d'animaux avec une ventilation et un contrôle de la température. Aucun voyage ne sera entrepris en cas de températures extrêmes (canicules par exemple). Les lapins seront manipulés et surveillés au quotidien par des personnes expérimentées. Le bien-être des animaux sera évalué : expression des comportements propres à l'espèce (ronger, bondir, se dresser, interagir avec des congénères, se cacher, brouter), confort, santé, état corporel.

18091 Un nouveau système d'imagerie ultra miniaturisé et portable nous permet aujourd'hui de visualiser l'activité de centaines de neurones individuellement pendant la réalisation d'une tâche comportementale chez la souris.

L'objectif de cette étude est la mise en place et la validation d'un protocole avec ce système pour l'observation de l'activité neuronale la souris en utilisant 2 stratégies différentes : (1) indicateur calcique chez des souris transgéniques et (2) indicateur calcique apporté par injection d'un vecteur viral.

Ces protocoles, une fois validé par ce premier projet, serviront de base à nos futurs projets utilisant ce système d'imagerie, notamment dans l'étude des troubles des comportements motivationnels, d'addiction et d'interactions sociales.

Pour cette expérimentation 40 souris (mâles et femelles) maximum seront utilisées. En effet dès que le procédé (expression du l'indicateur calcique, implantation et enregistrement de l'activité neuronal) sera réalisé avec réussite de manière répétée (4 enregistrements successifs réussis dans chacune des stratégies), le procédé et la technique seront considérés comme acquis et validés et les expériences pourront s'arrêter.

Raffinement : les populations neuronales ciblées par cette méthode sont très spécifiques. Les conditions d'élevage des animaux seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu (cabanes plexiglass et cartons, tubes). Les injections/implantations intracérébrales se feront sous anesthésie générale par des chercheurs formés et expérimentés. Les animaux recevront un traitement analgésique avant l'intervention, un traitement anti-inflammatoire après l'intervention et 24 heures après. Si nécessaire un traitement antibiotique sera administré. Chaque animal est placé sur une couverture thermorégulée pour éviter toute hypothermie. Les cornées sont protégées de la déshydratation. L'anesthésie gazeuse est ici privilégiée pour mieux contrôler la profondeur d'anesthésie et pour une meilleure récupération post-opératoire. Une surveillance post-opératoire d'une semaine est réalisée pour suivre chaque souris et intervenir si nécessaire.

Remplacement : aucune méthode alternative in vitro n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée.

Réduction : 40 souris (mâles et femelles) maximum seront utilisées. Les effectifs sont optimisés pour la mise en place d'un nouveau protocole (pas de test statistique). En effet dès que le procédé (expression du l'indicateur calcique, implantation et enregistrement de l'activité neuronal) sera réalisé avec réussite de manière répétée (critère: 4 enregistrements successifs réussis dans chacune des stratégies et au moins 6 souris enregistrées par stratégie), le procédé et la techniques seront considérés comme acquis et validés et les expériences pourront s'arrêter sans utiliser la totalité de 40 souris.

18092 Malgré des progrès dans le traitement de nombreux cancers, les résistances à certains agents thérapeutiques, les rechutes ou l'absence de traitements efficaces dans certains cas font que les cancers au sens large sont encore un problème majeur de santé publique nécessitant le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Dans ce contexte, le développement et l'amélioration des techniques de production/modification d'anticorps permettant aujourd'hui d'obtenir de manière rapide et efficace des anticorps de spécificités souhaitées laissent entrevoir de réels espoirs. En effet, l'utilisation seule ou en combinaison avec des traitements déjà existants, de nouveaux anticorps à visée thérapeutique a déjà été couronnée de succès cliniques importants ou très prometteurs (Herceptin, Adcetris, Ipilimumab, Nivolumab), ce qui en fait une stratégie efficace de choix et en plein essor, notamment dans la lutte contre le cancer.

Le projet faisant l'objet de la présente demande s'inscrit dans ce cadre, à savoir qu'il a pour objectif de pouvoir faciliter et accélérer le transfert de la recherche fondamentale ou industrielle vers la clinique en permettant de tester les effets thérapeutiques anti-tumoraux potentiels d'anticorps candidats médicaments in vivo chez la souris.

Il consiste au développement et à l'utilisation dans notre animalerie de modèles précliniques de greffes de cellules tumorales chez la souris, dans le respect de la règle de « 3R ». Ces modèles murins sont indispensables pour permettre l'évaluation de l'effet thérapeutique anti-tumoral, de la toxicité et du devenir chez l'animal des anticorps candidats médicament. Ils constituent une

première étape essentielle et incontournable avant le transfert vers la clinique de candidats médicament. Ils sont largement décrits dans la littérature et ne peuvent aujourd'hui être remplacés à ce stade des études précliniques par aucune autre méthode satisfaisante.

De ce fait, les mesures permettant de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, leur souffrance et leur angoisse seront prises, comme par exemple :

-Ne seront injectés aux souris que les « couples » cellules cancéreuses / anticorps pour lesquels un effet des anticorps aura été observé in vitro.

-Le nombre d'animaux nécessaires par lot par expérience sera calculé en se basant à la fois sur les données de la littérature, des expériences « pilotes » et un test statistique de puissance.

-Le suivi du développement des pathologies et/ou de l'effet des anticorps testés sera évalué au cours du temps par des méthodes non invasives.

-Dès qu'un animal atteindra un des points limites définis (cf 3. 4. 13), il sera mis à mort selon la méthode recommandée (cf 3. 3. 3).

-Les animaux seront hébergés dans des cages avec de l'enrichissement et adaptées pour contenir 5 individus et ainsi minimiser le stress de l'isolement.

Dans ces conditions, pour les 5 ans du projet, le nombre maximum estimé d'animaux utilisés est de 29 720, répartis parmi les souches de souris suivantes : Nude athymique, Nude NMRI, CB17-SCID, NOD-SCID, NSG, Rag1 KO, C57BL/6Nrl, BALB/c, transgéniques hNKp46 sur fond C57BL/6Nrl ou Rag1 KO, et B6-Cd3eEm1 sur fond C57BL/6Nrl.

18093 Contexte:

Les tests ont pour but de réaliser un comparatif entre deux systèmes d'imagerie d'endomicroscopie, un système actuellement sur le marché et une nouvelle génération. Ce système d'imagerie est utilisé pour l'observation à l'échelle microscopique des tissus humains durant des endoscopies digestives et des bronchoscopies. Une première phase de tests sur des échantillons ex vivo a été réalisée. Cependant, la démonstration d'efficacité doit nécessairement être réalisée dans des conditions se rapprochant des conditions cliniques. Le recours à l'utilisation d'animaux pour cet essai est de ce fait indispensable.

Objectif:

Les tests permettront l'acquisition d'images de tissus dans les principaux organes représentatifs des indications cliniques dans lequel le système est actuellement utilisé. La finalité est de valider l'équivalence des 2 systèmes en terme de qualité d'image.

Ces tests sont réalisés sur porc car cet animal possède des caractéristiques physiologiques et une architecture des tissus muqueux qui se rapprochent de celles de l'humain.

Les acquisitions des images auront lieu pendant des procédures d'endoscopie classique avec selon les cas, une injection d'agent de contraste.

Le projet consiste à planifier 3 sessions d'acquisitions afin de s'assurer d'avoir le temps et la possibilité d'obtenir le panel complet d'images des organes anatomiques souhaités. Le but est également de pouvoir tester une ou plusieurs versions de logiciel du nouveau système (selon les dates des tests).

La comparaison des images sera réalisée par des experts cliniques internes durant la prise d'image ainsi qu'au cours d'une revue post-acquisition via le biais de questionnaires.

Dommages versus bénéfices:

Les procédures d'endoscopie sont minimalement invasives et de classe « légère », aucun dommage spécifique dû aux procédures réalisées n'est attendu.

Les porcs feront l'objet de l'injection d'un produit de contraste dont le taux de complication (allergie) est faible chez l'homme et est attendu faible également chez le porc.

Conformité aux 3R:

Le nouveau système sera testé avec plusieurs versions de logiciel non validées d'un point de vue réglementaire. Préalablement, des tests ex vivo ont été réalisés mais le signal de fluorescence était d'un niveau variable, d'où la nécessité de réaliser ces tests sur animal avant de mettre à disposition l'appareil pour une utilisation chez l'humain

Le principe des différentes sessions de test est un comparatif d'images prises par les 2 systèmes dans les mêmes organes observés (avec changement de versions logicielles du nouveau système d'une session à l'autre).

Nous n'envisageons pas de traitement statistique. Ces tests sont essentiellement destinés à évaluer l'impact des modifications du logiciel du système sur la qualité d'image.

Afin que les échantillons d'images recueillies soit optimisés et suffisants, plusieurs acquisitions d'image par organe seront réalisées afin qu'une seule procédure d'endoscopie par système et par organe suffise.

Il n'est donc à priori pas nécessaire d'avoir plusieurs porcs prévus par sessions pour réaliser les tests, sauf en cas d'impossibilité de réaliser l'endoscopie sur l'un des animaux.

De plus, le même animal pourrait être utilisé au cours des différentes sessions de tests si l'animal a pleinement recouvré son état de santé et de bien-être général et qu'un avis favorable du vétérinaire aura été donné à la fin de chaque session.

Ces 3 sessions de tests étant espacées dans le temps il est néanmoins possible qu'un animal soit nécessaire pour chaque session, et c'est pour parer à cette éventualité que nous envisageons un nombre total maximal de 6 animaux pour mener à bien ce projet. .

Les animaux sont introduits au minimum 4 jours avant les premiers actes techniques. Ils sont visités quotidiennement et des aliments appétissants leurs sont donnés à la main (pommes) ce qui a pour effet de réduire le stress lié à leur manipulation

Les animaux sont hébergés en groupes sociaux de petite taille (sauf pendant la phase de réveil). Des enrichissements du milieu sont mis à leur disposition (litière végétale, jouets "robustes"). Avant les sessions, il est nécessaire de faire « jeûner » l'animal afin d'éviter d'avoir un bol alimentaire durant les endoscopies.

Les procédures d'endoscopies nécessitent anesthésie générale de l'animal. De ce fait, les porcs recevront du propofol par voie intraveineuse. Avant le début des traitements, une première injection de Buprénorphine (30 µg/kg) sera réalisée. Si des signes de douleur sont perçus pendant le traitement (augmentation du rythme cardiaque), une ou plusieurs injections de Buprénorphine (10 µg/kg) seront réalisées par voie intraveineuse.

Conclusion:

Après la réalisation de l'essai d'imagerie et en l'absence d'évènement indésirable, l'animal sera réveillé et réutilisé pour une autre phase d'expérimentation mais en l'absence de réutilisation possible à travers d'autres projets, l'animal sera mis à mort.

18094 La mise en œuvre de ce protocole vise la compréhension et l'identification des neurones impliqués dans un apprentissage de mémoire de travail. Les objectifs principaux de ce protocole sont doubles : premièrement, établir un modèle comportemental d'auto-entraînement à la tâche comportementale et deuxièmement enregistrer les neurones du cortex préfrontal dans cette tâche. L'utilisation d'un modèle comportemental chez le rongeur permettant l'étude des structures cérébrales et neurones impliqués dans la mémoire de travail nous permettra à terme de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans cette forme d'apprentissage.

A leur arrivée, les animaux sont mis en cage par l'animalier qui effectue un premier contrôle de leur état de santé. Les animaux seront hébergés dans des zones de stabulation où le cycle lumière/obscurité est normal. La température ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) et l'humidité ($60 \pm 5\%$) des pièces sont contrôlées. Les animaux sont placés dans de cages collectives couvertes de grilles et équipées de mangeoires aluminium et d'un nid végétal. Ces cages offrent aux animaux un espace important pour se redresser. Suite à cette période de stabulation, les animaux seront opérés afin de leur implanter des appareils d'enregistrements neuronaux. Une grande importance est portée au bien-

être de l'animal lors de cette procédure, et particulièrement lors de la période post-opératoire. Enfin, le comportement de l'animal lors de phases d'auto-entraînement et de phases tests est analysé afin d'atteindre nos objectifs. Les animaux sont surveillés quotidiennement tout au long de leur passage dans notre établissement avec une attention toute particulière pour leur bien-être.

Justification de la règle des 3R.

Remplacer : ce protocole nécessite l'utilisation d'animaux. En effet, l'identification des structures cérébrales et des circuits neuronaux impliqués au cours de la mémoire de travail nécessite l'utilisation d'un cerveau intact chez l'animal vigile. Des méthodes *in vivo* telles que la culture cellulaire ou bien les coupes de cerveau ne contiennent pas les connections neuronales qui sont le sujet de nos travaux. Il n'existe donc pas de méthodes alternatives.

Réduire : le nombre d'animaux a été calculé par l'estimation de la variance observée avec ce type de données permettant d'atteindre une signification statistique. Ce nombre est de 15 souris par groupe. Un seul groupe sera utilisé, soit un total de 15 animaux pour la réalisation de ce protocole.

Raffiner : Afin de réduire au minimum la souffrance des animaux, nous appliquons systématiquement un traitement antalgique avant et trois jours suivant les actes chirurgicaux qui sont réalisées sous anesthésie gazeuse. L'évaluation du poids de l'animal est effectuée de façon journalière à partir du moment où il rentre dans la phase expérimentale. Ces mesures ont lieu lors de la manipulation journalière des animaux en même temps que la vérification de l'état général de l'animal. Ces mesures sont consignées dans un cahier d'expérience prévu à cet effet. Pour identifier les dommages et contraintes subis par l'animal, nous avons définis des points limites au nombre de 14. Ces quatorze aspects évalués au cours de nos expériences nous aident à déterminer un point final à l'expérimentation. Chaque critère est évalué de 0 à 3 et si un critère obtient le score maximal, ceci induit un arrêt immédiat de l'expérience.

18095 Suite au développement d'un nouveau dispositif médical implantable permettant la délivrance de molécules de façon contrôlée et avec une meilleure précision en locorégionale, nous souhaitons procéder à une évaluation de son efficacité comparée à une méthode de traitement classique du glioblastome, l'administration continue à flux fixe, en Anglais Convection Enhanced Delivery (CED) qui toutefois est limitée dans sa durée à quelques heures alors qu'avec notre dispositif, l'infusion pourra être réalisée pendant plusieurs jours. La croissance tumorale et la survie entre les deux méthodes de traitement sera évaluée afin d'en déterminer l'efficacité.

L'étude se déroulera sur un maximum de 3 mois au cours desquels 4 groupes expérimentaux de 12 rats seront constitués. L'ensemble des rats se verra implanté des cellules tumorales (9L).

2 groupes seront implantés avec le dispositif implantable et une pompe osmotique de type Alzet (qui permet de délivrer la thérapie sur 7 jours), un groupe témoin avec injection de sérum physiologique et un groupe sera traité à l'aide de Témzolomide. 2 groupes supplémentaires recevront une injection par CED, un groupe témoin recevra une injection de sérum physiologique et un groupe sera traité à l'aide de Témzolomide.

La croissance tumorale sera évaluée par IRM tous les 5j.

Un maximum de 48 rats pourra être inclus dans ce projet pour répondre aux problématiques explorées et permettre une analyse statistique appropriée.

Des points limites liés au comportement de l'animal (état général et masse de l'animal (perte de 10%)) ont été fixés et les animaux les atteignant seront euthanasiés. Ce projet s'inscrit dans une démarche éthique appliquée à l'expérimentation animale en respectant la "règle des 3R". Le remplacement a été évalué mais la complexité de l'environnement tumoral n'est actuellement pas reproduite *in vitro* et le remplacement non possible. Dans ces conditions, une attention particulière étant portée au bien-être des animaux inclus dans cette étude. Les animaux seront hébergés en cages normalisées et en groupes, en pièce ventilée à hygrométrie et température contrôlées et auront à leur disposition de l'eau et de la nourriture à volonté. Un cycle automatique jour/nuit – 12h/12h sera respecté. Il sera mis à leur disposition un abri et de la cellulose pour la constitution d'un nid. Avant toute expérimentation, une période minimale de 7 jours d'acclimatation des animaux à leur nouvel environnement sera observée. Lors des expérimentations, une attention particulière

étant portée au maintien en normothermie des animaux à chaque phase, y compris lors de la chirurgie et de l'examen en Imagerie par Résonance Magnétique par l'utilisation de tapis chauffant. Toutes les procédures sont réalisées sous anesthésie générale. Les animaux reçoivent un antidouleur avant et après la procédure de chirurgie. Les animaux seront suivis quotidiennement et leur état évalué à partir d'une grille d'évaluation.

18096 A l'heure où les recommandations de bonnes pratiques nous interdisent, à juste titre, l'enseignement initial de la chirurgie sur les patients, nous organisons des travaux pratiques en chirurgie et pratiques interventionnelles pour les jeunes chirurgiens en proposant un apprentissage intégré.

L'objectif est de faciliter l'acquisition des techniques et des gestes opératoires à la fois par voie abdominale ouverte (laparotomie ou lombotomie), répondant parfaitement aux besoins de simulations nécessaires à une formation pratique initiale et continue. Ces formations s'adressent à un large public de professionnels de santé (internes, étudiants IBODE, chirurgiens seniors...) et se développent de façon progressive dans différents laboratoires.

La formation s'effectue de façon progressive et intégrée au sein de

1) le laboratoire de simulation, qui offre un entraînement sur simulateurs de chirurgie (pelvi-trainer), et permet un apprentissage préalable de la gestuelle sur simulateur.

2) le laboratoire de chirurgie ouverte et de laparoscopie sur grands animaux (porcs), permet la formation initiale des internes, et continue des chirurgiens praticiens sur un modèle permettant un enseignement des techniques chirurgicales et interventionnelles dans des conditions physiologiques quasi équivalentes à la clinique humaine.

3) Enfin, le laboratoire d'anatomie complète l'offre de formation en permettant un apprentissage dans de véritables conditions anatomiques humaines.

Le projet développé ici est un projet de formation à la chirurgie vasculaire de revascularisation et remplacement des vaisseaux (pontages) et à la gestion des plaies opératoires vasculaires sur modèle porcin. Ce modèle est bien évalué et présente des similitudes dans son anatomie et sa physiologie avec l'Homme. Déjà validé pour des modèles d'entraînement chirurgical pour plusieurs spécialités, il permet aux jeunes chirurgiens d'acquérir en conditions réelles les qualités gestuelles nécessaires pour appréhender les interventions chirurgicales chez l'homme, en particulier depuis l'avènement de la chirurgie en endovasculaire qui a largement réduit le nombre d'intervention en chirurgie ouverte chez l'homme.

Dans ce projet la règle des 3R sera assurée comme suit:

Remplacer/réduire : De façon à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, différentes phases de l'apprentissage sont développées en amont aux laboratoires de simulation et d'anatomie.

Réduire : Le nombre maximum estimé d'animaux (porcs) nécessaire à cet enseignement est de 100 animaux pendant 5 ans. De plus les différentes procédures d'apprentissage sont réalisées le même jour sur un même animal par plusieurs chirurgiens en formation.

Raffinement : De façon à diminuer le stress, la souffrance et la douleur, toutes les procédures sont réalisées chez ces animaux sous anesthésie générale et un traitement analgésique leur est donné de façon adaptée en fonction de la procédure. Selon leur taille, les animaux peuvent être hébergés par 1, 2 ou 3 par boxes, au sein d'une même pièce. Les boxes sont ouverts, permettant une relation sociale entre les animaux. Des jouets sont apportés plusieurs fois par semaine aux animaux, sur des temps courts pour éviter qu'ils s'en détournent trop vite. Un enrichissement alimentaire est également apporté en alternance des jouets.

18097 Ce projet a pour objectif d'évaluer l'innocuité et la sécurité de vaccins viraux vivants atténués destinés à l'Homme.

Pour se faire différents modèles animaux pourront être utilisés et permettront de déterminer la neurovirulence ou le viscérotropisme de nos candidats-vaccins vivants atténués en comparaison avec des vaccins de références.

Ces tests répondent aux exigences de la réglementation pour assurer et documenter le maintien de l'atténuation au cours de la multiplication virale lors de la production des vaccins.

Ils permettent aussi d'étudier leurs mécanismes d'action afin de pouvoir remplacer à terme ces tests in-vivo par des tests in-vitro.

Des critères de pathogénicité du vaccin viral vivant atténué tels que les symptômes cliniques généraux (perte de poids, évaluation de l'état clinique de l'animal, . . .) ou symptômes spécifiques du virus (signes neurologiques, . . .) ainsi que le suivi de la charge virale dans le sang ou dans les organes pourront être étudiés et comparés avec ceux observés suite à l'injection d'un vaccin de référence.

Les bénéfices attendus sont :

- de contribuer à la libération des lots de candidats vaccins en vue d'essais cliniques en se conformant aux spécifications et textes de référence en vigueur.
- d'étudier les mécanismes d'action et de documenter, dans un objectif 3R, la filiation de nouveaux vaccins dans des modèles petits animaux, afin de pouvoir proposer un test pertinent et discriminant pour supporter des éventuelles modifications de produit (par exemple l'apparition de mutations dans la séquence du vaccin au cours des passages de production) sans avoir à renouveler les tests réglementaires chez le singe.

Le degré de sévérité des tests est considéré comme léger dans la première procédure et sévère pour la seconde. En fin de tests, les animaux sont euthanasiés selon les méthodes recommandées par la réglementation en vigueur et la Structure Chargée du Bien-Etre Animal. L'ensemble de ce projet peut nécessiter l'utilisation de 1500 souris sur une période de 5 ans (basée sur une évaluation des besoins actuels).

Mise en œuvre des 3R : Remplacement :

Un développement de modèles in vitro est en cours avec l'étude de la réplication des souches virales atténuées en comparaison de souches témoins sur différents modèles

cellulaires : des cellules neuronales ou des systèmes multicellulaires reproduisant in vitro un mini-cerveau.

Réduction :

Le nombre d'animaux utilisés au total est calculé au plus juste de façon à répondre aux exigences réglementaires et aux besoins des procédures expérimentales sur une période de 5 ans. Les procédures expérimentales sont définies en concertation avec les biostatisticiens et sont régulièrement revues pour diminuer le nombre d'animaux par test lorsque les analyses le permettent.

Raffinement :

Dans le cas où les animaux présenteraient une dégradation de l'état général, des lésions ou des symptômes nécessitant l'euthanasie, celle-ci sera effectuée selon les méthodes réglementaires recommandées.

En fonction de la procédure, une grille d'évaluation des signes cliniques post-administration est mise en place entre le responsable d'étude, les biostatisticiens et les vétérinaires cliniciens. Cette grille permet d'évaluer le niveau de souffrance des animaux selon des critères cliniques spécifiques du virus, par un personnel spécifiquement formé. Dès que le score atteint un seuil jugé critique, les animaux seront euthanasiés avant la fin de l'étude pour abrégé leur souffrance.

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

18098 La méningite cérébro-spinale et le purpura fulminans sont des infections bactériennes sévères et d'évolution rapide, dont la mortalité approche 100 % en l'absence de prise en charge médicale. En France, le taux de mortalité reste élevé à 8% des cas malgré l'existence de traitements. De plus, même en cas d'évolution non fatale, les séquelles sont fréquentes et graves (amputations et atteinte neurologique). La bactérie responsable de ces infections est le méningocoque (*Neisseria*

meningitidis). Elle a la particularité de pouvoir se multiplier dans le sang et de coloniser les vaisseaux sanguins. Nous savons aujourd'hui que cette dernière étape est essentielle dans le cycle infectieux de cette bactérie. De plus la bactérie responsable de ces infections n'interagit qu'avec les vaisseaux sanguins humains. L'étude de cette bactérie in vivo requiert donc l'utilisation d'un modèle de souris humanisées.

Le but de ce projet est de développer un nouveau modèle de souris humanisées. Par la suite ce modèle sera utilisé pour étudier les mécanismes de l'interaction entre la bactérie et les vaisseaux sanguins humains afin de mieux comprendre la physiopathologie de la méningite cérébro-spinale et du purpura fulminans. Nous chercherons ainsi à valider in vivo des hypothèses physiopathologiques établies dans des études in vitro.

Les souris seront greffées avec des implants synthétiques contenant des microvaisseaux formés par des cellules humaines modifiées ou non et incluses dans une matrice de gel. Après la connexion des vaisseaux des implants avec les vaisseaux murins, les souris seront infectées avec la bactérie, et nous analyserons l'évolution de la quantité de bactérie dans le sang en réalisant des prélèvements sanguins. Certaines souris seront traitées avec des agents pharmacologiques d'intérêt et visant à empêcher la bactérie de coloniser les vaisseaux sanguins. Entre 1 et 72 heures après l'infection, les souris seront euthanasiées pour prélever les implants et étudier les lésions tissulaires. Ce projet nécessitera l'utilisation de 640 souris sur 5 ans.

Nous mettons tous en place pour respecter le principe des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer).

Réduire : Le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum permettant de répondre aux questions scientifiques de ce projet. Pour cela nous avons estimé la taille des échantillons permettant une analyse statistique efficace des résultats grâce aux données collectées au cours d'expériences précédentes.

Raffiner : Afin d'assurer autant que possible le bien-être des animaux, de l'enrichissement sera ajouté dans chaque cage d'hébergement (coton et maison en carton) ce qui permet de limiter le stress des animaux. S'agissant de souris immunodéficientes, celles-ci sont hébergées en milieu protégé, c'est à dire dans des conditions permettant de diminuer tout risque d'infection. De plus, les animaux bénéficieront d'une surveillance quotidienne durant les procédures expérimentales et les actes invasifs seront réalisés sous anesthésie générale et traitement analgésiques par du personnel qualifié. Afin de réduire leur souffrance et leur stress, des mesures antalgiques médicamenteuses sont prévues pour toutes les procédures douloureuses. Enfin, des points limites ont été établis. Ils entraîneront la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire, pour limiter la souffrance.

Remplacer : Afin de remplacer au maximum le modèle in vivo, nous avons sélectionné les agents pharmacologiques d'intérêt par des études en modèle cellulaire in vitro, ce qui a permis de sélectionner 2 agents d'intérêt sur 25 agents testés et ainsi réduire considérablement le nombre d'animaux nécessaire.

Les résultats attendus de ce travail sont importants, car ils permettront de mieux comprendre les mécanismes de la méningite cérébro-spinale et du purpura fulminans. Ils pourront permettre de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques, permettant ainsi de diminuer la mortalité et les séquelles de ces infections sévères.

18099 La cirrhose hépatique est une pathologie caractérisée par une détérioration du tissu hépatique (fibrose) et une perturbation sévère des flux sanguins évoluant vers une insuffisance hépatique. La cirrhose a classiquement été catégorisée en deux états : compensée et décompensée. Une fois que la cirrhose passe du stade compensé au stade décompensé, la survie à court terme est estimée de 3 à 5 ans, et la transplantation hépatique doit être envisagée. Si la cirrhose provient d'une cause traitable (par exemple, hépatite virale chronique, consommation continue d'alcool, obésité, etc.), les patients peuvent alors repasser d'une phase décompensée à une phase compensée.

La décompensation aiguë de la cirrhose conduit à l'hospitalisation des malades atteints de cirrhose. La décompensation aiguë est définie par l'apparition d'ascite dans l'abdomen, un épisode d'encéphalopathie (trouble du mental), une hémorragie digestive, et un épisode infectieux ou n'importe quelle combinaison de ces critères.

Il y a deux catégories de décompensation aiguë: la première dite traditionnelle, dont le pronostic à court terme est bon et la seconde, appelée ACLF (acute-on-chronic liver failure), plus complexe, associée à des défaillances multiples d'organe dont le pronostic est souvent très mauvais.

La défaillance hépatique aiguë ou ACLF est donc un syndrome fulminant qui survient de manière aiguë, généralement en raison d'un événement précipitant, et qui évolue rapidement vers une défaillance de multiples organes.

Elle survient chez environ 30% des patients hospitalisés atteints de cirrhose et est associée à un taux de mortalité à 28 jours qui varie entre 20% et 70% selon le grade de l'ACLF.

Au cours de cet épisode aigu, les événements inflammatoires liés à l'infection sont prédominants, des molécules exogènes effectrices de l'inflammation issues des pathogènes sont capables d'activer le système immunitaire, des molécules endogènes produites par des cellules en état de stress pour également activer la signalisation immunitaire ce qui entrainera le processus inflammatoire.

Il apparaît donc que cette phase d'emballement de la réaction immunitaire et inflammatoire soit déterminante lorsque l'ACLF survient chez des patients cirrhotiques.

Il est aujourd'hui indispensable d'engager des études qui visent à développer des moyens de prise en charge de ces événements qui soient différents des antibiothérapies qui sont souvent en échec dans ces situations-là.

Notre projet vise donc à établir un modèle qui puisse reproduire la phase aiguë qui survient lors d'un épisode d'ACLF chez le patient en situation de cirrhose décompensée, avec pour but ultime d'évaluer la capacité de molécules innovantes à atténuer la gravité de cet événement et à protéger l'organisme des défaillances multiples.

Les modèles d'induction d'ACLF envisagés seront développés chez le rongeur (rats et souris), ces espèces ayant déjà été utilisées dans d'autres programmes pour établir les modèles de cirrhose ou d'insuffisance hépatique.

Différents moyens déclenchants de l'ACLF seront envisagés au cours des procédures expérimentales d'évaluation d'efficacité de produits qui constitueront ce projet. Ces procédures seront basées sur le principe des études de survie et seront d'une gravité sévère.

Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, les procédures expérimentales de cette première étape seront réalisées sur des effectifs réduits afin de tester les différentes conditions pour atteindre des effets attendus de l'induction de l'ACLF.

Enfin, l'effet des composés sera réalisé sur un plus grand nombre d'animaux avec seulement les conditions sélectionnées au cours des premières étapes.

Dans ce projet et afin de répondre à la règle des 3 R, nous avons estimé le nombre d'animaux nécessaires pour chaque procédure pour avoir une réponse statistiquement analysable afin de réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaires dans les expériences. Le nombre initial d'animaux inclus dans chaque groupe expérimental permettra de tenir compte de l'hétérogénéité de la réponse au stimulus, et permettra de disposer d'un nombre de données autorisant une analyse robuste des effets observés.

Par définition ces procédures sévères ne permettent pas d'avoir recours à des moyens pharmacologiques de lutte contre la douleur, les points limites seront très souvent atteints et il sera de la responsabilité de l'expérimentateur en charge du projet de s'efforcer, le cas échéant de réduire ce nombre d'animaux dans le cas où il juge qu'il peut l'être, même à minima.

Les procédures utilisées se feront dans le cadre adapté d'un hébergement agréé avec des personnes habilitées, respectant au maximum le bien-être des animaux avec un enrichissement du milieu (morceaux de bois à ronger, filaments de papier kraft pour faire un nid), en limitant la souffrance par le respect des méthodes anesthésiques et analgésiques afin de raffiner au maximum les procédures.

Afin de prévenir des souffrances non nécessaires et de ne pas altérer les résultats de l'étude, des points limites seront définis, au-delà desquels les animaux seront retirés de l'étude et mis à mort de façon éthique. Compte tenu que le choc septique implique un dysfonctionnement de plusieurs

organes, il nous est impossible de remplacer cette expérimentation par des expériences in vitro. Cependant, une première phase de sélection des meilleurs composés est effectuée sur des modèles acellulaires ou cellulaires, contribuant ainsi à l'utilisation de méthodes alternatives visant à remplacer partiellement l'utilisation des animaux.

Ainsi le nombre total d'animaux prévu est de 4890 pour une durée de 5 ans. (3000 souris et 1890 rats)

18100 Des mutations de TP53 sont retrouvées dans de nombreux cancers. Dans les cancers du sang, p53 est généralement peu impliqué excepté dans certaines catégories de cancers comme les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) secondaires aux néoplasmes myéloprolifératifs (NMP).

Les néoplasmes myéloprolifératifs (NMP) sont des maladies chroniques qui sont caractérisées par une augmentation des cellules matures du sang (globules rouges, blancs, plaquettes), ils peuvent se transformer en leucémies aiguës myéloïdes (LAM), qui sont des pathologies aiguës dues à une augmentation de cellules immatures bloquées en différenciation. Ces LAM post-NMP sont de très mauvais pronostic avec une médiane de survie de 3 à 5 mois. Dans plus de la moitié des cas, la voie p53 est impliquée. TP53 est un facteur de transcription codant pour une protéine qui est activée en réponse à divers stress cellulaires, comme des lésions à l'ADN, et qui va permettre à la cellule d'arrêter de proliférer afin de pouvoir réparer les lésions ou d'entrer en mort cellulaire programmée. Les mutations de TP53 retrouvées dans les cancers inactivent ces fonctions de p53, ce qui entraîne une prolifération et une survie cellulaire non contrôlées. Il a été montré que ces mutations pouvaient également conférer de nouvelles fonctions à p53 mutée.

Dans ce projet, nous souhaitons identifier les mécanismes impliqués dans la transformation en leucémie des NMP.

Les leucémies aiguës myéloïdes post néoplasmes myéloprolifératifs sont des maladies complexes, et l'étude de ces cancers repose sur la mise en oeuvre en conditions physiologiques d'interactions complexes entre différentes cellules (dont des cellules immunitaires) et médiateurs (cytokines, etc). Etant donné l'implication de la voie p53 dans les LAM post NMP (retrouvée dans plus de la moitié des cas), un modèle in vivo est donc incontournable. Parallèlement, nous étudierons également des prélèvements primaires de patients atteints de LAM post NMP. De plus, comme le nombre de prélèvements de patients est limité du fait de la rareté de cette maladie, il est indispensable de développer des modèles murins. Ils nous permettront de valider et consolider les résultats obtenus chez l'homme. Par ailleurs, le processus de leucémogénèse requiert l'environnement médullaire impossible à reproduire in vitro. Enfin, la prolifération in vitro de cellules tumorales est limitée et ne reflète pas ce qui se passe in vivo chez l'homme. Notre modèle pourra éventuellement par la suite servir également de modèle préclinique si nous identifions de nouvelles cibles thérapeutiques.

Tout d'abord, nous devons étudier la coopération de p53 avec des gènes impliqués dans les NMP. Nous nous intéresserons aux 2 gènes les plus fréquemment mutés : JAK2 et calréticuline (CALR), ces deux mutations résultent en une hyperactivation de la voie de signalisation JAK/STAT. Leur introduction chez la souris entraîne le développement d'un NMP. Les mutations de TP53 seront étudiées grâce à 3 lignées C57/BL6 différentes de souris : 1/Trp53 KO afin d'étudier l'effet de la perte de fonction de p53, 2/Trp53 R172H et 3/Trp53 R270H, qui modélisent des mutations retrouvées dans les LAM post-NMP, afin d'étudier l'effet gain de fonction de ces mutants. Ces différents modèles sont inductibles et nous prévoyons d'induire KO ou le KI du gène d'intérêt à l'âge adulte dans les cellules hématopoïétiques. Nous étudierons l'effet de l'association de ces mutations chez la souris (CALR ou JAK2 + TP53) et verrons si les souris développent une maladie plus agressive, notamment une LAM. Si c'est le cas, elles pourront servir de modèles à l'étude des mécanismes pathologiques à l'origine du développement de la leucémie. Additionnement, nous validerons les cibles retrouvées dérégulées chez des patients atteints de LAM post NMP en les surexprimant ou en les inhibant dans un modèle murin de NMP JAK2V617F.

Afin de déterminer quelles sont les cellules souches responsables du développement de la maladie, nous réaliserons également des greffes de cellules humaines de patients atteints de LAM post NMP

dans des souris immunodéficientes NSG et étudierons quelles populations de cellules sont amplifiées chez la souris, et quelles mutations sont retrouvées.

Enfin, nous testerons une drogue ciblant p53 muté dans ce dernier modèle.

Nous estimons à 2480 le nombre de souris nécessaires pour mener à bien nos projets (C57/BL6 et NSG). Le nombre d'animaux choisi pour chaque lot représente le minimum requis pour constituer un échantillonnage représentatif. Cette étude sera couplée à une étude utilisant des prélèvements de patients. Cependant, une étude in vitro n'est pas suffisante et a besoin d'être couplé à des études in vivo, afin de décrire précisément les fonctions des gènes TP53, CALR et JAK2 lors du développement de la LAM. L'accès aux prélèvements humains étant limité, et cette pathologie étant rare, l'étude de modèles murins est indispensable. Par ailleurs, la prolifération in vitro de cellules tumorales est très limitée et ne reflète pas ce qui se passe in vivo chez l'homme. De plus, l'utilisation de souris nous permettra d'obtenir dans un temps court un nombre satisfaisant d'animaux prêt à être expérimenté. Les greffes de cellules de patients nous permettront de déterminer quelles cellules sont responsables de la maladie (ce qui ne peut être confirmé que par cette méthode in vivo) et d'amplifier également le matériel humain, qui est limité. Enfin, l'étude de la drogue ciblant p53 nous permettra d'évaluer l'efficacité de ce traitement in vivo.

Les expérimentations seront menées sur des durées d'un an maximum, chez des souris adultes. Les points limite seront strictement appliqués. Toutes les interventions invasives (injections, prélèvements de sang) seront faites sous anesthésie à l'isoflurane. Les animaux bénéficieront d'un environnement enrichi en tout temps. Du DietGel Energy sera ajouté dans les cages en cas de diminution de la prise alimentaire. Les animaux seront suivis régulièrement et euthanasiés en cas de douleur.

18101 Les études de toxicologie de la reproduction permettent de révéler la toxicité d'un produit sur la reproduction des mammifères.

Les études de toxicité sur le développement prénatal couvrent plus spécifiquement la période du développement in utero, par administration répétée de la substance à tester pendant la gestation chez le rat, la souris ou le lapin. A la fin de la période de gestation, les mères sont euthanasiées et les fœtus sont extraits par césarienne pour éviter une sélection naturelle de la mère (élimination des nouveau-nés malformés ou morts nés par cannibalisme à la naissance). La morphologie fœtale est étudiée par une observation externe, viscérale et squelettique des fœtus tandis que les fonctions reproductives des mères sont examinées (nombre de corps jaunes, nombre et distribution des fœtus morts et vivants, nombre et qualité des implants et des sites d'implantations, examen du placenta). Si des malformations sont détectées à des doses non toxiques pour la mère, le produit sera classé tératogène.

Le grand nombre de fœtus par mère et des temps de gestation relativement courts (18 jours chez la souris, 21 jours chez le rat et 29 jours chez le lapin) permettent d'obtenir des résultats statistiquement fiables avec 20 à 24 femelles gestantes par dose sélectionnée et donc de limiter aussi le nombre d'animaux à utiliser. Ces études se font généralement sur deux espèces différentes (rongeurs et non rongeurs). Elles sont choisies sur la base de leur sensibilité au produit. Les espèces souris, rat et lapin (considéré comme non rongeur) étant particulièrement recommandées par les textes réglementaires, elles sont donc les plus communément utilisées. Le total du projet s'élève à environ 9000 animaux sur 5 ans.

Il n'existe pas dans ce projet d'examens susceptibles d'entraîner de la douleur. Il est cependant prévu des soins vétérinaires pour certaines lésions spontanées (plaies dues à des blessures) et des anesthésies légères par inhalation d'un agent anesthésique volatil en cas de prélèvement sanguin chez les rongeurs. Les animaux seront observés quotidiennement. Tout signe de délivrance prématurée ou tout point limite défini de façon à éviter un inconfort/souffrance prolongé pourra entraîner l'euthanasie de la mère et des fœtus.

Les femelles étant gravides, elles sont hébergées individuellement pour ne pas mettre en péril leur gestation. Cependant, l'enrichissement est maintenu conformément à la Directive 2010/63.

Il existe des méthodes alternatives in vitro de screening qui servent au dépistage des produits fortement tératogènes et permettent de réduire le nombre de produits qui seront finalement testés sur animaux. Mais il n'existe pas de méthode in vitro permettant de remplacer complètement ces études chez les animaux à cause de la complexité des organismes vivants et des échanges avec les organismes en développement.

18102 Une nouvelle forme de maladie à prion d'origine inconnue est récemment apparue en Europe du Nord, notamment chez des élans. La caractérisation d'une nouvelle maladie à prion nécessite sa transmission expérimentale et son adaptation à des modèles animaux, permettant sa comparaison moléculaire et lésionnelle détaillée avec ceux impliqués dans les autres maladies à prions rencontrées chez le mouton ou la vache (« maladie de la vache folle »). Il n'existe pas aujourd'hui de méthode alternative à l'expérimentation animale. Nous avons obtenu dans deux groupes expérimentaux la transmission de la maladie à prion de l'élan dans un modèle de souris modifiées génétiquement qui expriment la protéine prion du mouton, sans que des signes cliniques caractéristiques aient été observés durant la vie des souris. Une adaptation dans ce modèle expérimental, par plusieurs passages de ce prion d'élan, est nécessaire pour évaluer la durée de survie avec ce prion et disposer d'un nombre d'échantillons suffisant à la caractérisation moléculaire et lésionnelle. Nous inoculerons sous anesthésie gazeuse, par voie intra-cérébrale, à 15 souris par groupe, un homogénat de cerveau ou de rate d'une souris des groupes expérimentaux initiaux. Le projet nécessite ainsi 60 souris au total, nombre réduit au maximum pour disposer d'un effectif suffisant d'animaux atteints de la maladie à prion de l'élan sur la base de notre expérience de ce type de souche et conformément aux données de la littérature utilisant les méthodologies de caractérisation envisagées. Les animaux seront suivis quotidiennement durant toute leur vie. Les animaux sont maintenus dans un environnement enrichi pour leur bien-être. Les animaux seront mis à mort par injection d'euthasol s'ils présentent des signes cliniques de maladie ou lorsque la dégradation de l'état général liée au vieillissement de l'animal le justifie. Les prélèvements, de cerveaux et de rate, sont réalisés uniquement après la mort des animaux, permettant la réalisation des études moléculaires de la protéine prion pathologique des souris et de la distribution de leurs lésions cérébrales, caractéristiques des souches de maladies à prion. Ces éléments de caractérisation pourront ainsi être comparés à l'ensemble des éléments déjà disponibles pour les nombreuses souches d'origine bovine, ovine et caprine disponibles au laboratoire dans ce modèle expérimental.

18103 Les antibiotiques ont révolutionné la prise en charge des infections bactériennes. Toutefois, l'augmentation de leur consommation a été de concert avec l'expansion des résistances bactériennes et présage à des impasses thérapeutiques imminentes. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) s'alertait en Octobre 2016 de la grave menace de « l'ère post-antibiotique », et la nécessité absolue de trouver des alternatives thérapeutiques.

On note par exemple que la proportion d'entérobactéries résistantes aux carbapénèmes (antibiotiques de derniers recours) est devenue préoccupante en Europe. Certes le taux de résistance des entéobactéries est assez faible en France (jusqu'à 0,7% en 2015) mais est plus forte en Europe de l'Est (10%) et notamment en Grèce (jusqu'à 60% de résistance). Cette augmentation de résistance est majoritairement attribuable à la production de carbapénémase de type OXA-48.

Le microbiote intestinal est un important réservoir de gènes de résistance aux antibiotiques. Cependant, son implication dans l'acquisition et la persistance de résistances n'est pas clairement élucidé. La colonisation intestinale par un organisme multirésistant aux médicaments (ORDM) peut évoluer d'un portage asymptomatique à diverses infections, principalement urinaires, digestives et sanguines. De plus, le transport digestif du MDRO peut entraîner une contamination de l'environnement et sa transmission à des sujets sains ou malades. Par conséquent, il est d'une importance majeure de diminuer et même de supprimer le transport digestif du MDRO pour limiter la propagation de la résistance aux antimicrobiens. Dans un modèle murin de portage digestif d'Enterococcus résistant à la Vancomycine (ERV), une équipe a rapporté qu'il était possible d'éradiquer le portage d'ERV par une transplantation fécale. Des stratégies de modulations du

microbiote intestinal sont en cours d'évaluation par transplantation fécale mais son efficacité reste toujours très controversée et sa spécificité d'action ainsi que ses effets indésirables interrogés.

L'administration d'un probiotique (*Bacillus subtilis*) pourrait permettre une éradication d'un pathogène multirésistant sans utilisation d'antibiotique. En effet le genre *Bacillus* comprend différentes espèces de bactéries qui sont communément ingérées avec les légumes. Le bacille produit des composés qui confèrent une activité antimicrobienne contre divers pathogènes humains. Il a été démontré que le traitement oral avec *Bacillus subtilis* prévient diverses infections digestives chez le poulet, le lapin, le poisson et la souris, y compris les infections dues à *Escherichia coli*. Il a également permis une éradication d'une colonisation digestive asymptomatique de *Staphylococcus aureus* chez la souris. Cependant, on ne connaît toujours pas sa capacité à diminuer la colonisation intestinale asymptomatique d'*Escherichia coli* multirésistant. Notre objectif de travail est de tester l'efficacité de l'éradication d'entérobactéries productrices de carbapénèmases de type OXA-48 au sein du tractus digestif dans un modèle murin par l'administration de souches de *Bacillus subtilis* par voie orale. Pour cela nous utiliserons 348 souris SWISS mâles de 6 semaines de vie. Cette étude sera menée en appliquant la règle des 3R : Réduire au maximum le nombre de souris : le nombre de souris a été réduit au minimum afin de garder une analyse statistique fiable, effectivement pour les comparaisons intergroupes lors des études de portage de bactéries multirésistantes un minimum de douze animaux par groupe est nécessaire sur le plan statistique afin de valider les résultats. Nous avons donc choisi d'utiliser ce minimum d'animaux par groupe, à savoir 12 pour la culture des selles comme pour leur analyse métagénomique. Un modèle linéaire mixte à effets aléatoires sera utilisé pour modéliser le titre bactérien dans les selles, avec pour effets fixes le traitement et le temps, et pour effet aléatoire la souris. Raffiner en mettant en place des points limites : en cas d'infection et de souffrance les souris seront euthanasiées selon une procédure appropriée (dislocation cervicale sous anesthésie). Afin de réduire au maximum l'inconfort voire la douleur que la procédure de gavage gastrique peut engendrer, celle-ci sera faite sous anesthésie générale de courte durée par isoflurane (gaz anesthésiant). Au décours de cette manipulation les souris seront surveillées pendant une heure afin de s'assurer de l'absence de complications. Les autres manipulations ne sont pas censées entraîner de souffrance à l'animal (émission naturelle de selles, administration d'antibiotique dans l'eau de boisson). Remplacer au maximum l'utilisation des animaux : le modèle du microbiote digestif est si riche et complexe que les expérimentations in-vitro ne sont pas envisageables pour répondre aux questions scientifiques posées. Enfin le bien-être des animaux est surveillé tout au long de l'étude.

18104 Les maladies métaboliques telles que l'obésité et le diabète de type II sont en constante augmentation dans les pays industrialisés. Ces pathologies peuvent être induites par des facteurs génétiques ou environnementaux (sédentarité, alimentation riche en glucides/lipides). De plus, l'exposition à des xénobiotiques de type « perturbateurs endocriniens » peut également entraîner des désordres métaboliques (ex: Bisphénol A, composés perfluorés, Phtalates).

Les nombreux effets induits par les perturbateurs endocriniens peuvent être médiés par les récepteurs nucléaires, des facteurs de transcription participant à de nombreuses fonctions physiologiques, dont le métabolisme énergétique. Le métabolisme énergétique représente l'ensemble des réactions qui s'accompagnent de la production d'énergie utilisable par les cellules. L'homéostasie énergétique représente l'équilibre de ces réactions et des constantes physiologiques impliquées.

Les récepteurs nucléaires CAR (Constitutive Androstane Receptor) et PXR (Pregnane X Receptor) sont principalement impliqués dans la détoxification endogène (bilirubine) et exogène (xénobiotiques) mais présentent également un rôle dans le métabolisme énergétique. Ce projet vise à étudier le rôle des récepteurs CAR et PXR dans la régulation de l'homéostasie énergétique ainsi que leur rôle dans les perturbations métaboliques induites par différents régimes ou xénobiotiques (perfluorés, pesticides).

Pour ce faire, nous utiliserons des souris génétiquement invalidées pour ces récepteurs de manière totale (KO total) ou spécifiquement au niveau hépatique (KO hépatique).

Nous envisageons d'utiliser 2976 souris au total. Ce projet a été conçu et sera réalisé autour du principe des 3R. Nous utilisons des animaux vivants car le métabolisme énergétique implique le dialogue de nombreux organes (foie, pancréas, intestin, tissu adipeux, muscle et cerveau) impossible à reproduire avec des modèles alternatifs in vitro. Les souris sont hébergées en groupe et présentent dans chaque cage de la litière, du papier pour le nid et une maisonnette en aluminium pour abri. Les groupes expérimentaux seront composés de 6 souris pour les expositions aiguës et de 12 souris pour les expositions plus longues. Ces nombres correspondent à ce qui est nécessaire et suffisant pour obtenir une puissance statistique appropriée à la détection de perturbations du métabolisme énergétique induits par les contaminants plus particulièrement pour les tests de tolérance au glucose et de sensibilité à l'insuline, hormone qui régule la glycémie.

18105 Contexte :

On entend par substances interdites par les codes des courses, les substances qui en aucun cas ne peuvent être administrées à un cheval de course, il s'agit de substances administrées le plus souvent dans le but d'améliorer les performances sportives du cheval. Parmi ces substances, figurent les gaz rares notamment le krypton et le xénon.

Ces gaz ont des propriétés anesthésiantes. Leur potentiel narcotique dépend principalement de leur solubilité avec les lipides. Parmi ces gaz, le xénon a un effet narcotique très important voir le plus important. Son utilisation en clinique a déjà été décrite accompagnée de peu d'effets secondaires en dépit de son coût important.

L'inhalation de gaz rares entraîne une situation d'hypoxie caractérisée par un manque d'oxygène au niveau des tissus concernés. Le facteur induit par l'hypoxie (HIF-1 α) est une protéine qui active l'expression de l'hormone Erythropoïétine (EPO) et induit ainsi une augmentation de la production de globules rouges dans l'organisme (érythropoïèse). L'utilisation de ces gaz pour les chevaux étant interdites, doit être bien contrôlée à la fois dans le cadre du contrôle antidopage de routine et du suivi longitudinal. Le suivi longitudinal mis en place en 2009 est relatif aux 10 meilleurs trotteurs désignés en début de chaque année par la société mère. Ces chevaux sont prélevés une fois par mois de façon inopinée en plus du contrôle antidopage habituel. Ces prélèvements du suivi longitudinal sont soumis à toutes les analyses du contrôle antidopage traditionnel ainsi que tous les nouveaux tests mis en place par l'unité de recherche du LCH. La détection de l'administration de gaz rares peut se faire de deux façons par méthode directe ou par méthode dites omiques de prise d'empreintes. Ces deux méthodes sont basées sur des approches de détection par spectrométrie de masse. Dans le cas de la méthode directe, le gaz lui-même va être recherché dans le sang. Dans le cas des méthodes indirectes dites omiques, c'est l'effet du gaz qui est recherché par la prise d'empreintes adaptées. La métabolomique c'est-à-dire l'étude de l'empreinte plasmatiques ou urinaires) de molécules du métabolisme équin a conduit à la création et l'utilisation de modèles statistiques permettant de discriminer des échantillons provenant d'animaux témoins de ceux provenant d'animaux ayant reçu des substances interdites. Deux modèles existent dans notre laboratoire : un pour le screening des hormones de croissance et l'autre celui des EPO(s). Pour les gaz rares, dans le cas où une approche directe conduirait à des résultats insuffisants (temps de détection trop court), une approche protéomique pourrait être envisagée.

Ce projet d'expérimentation est indispensable afin de s'assurer que la méthode de détection directe développée par couplage chromatographique pour les gaz rares est bien adaptée à la détection de leur administration au cheval. L'analyse de prélèvements sanguins supplémentés en gaz ne suffit pas pour montrer que la méthode développée est adaptée. Cette étude in vivo va permettre de savoir pendant combien de temps on peut détecter au moins un de ces gaz dans le sang.

Protocole :

Dans le cas d'une approche directe une étude pilote sur un seul cheval par lot peut être suffisante (un cheval témoin non traité et un cheval traité).

Si une étude omique complémentaire était envisagée, plusieurs chevaux sont nécessaires pour le protocole proprement dit. Le protocole comprend trois phases : une phase de prélèvement avant administration, l'administration puis des prélèvements après administration. Le gaz est toujours

administré par un vétérinaire et le cheval est toujours surveillé pendant le traitement et tout le temps du protocole. Les prélèvements sont des prélèvements sanguins. Le sang est prélevé par ponction veineuse jugulaire. Le nombre total d'animaux utilisés sur cinq ans est estimé à 4 au maximum (avec réutilisation possible des chevaux).

Dans ce projet, la règle des 3R a été appliquée comme suit :

-Remplacer : cette étude ne peut être réalisée que chez l'animal vivant et sur l'espèce cible, le cheval. Des analyses in vitro ne sont pas possibles pour évaluer le devenir des produits administrés chez un animal vivant.

-Réduire : le nombre d'animaux impliqués est réduit au minimum. Ces essais sont généralement conduits sur un très petit nombre d'animaux (de un à quatre au grand maximum).

-Raffiner : Lors de ces essais, les actes réalisés sont très peu invasifs. Les chevaux sont quotidiennement surveillés et observés. Tout éventuel signe d'inconfort est noté et corrigé et est pris en compte afin d'optimiser les tests ultérieurs. Le bien-être de chaque cheval est une priorité quotidienne du personnel compétent et qualifié.

18106 Le système immunitaire joue un rôle central dans la mise en place d'une réponse protectrice efficace et durable contre les agressions extérieures. Pour mieux comprendre ce tissu et s'en servir pour développer des thérapies innovantes, les chercheurs ont besoin de modèles précliniques prédictifs. En greffant des cellules souches à des souris immunodéprimées, nous pouvons reconstituer un système immunitaire fonctionnel exprimant des cellules blanches humaines. Cette caractéristique permet, par exemple, de conduire des tests précliniques plus prédictifs des effets prophylactiques et thérapeutiques qu'aura une vaccination chez l'homme.

Dans ce projet, des souris recevront des agents immunogènes, éventuellement pathogènes, ainsi que des molécules thérapeutiques (prophylactique ou curative). Des tests cliniques permettront d'évaluer l'impact de ces composés sur la physiologie in vivo alors que des tests de laboratoire, dont la cytométrie en flux ou les ELISA, objectiveront l'activation des populations immunitaires d'intérêt et la production d'anticorps.

L'administration des composés immunogènes sera réalisée par voie parentérale (veineuse, intrapéritonéale, sous-cutanée ou intra-musculaire) suivant des schémas préétablis par le vétérinaire d'établissement et le comité de bien-être. A titre d'exemple, pour une souris de 20 g, la limite d'administration sera de 400 µL per os; 200 µL par voie sous-cutanée; 200 µL par voie intrapéritonéale; 50 µL par voie intramusculaire et 200 µL par voie intraveineuse.

Les prélèvements de sang seront réalisés dans le sinus rétro-orbital ou à la veine caudale. Les prélèvements au sinus rétro-orbital seront réalisés sous anesthésie générale ou, à défaut, sous anesthésie locale. La fréquence maximale de prélèvement sera dépendante du poids, selon un schéma préétabli par le vétérinaire et le comité de bien-être. A titre d'exemple, le volume prélevé sera de 160 µL par semaine, maximum, pour une souris de 20 g.

Réduction :

Un total de 1500 souris adultes seront utilisées, couvrant une période 5 ans, permettant de réaliser 50 études précliniques, soit 4 groupes (1 placebo et 3 traitements) de 5 à 10 individus. Le nombre exact d'animaux par étude sera réduit en fonction d'études statistiques adaptées aux effets attendus des agents immunogènes et des éventuels traitements.

Raffinement :

Les souris seront hébergées en cage ventilée, par groupe social stable. La nourriture et l'eau de boisson seront fournies ad libitum. La cage contiendra une couche de litière permettant aux souris de creuser, de se cacher et de réaliser un nid, élément essentiel à leur bien-être. Un morceau de bois, permettant aux souris d'exprimer leur comportement de rongeur, ainsi qu'un nid en carton seront également disposés. À leur entrée dans le projet, les souris bénéficieront d'une période d'acclimatation et seront habituées à la présence de l'expérimentateur qui les manipulera régulièrement. Les pièces d'hébergement disposeront d'un cycle lumière-obscurité (12h - 12h), d'une température (20 - 24°C) et d'une hygrométrie (45 - 65%) contrôlés en permanence.

Les souris seront monitorées tous les jours pour vérifier l'absence de souffrance. Celle-ci sera objectivée par une échelle de score adaptée. Les animaux seront pesés deux à trois fois par semaine, la fréquence pouvant être adaptée au stade de l'étude si nécessaire. Le vétérinaire aura pleine autorité pour envisager un traitement anti-douleur ou euthanasier une souris pour raison éthique, s'il le juge nécessaire.

Remplacement :

Les tests in vitro seront envisagés si ceux-ci sont appropriés. Néanmoins, lorsqu'il n'est pas possible de recréer, in vitro, une séroconversion et d'évaluer son impact protecteur sur un organisme vivant, la souris au système immunitaire humanisé constitue une approche scientifiquement valide, robuste et indispensable au développement et la mise à disposition des patients de thérapies innovantes.

18107 Le vieillissement cérébral normal engendre un déclin des fonctions cognitives (perte de mémoire, diminution des capacités d'apprentissage et de la reconnaissance spatiale) pouvant mener au développement de pathologies neurodégénératives. La nutrition à laquelle l'individu est exposé tout au long de sa vie, fait partie des pistes innovantes de recherche pour la prévention du vieillissement cognitif. Afin de proposer des solutions de nutrition préventives à l'apparition de certains troubles ou pathologies, il est nécessaire de pouvoir étudier les effets fonctionnels et potentiellement bénéfiques des nutriments sur les fonctions cérébrales. Parmi les nutriments, ceux présents dans le régime méditerranéen comme les polyphénols, les caroténoïdes et les oméga 3 semblent prometteurs sur les troubles de la mémoire d'après les résultats déjà publiés. Quelques études ont porté sur des formules multi-ingrédients mais leur efficacité a été décevante. En l'état actuel des connaissances, la combinaison optimale de nutriments ainsi que le ratio des différents nutriments les uns par rapport aux autres impliqués dans la prévention du déclin cognitif lié à l'âge restent inconnues. Les travaux de recherche scientifique visant à déterminer quelle association optimale de nutriments exerce, par des effets additifs et/ou synergiques, un rôle protecteur sur le cerveau doivent continuer. C'est pourquoi dans ce projet, nous proposons d'identifier une combinaison de nutriments capable de prévenir le déclin cognitif et d'apporter des preuves scientifiques de son efficacité. De plus, les mécanismes d'action de certains nutriments ou de leurs combinaisons sont encore peu compris. Ainsi, ce projet vise également à expliquer les mécanismes biologiques mis en jeu dans l'action des nutriments/comboinaison de nutriments dans le maintien des processus cognitifs au cours du vieillissement.

Nous utiliserons donc un modèle rongeur (souris) pour tester l'impact santé des nutriments/comboinaison de nutriments sur les fonctions cérébrales. Le modèle animal est indispensable car il s'agit d'évaluer les effets comportementaux et cognitifs d'une supplémentation nutritionnelle chronique en réalisant un panel de tests comportementaux. De plus, de nombreux biomarqueurs seront mesurés à l'issue de cette supplémentation via des approches biochimiques et moléculaires.

L'étude de l'impact des nutriments ou de leur combinaison sur les capacités cognitives se fera sur deux modèles :

- Un modèle de souris mâles et femelles adultes et âgées, supplémentées en nutriments/comboinaison de nutriments, qui permettra de déterminer l'effet des nutriments/comboinaison de nutriments sur le déclin cognitif lié à l'âge.
- un modèle de souris mâles et femelles adultes recevant une injection i. p. de LPS (lipopolysaccharide), et supplémentées en nutriments/comboinaison de nutriments, qui permettra de déterminer l'effet des nutriments/comboinaison de nutriments sur un paramètre particulier corrélé au déclin cognitif : l'inflammation.

Cette présente demande vise à regrouper les expérimentations à venir sur une période de 5 ans portant sur l'étude de 1024 souris mâles et femelles (adultes et âgées).

Nous appliquerons la règle des 3R. En effet, le nombre d'animaux sera réduit au mieux en se basant sur des expériences préalablement menées au laboratoire qui ont montré par le biais de tests statistiques des différences entre plusieurs groupes (Réduire). L'étude de comportements de la mémoire ne peut être réalisée que sur animaux vivants ce qui rend impossible le remplacement de

ceux-ci par des modèles in vitro mais nous réaliserons des tests sur culture de cellules pour tester l'effet d'un nutriment/combinaison de nutriments sur l'inflammation (Remplacer). Toutes les précautions possibles seront prises afin de raffiner nos procédures et réduire au mieux la douleur (antalgiques avant anesthésie) et l'inconfort (manipulation régulière et enrichissement de l'hébergement) des animaux (Raffiner). L'hébergement se fera en cages collectives et l'environnement sera enrichi : igloo et carré de coton. Ainsi nous respectons l'obligation éthique de la règle des 3R : Remplacer, Réduire et Raffiner.

18108 D'après l'OMS, les cancers figurent parmi les principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde. On comptait effectivement en 2012, 8. 2 millions de décès liés à la maladie. Les lymphomes et les leucémies représentent plus de 500 000 cas chaque année dans le monde. Les lymphomes et leucémie sont des cancers dits liquides ou sanguins car ils touchent le sang et la moelle osseuse pour les lymphomes et le système lymphatique (lymphocytes) pour les leucémies. A ce jour, il existe plusieurs types de traitements contre les cancers reposant le plus souvent sur la chimiothérapie, l'immunothérapie ou la radiothérapie. Cependant, ces traitements ne permettent pas une rémission des cancers dans 100% des cas. Il est donc important de développer de nouvelle génération de traitements anti-cancéreux.

Ce projet a donc pour objectif d'évaluer l'efficacité de nouveaux traitements antitumoraux innovants. Dans un premier temps, la croissance de différentes lignées de cellules tumorales liquides sera caractérisée afin de tester dans un second temps l'efficacité de différents produits antitumoraux sur ces différentes lignées cellulaires tumorales.

Afin de répondre à l'objectif de ce projet, le recours à l'expérimentation animale est nécessaire car il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode alternative permettant de modéliser de manière fiable la progression d'une tumeur dans un corps entier car ces dernières peuvent toucher de nombreuses cellules et organes différents. En outre, la culture cellulaire ne permet pas de modéliser les différentes interactions cellulaires entre les cellules tumorales, leur stroma et les cellules immunitaires de l'hôte.

De ce fait, l'efficacité de ces nouveaux traitements antitumoraux sera testée sur un modèle murin immunodéprimé à la fois pour permettre une pousse tumorale et également pour empêcher toute réaction de rejet potentiel du traitement administré lorsqu'il s'agit d'immunothérapie. Les cellules cancéreuses pourront être suivies par imagerie de bioluminescence au cours du temps permettant la quantification de la pousse tumorale.

Cette méthode apporte plusieurs avantages. C'est une technique non invasive qui requiert seulement une légère anesthésie des animaux durant l'examen. D'un point de vue éthique, elle permet de diminuer le nombre d'animaux nécessaire car les animaux pourront être conservés tout au long de l'étude (R de réduire). Cette technique permet également de visualiser le développement des cellules cancéreuses dans l'organisme (impossible à visualiser à l'œil nu) et donc de déterminer des points limites plus prédictifs (R de raffiner).

Lors de ce projet, 10 études de caractérisation de la croissance tumorale de différentes lignées de cellules tumorales seront réalisées. Pour chacune de ces études, 40 souris seront utilisées soit un total de 400 souris. 50 études d'évaluation de l'efficacité de différents traitements antitumoraux seront également réalisées. Pour chacune de ces études, 50 animaux seront nécessaires soit un total de 2500 souris pourront être utilisés. De ce fait, au maximum 2900 souris seront utilisées pour l'ensemble du projet.

Les souches de souris utilisées étant immunodéprimées, une attention toute particulière sera portée à l'hébergement et aux soins de ces animaux afin d'éviter toute infection. Au cours de chaque étude, les animaux seront observés quotidiennement afin de détecter rapidement les premiers signes anormaux et ainsi prendre les mesures nécessaires pour le bien-être de l'animal. Une pesée régulière (2-3 fois par semaine) sera également réalisée tout au long de l'étude après injection des cellules tumorales. Toute anomalie clinique observée sera rapportée à un vétérinaire dans le but de réaliser un examen clinique plus approfondi. Des points limites seront définis tout au long des études et des méthodes thérapeutiques pour prévenir l'apparition de ces points limites seront mises en

place pour essayer de traiter les animaux en fonction des signes cliniques observés sans interférence avec les produits testés (injection de fluides, d'analgésiques, isolement, réchauffement, etc...).

Ce projet pourra permettre de proposer sur le marché de nouvelles molécules anti tumorales.

18109 Les maladies hépatiques chroniques telles que la cirrhose du foie et le carcinome hépatocellulaire (CHC) sont des défis majeurs pour la santé mondiale. Ces maladies sont souvent la conséquence d'une maladie hépatique chronique et asymptomatique évolutive. Cirrhose et CHC sont la plupart du temps dus à une infection virale par le virus de l'hépatite C ou de l'hépatite B. Au cours des dernières années un autre type d'affection s'est fortement développé. La stéato-hépatite non alcoolique (NASH), encore connue sous le nom de maladie du soda ou maladie du foie gras, est la conséquence d'une alimentation trop riche en sucre et en graisse. Ce type d'alimentation va entraîner le stockage et l'accumulation de graisses dans le foie, ce qui va conduire à une inflammation locale au sein de l'organe. Cette inflammation chronique va entraîner avec le temps le développement d'une fibrose dans 20% des cas, qui va ensuite évoluer en cirrhose et/ou CHC. Le CHC est la 3ème cause de mort par cancer dans le monde et le seul cancer à ne pas avoir régressé ces dernières années en terme d'incidence et de mortalité. Actuellement, il n'existe aucune thérapie permettant de traiter la fibrose hépatique et/ou la NASH. Le Resmetirom est actuellement cours de test pour le traitement de la fibrose et de la NASH. La nizatidine (NZA), un antagoniste du récepteur H2 de l'histamine et prescrit dans certaines formes de gastrites, a également montré un effet notable pour le traitement de la fibrose et de la NASH. Récemment, nous avons développé un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre la protéine de jonction serrées claudine-1 (CLDN1). En modèle cellulaire et in vivo dans certains modèles de souris, cet anticorps s'est montré très efficace pour ralentir la progression de la maladie. Afin d'aller plus loin dans l'approche thérapeutique de la fibrose hépatique et de la NASH, nous proposons de tester notre anticorps anti-CLDN1 en combinaison avec le Resmetirom ou la NZA et de comparer ces combinaisons aux molécules seules. Afin de valider cette approche, nous souhaitons utiliser un modèle de souris au foie humanisé. Ces souris immunodéficientes sont greffées avec des hépatocytes humains, ce qui nous permet d'analyser le développement de la maladie directement dans les cellules humaines. Pour cette étude, nous estimons le nombre d'animaux nécessaire à 132 en incluant les couples reproducteurs.

Remplacer : une majorité des expériences ont été menées en amont, in vitro sur des lignées cellulaires et ex vivo sur des biopsies de patients atteints de CHC, in vivo dans d'autres modèles murins de maladies hépatiques afin de nous assurer de la réelle nécessité de poursuivre sur ces modèles animaux greffés avec des hépatocytes humains.

Réduire : nous nous basons sur la littérature et sur notre expérience en interne afin de n'utiliser que le nombre d'animaux jugé nécessaire à l'obtention de résultats exploitables.

Raffiner : le protocole expérimental est planifié en amont, l'environnement des animaux est enrichi avec des tube de coton pour nidifier et des briques de tremble pour ronger, les animaux sont maintenus en groupe de 3 minimum afin d'éviter tout stress de l'animal isolé, les souris greffées auront un suivi quotidien adapté afin d'éviter toute souffrance liée à une non-prise de greffe tous les moyens nécessaires seront mis en œuvre pour éviter tout stress ou douleurs lors des procédures (anesthésie, analgésie), si besoin un analgésique dont la durée d'action s'étend au-delà de 24h est utilisé, des points limites que sont l'apparition de signes de mal être et de douleur, persistant au-delà de 48h suite à l'injection d'un analgésique sont appliqués et une méthode de mise à mort appropriée est utilisée.

18110 Les uvéites sont des inflammations intraoculaires, souvent d'origine auto-immune, pouvant représenter une réelle menace pour la vision des patients. Dans les pays occidentaux, l'incidence des uvéites serait de 17 à 52 cas pour 100 000 habitants par an. Chaque année, environ 17% des patients atteints d'uvéites actives présente une diminution ou une perte de l'acuité visuelle. Les formes sévères d'uvéite antérieure et postérieure nécessitent souvent des doses élevées de corticoïdes pouvant entraîner des effets secondaires. Lorsque ces traitements sont inefficaces ou

mal tolérés ils peuvent être remplacés par des immunosuppresseurs. Cependant, les uvéites ne guérissent pas définitivement et les symptômes reviennent périodiquement après arrêt des traitements. Le praticien se retrouve donc très limité en ce qui concerne le traitement et la prévention de récurrence.

L'objectif de ce projet est de mettre en place un modèle in vivo d'uvéite chronique induite par l'antigène Mycobacterium Tuberculosis inactivé (H37RA) chez le lapin afin d'évaluer de nouveaux traitements dans la prévention de récurrence.

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

Ce projet nécessitera un maximum de 2250 lapins de 8 à 12 semaines sur 5 ans.

Afin de respecter la règle des 3R :

- Réduction : le nombre d'animaux par groupe est limité pour cependant rester adapté à l'analyse des résultats par tests statistiques afin de permettre de conclure sur l'efficacité ou non d'un traitement. Des évaluations non invasives de la pathologie sont utilisées tout au long de l'étude pour éviter la mise à mort de l'animal.

- Raffinement : un suivi quotidien des animaux sera effectué afin de minimiser au maximum l'impact sur le bien-être des animaux. Des points limites adaptés, suffisamment prédictifs et précoces permettent de limiter une éventuelle douleur à son minimum. Les animaux sont hébergés dans des cages contenant un enrichissement adapté à l'espèce pour améliorer le bien-être de l'animal. Les examens non invasifs pour évaluer la pathologie sont semblables à ceux pratiqués chez l'homme en cabinet ophtalmologique ou en cabinet vétérinaire. Les examens de l'œil qui requièrent un immobilisme de l'animal pourront être réalisés sous anesthésie pour son confort. Ce projet a été soumis pour évaluation à un comité d'éthique et sera suivi par la structure en charge du bien-être animal de l'établissement.

-Remplacement : à ce jour, aucune méthode alternative ne permet de mimer l'œil dans son environnement et dans sa globalité fonctionnelle. En effet, l'œil est composé de différents tissus de physiologie différente soumis aux variations environnementales, aux interactions des tissus et organes voisins. Le projet nécessitera donc d'avoir recours à des animaux compte tenu des particularités de l'organe concerné par le projet et l'absence de méthode alternative.

18111 La physiopathologie de l'insuffisance rénale dans le sepsis (syndrome d'infection générale et grave de l'organisme par des agents pathogènes microbiens) est mal connue et il n'existe pas de traitement spécifique. Plusieurs études soutiennent que le glomérule rénal (zone de filtration du sang) et le podocyte (cellule principale du glomérule) sont spécifiquement atteints et participent à cette insuffisance rénale avec notamment l'apparition anormale de protéines dans les urines. On sait que des molécules pro-inflammatoires, appelées cytokines, sont produites pendant le sepsis et on sait que ces molécules, hors contexte septique, modulent l'expression des protéines des podocytes. Ces cytokines peuvent être diminuées par un traitement alpha2-agoniste comme la dexmedetomidine (parfois utilisée pour anesthésier les patients en choc septique) ce qui pourrait améliorer la fonction rénale.

L'objectif de notre étude est d'évaluer l'atteinte podocytaire au cours de l'insuffisance rénale aiguë liée au sepsis et d'évaluer l'impact potentiel d'un traitement par alpha2-agoniste adrénergique, la dexmedetomidine sur la fonction rénale.

L'atteinte rénale au cours du sepsis étant multi-factorielle (chute de la tension artérielle, inflammation, stress des organes atteints), ce processus complexe est évaluable uniquement in vivo car les modèles cellulaires ne permettent pas de mimer l'ensemble des phénomènes impliqués au cours du sepsis et donc de répondre à la problématique, ni d'évaluer l'efficacité d'un traitement dont le mode d'action est systémique.

Pour cela nous devons utiliser un modèle de souris septique par péritonite car l'étude rénale et podocytaire doit se faire par des biopsies de rein qui sont formellement contre-indiquées chez

l'homme en cas de sepsis ou d'état de choc car dangereuses dans ce contexte. Le modèle de souris septique permettra de se rapprocher de la physiopathologie du sepsis chez l'homme.

Un nombre total de 72 souris sera utilisé. Les souris seront hébergées à un nombre de 5 par cage, dans une pièce ventilée en permanence, avec un enrichissement de l'environnement ainsi qu'une surveillance continue. La chirurgie de ligature ponction caecale sera réalisée sous anesthésie générale en respectant les règles d'analgésie. Le nombre de souris est réduit au strict minimum pour une réponse optimale (prélèvements sanguins, urinaires et histologiques sur les mêmes souris).

Les résultats permettront de mieux comprendre la physiopathologie de l'insuffisance rénale aiguë au cours du sepsis et d'envisager l'utilisation de ce traitement chez l'homme.

18112 L'étude d'un gène humain que ce soit sur le plan fondamental ou dans le cadre d'une pathologie humaine nécessite la validation de son mode d'action dans un contexte physiologique proche de celui de l'Homme. De la même façon, la mise au point de médicaments requiert des études approfondies ainsi que de nombreuses validations (toxicologiques par exemple) in vivo. Les modèles transgéniques souris et rat (selon l'étude) représentent aujourd'hui une étape indispensable qui répond aux nécessités scientifiques et/ou légales (dans le cas de médicament) d'étude ou de validation.

Le projet vise à générer des modèles de recherche sur mesure pour les laboratoires de recherche académiques et privés.

Les modèles de recherche décrits dans ce projet sont des rongeurs génétiquement modifiés

L'ensemble des animaux nécessaires pour la création de ces modèles est inclus dans ce projet, aussi bien les reproducteurs que leur descendance à phénotype dommageable. Cela représente au maximum un total de 26040 souris et 2752 rats pour 5 ans.

La réalisation de génotypage des animaux est une étape non invasive. Une petite partie des animaux fait l'objet d'une procédure chirurgicale invasive (réimplantation d'embryons pour les femelles et castration pour les mâles).

A ce jour l'utilisation de modèles animaux transgéniques, bien que complétée par des techniques in vitro, est indispensable à l'étude du mode d'action des gènes. En effet les mutations génétiques engendrent des modifications biologiques et physiologiques complexes qui ne peuvent être étudiées que sur des êtres vivants.

Le nombre d'animaux utilisé est réduit au minimum nécessaire. La très grande maîtrise aussi bien des modèles transgéniques que des techniques de reproduction et de transgénése permet de réduire à la fois le nombre de reproducteurs nécessaires ainsi que le nombre de descendants.

Enfin, en ce qui concerne le raffinement, les animaux sont hébergés dans des cages avec enrichissement et en groupes stables chaque fois que cela est possible. L'ensemble des chirurgies réalisées sont parfaitement maîtrisées et réalisées sous anesthésie générale.

18113 Les migraines constituent un problème de santé publique ayant un impact négatif majeur dans la vie quotidienne des patients. Les crises de migraine qui concernent 20% des femmes pour 6% d'hommes, sont caractérisées par des céphalées d'intensité modérée ou sévère, unilatérales, pulsatiles, pouvant durer entre 4 et 72 heures en l'absence de traitement. Les femmes sont donc plus touchées par cette pathologie que les hommes, et leur susceptibilité à la migraine varie en fonction de leur cycle menstruel ou des modifications hormonales qu'elles peuvent rencontrer au cours de leur vie (puberté, ménopause, grossesses). Par ailleurs, ces céphalées sont associées à des modifications de la perception sensorielle telles que l'allodynie (douleur provoquée par une stimulation non douloureuse), la phonophobie et/ou la photophobie. Ainsi la physiopathologie de la migraine implique des régions cérébrales multiples pour rendre compte à la fois de la douleur et des troubles sensoriels associés. L'étude des mécanismes physiopathologiques nécessitent donc d'avoir recours à l'animal afin de tenir compte de toutes les interactions cérébrales qui entrent en jeu lors d'une crise migraineuse. Nous nous intéressons à 3 régions clés impliquées dans la migraine : le ganglion trigéminal, la région sous-nyau caudal du complexe sensitif du trijumeau

(Sp5C, le premier relais des informations sensibles issues de la face et des méninges) et à une région noradrénergique, le locus coeruleus (LC). Récemment, nous avons observé que l'activité du LC est modifiée dans un modèle murin de migraine et pourrait être importante dans la genèse des crises de migraine. Cependant l'anatomie de ce réseau peau-méninges-ganglion-Sp5C-LC n'est pas parfaitement connue, nous avons pour objectif de mieux le caractériser. En première partie, nous allons donc injecter plusieurs traceurs rétrogrades (Fluorogold, rhodamine, EGFP) sur les méninges et sur la peau (animaux naïfs), à fin d'identifier la meilleure combinaison et timing d'injection pour étudier les voies afférentes primaires (peau/méninges vers le ganglion trigéminal). En deuxième partie, nous voulons étudier spécifiquement les neurones du Sp5C projetant vers le LC à l'aide d'un traceur traditionnel et voir comment les connexions anatomiques évoluent dans notre modèle de migraine. Nous allons donc injecter du Fluorogold dans le Sp5C à différents points temporels : avant, pendant et à la fin du modèle de migraine chronique induit par l'administration répétée de soupe inflammatoire (SI) sur la surface des méninges. La problématique de cette deuxième partie est de vérifier d'abord, le meilleur moment pour l'injection du traceur de façon à déterminer les possibles changements dans la connexion entre le Sp5C et le LC dans un modèle de migraine chronique.

Dans le respect de la règle des 3R : (1) remplacer : il est nécessaire de réaliser ces études in vivo, car l'intégration de la douleur implique de nombreuses régions du système nerveux central et périphérique. Aucune méthode alternative ne permet de remplacer ce protocole ; (2) réduire et raffiner : le nombre d'animaux utilisés sera réduit au maximum. Dans ce but, les animaux (rats adultes de la souche Sprague-Dawley) sont placés dans des cages enrichies (rouleaux permettant de se cacher) ce qui permet de réduire le stress des animaux. Les animaux auront accès à l'eau et à la nourriture ad libitum. D'après les études précédentes, la chirurgie nécessaire pour l'injection des traceurs et la mise en place d'une canule au niveau des méninges est bien supportée par les animaux. Les dommages attendus, mis en évidence précédemment, sont une douleur modérée. Par ailleurs, la chirurgie est effectuée sous anesthésie générale, les animaux sont placés sur une couverture chauffante pendant tout le temps de la chirurgie et leur cornée est protégée par une couche de vaseline. Le zone d'incision est désinfectée avec une solution antiseptique. Le temps de chirurgie est réalisé par une personne expérimentée et optimisé au maximum pour qu'il dure le moins longtemps possible. Les animaux sont gardés dans la pièce de chirurgie en observation jusqu'à leur réveil complet. Les animaux seront ensuite observés tous les jours par l'expérimentateur. Ils seront pesés tous les 2 jours, leur vitalité sera vérifiée (déplacement, alimentation, état général, comportement douloureux). Un traitement au kétoprofène pendant 3 jours (5mg/kg en sous-cutané). Le nombre d'animaux dans cette étude tient compte des animaux chez qui l'injection ne fonctionnerait pas (site mal placé, problème de migration du traceur). Nous évaluons à 76 animaux, le nombre nécessaire pour réaliser cette étude.

18114 Les épilepsies sont les maladies neurologiques les plus fréquentes avec les migraines et concernent plus de 500. 000 personnes en France et 60 millions dans le monde. Près de 30% des patients résistent aux traitements pharmacologiques actuellement disponibles et la chirurgie est le seul traitement curatif efficace. Il n'est cependant possible que dans un nombre de cas très limité. Afin de retirer de façon efficiente le foyer épileptique il est nécessaire de le délimiter avec précision. Pour cela, les patients sont actuellement soumis à plusieurs examens préalables dont des Imageries par Résonance Magnétique (IRM), des électroencéphalogrammes de surface (EEG) et intracrâniens (iEEG). L'iEEG impose l'implantation d'électrodes dans le cerveau du patient et donc une chirurgie invasive qui n'est pas sans risque. Cette approche chirurgicale invasive est de moins en moins tolérée par les patients. Il est donc important de développer des solutions qui ne demandent pas d'intervention invasive ni pour la localisation du foyer, ni pour son traitement.

Pour cela, deux méthodes peuvent être proposées :

- Les méthodes dites « -omiques » qui se développent de plus en plus dans le domaine du diagnostic neurologique. La métabolomique en particulier permet de mettre en évidence une signature métabolique caractéristique de l'état pathologique d'un tissu. A l'aide de la Spectroscopie par Résonance Magnétique (SRM), il est possible de caractériser le profil métabolique d'une structure

cérébrale mais également de localiser de façon précise la structure d'intérêt au sein de l'organe, sur tissus ex vivo, mais aussi in vivo. C'est en utilisant cette dernière méthode que nous avons récemment caractérisé et localisé le profil métabolique du foyer épileptique dans un modèle d'épilepsie focale chez la souris.

- Par ailleurs, l'irradiation par micro-vaisseaux de rayon-X (Microbeam Radiation Therapy ou MRT) est un traitement développé depuis plus de 10 ans pour des pathologies neurologiques et des tumeurs cérébrales sur la ligne médicale du synchrotron européen de Grenoble. Ce traitement non invasif pourrait être proposé comme alternative à une chirurgie invasive pour des pathologies qui nécessitent une chirurgie de résection (cancérologie ou épilepsie).

Il serait donc envisageable de combiner ces deux méthodes non invasives : un premier diagnostic et une localisation du foyer épileptique par métabolomique, suivi du traitement focalisé du foyer épileptique par MRT. Le but de ce projet est donc de développer chez le rat la méthode de métabolomique par SRM déjà optimisée chez la souris chez le modèle. Ce modèle permet de représenter chez l'animal un type particulier d'épilepsie (épilepsie méso-temporale) qui est un réel enjeu en thérapeutique clinique (risque accru de mort subite, de pathologies cognitives et émotionnelles, pharmaco-résistance). Ces profils métaboliques obtenus de façon non invasive par SRM in vivo seront confrontés aux données de SRM ex vivo obtenues sur des biopsies cérébrales provenant du même modèle animal. Ce projet permettra également de développer dans ce modèle un protocole optimal de MRT visant une efficacité chez plus de 70% des animaux avec des effets secondaires limités que ce soit au niveau comportemental ou histologique. Ces données seront utilisées par la suite pour un transfert de chacune des méthodologies vers la clinique.

Ce projet est composé de 6 procédures expérimentales.

Raffiner : Nous veillerons à utiliser les animaux de façon la plus éthique possible. Une prise en charge du stress et de la douleur sera mise en place. En effet, les animaux seront anesthésiés et analgésiés durant les interventions (chirurgie, MRT) et les techniques d'imagerie que nous utiliserons dans nos procédures sont sans douleur pour l'animal et permettent de répéter les acquisitions chez le même animal.

Remplacer : L'utilisation de l'animal dans son intégrité est nécessaire pour répondre à notre question. Il n'existe aucun modèle cellulaire qui permette de mettre en évidence un foyer épileptique dans le cerveau ni de le traiter par MRT. Le développement d'une stratégie diagnostique et thérapeutique telles qu'envisagées dans cette étude nécessite d'avoir recours à un modèle animal dans lequel le développement d'un foyer épileptogène a été clairement caractérisé et mis en évidence.

Réduire : Le nombre d'animaux a été réduit au minimum afin de limiter le nombre d'animaux au maximum tout en permettant une exploitation statistique rigoureuse des résultats. Pour cela, en fonction de l'expérience acquise en modélisation animale des épilepsies, nous estimons que 658 animaux au total seront utilisés pendant 5 ans.

La SRM est une méthode non invasive qui, une fois évaluée et validée pour délimiter un foyer épileptique, pourrait permettre de limiter l'implantation d'électrodes intracérébrales. De même la MRT est une méthode non invasive qui, une fois évaluée et validée pour traiter un foyer épileptique, pourrait permettre d'éviter une chirurgie invasive, de réduire les risques associés à une telle chirurgie et de limiter à 1-2 jours la durée d'hospitalisation (au lieu de 10-15 jours pour une chirurgie).

18115 La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative très courante qui ne touche rien qu'en France, plus de 150 000 personnes âgées de plus de 65 ans. Cette maladie entraîne des troubles moteurs spécifiques (tremblements au repos, rigidité, ...) et se caractérise par la mort des neurones qui synthétisent la dopamine. Ces neurones à dopamine localisés dans deux régions principales du cerveau communiquent avec de nombreuses régions du cerveau, notamment celles impliquées dans le contrôle du mouvement volontaire. Parmi ces structures, le cortex moteur est crucial pour l'apprentissage de mouvements complexes. Ainsi, en plus de troubles moteurs caractéristiques de la maladie, les patients Parkinsoniens présentent des troubles cognitifs caractérisés par l'altération

de l'apprentissage moteur. Même si l'existence de cette voie de communication entre ces neurones à dopamine et le cortex moteur a été montrée, son importance fonctionnelle est encore méconnue car comment la dopamine agit sur le cortex moteur et sur quels types de neurones elle agit reste un mystère. Notre projet d'enjeu sociétal et économique majeur s'appuiera sur des méthodes modernes et innovantes (imagerie cellulaire, opto-génétique et chémo-génétique) afin de mesurer in vivo et ex vivo l'activité neuronale et de manipuler de façon spécifique et réversible l'activité soit des neurones dopaminergiques, soit de certaines sous populations neuronales du cortex moteur au cours d'un apprentissage moteur. Nous utiliserons chez la souris, une tâche de préhension de nourriture qui est une tâche sophistiquée nécessitant un apprentissage (proche de ce que l'on peut observer chez l'Homme), et ceci chez des souris témoins et chez des souris « Parkinsonienne ». Pour comprendre le rôle de la dopamine et comment les différents neurones se comportent et communiquent entre eux pendant la phase d'apprentissage, nous n'avons pas d'autres possibilités que d'effectuer les expériences sur animal vigile réalisant la tâche motrice. Les modèles in vitro ne peuvent pour l'heure reproduire ni la complexité de l'organisation du cerveau de souris, ni l'organisation spatio-temporelle de ces réseaux neuronaux du cortex moteur lors de l'apprentissage. De même, les modèles informatiques ne sont pas encore assez puissants pour mimer des réseaux neuronaux complexes pendant leur fonctionnement, mais les données que nous obtiendrons permettront d'élaborer ces simulations. Nous avons donc encore besoin d'utiliser des souris vivantes et vigiles pour ce projet. Au total, 3010 souris seront utilisées dans notre projet. Nous ferons notre maximum pour respecter la règle des 3R. Ainsi, dans le respect du R de réduire, les procédures ont été développées et affinées de façon à limiter au maximum, le nombre et l'inconfort des souris. Nous utiliserons aussi à la fois des lots de souris mâles et des lots de souris femelles pour ne pas avoir à sacrifier les souris femelles. Aussi, dans le respect du R de raffiner, un soin particulier sera accordé à l'observation des souris et à leurs conditions d'hébergement (cages enrichies avec des objets adaptés), avec une attention particulière lors des périodes chirurgicales, en les réchauffant, en les réhydratant et en utilisant les anesthésiques et anti-douleurs appropriés. Pour définir ces dommages et contraintes subis par les souris, nous avons établi une grille d'évaluation clinique et de surveillance. Les souris seront surveillées quotidiennement et cette surveillance sera accrue dès qu'un signe d'appel est constaté. Des points limites suffisamment précoces seront définis pour éviter des souffrances et des critères d'arrêts précis seront mis en place. De plus, la réalisation des expériences sera confiée à des utilisateurs expérimentés. Enfin, en ce qui concerne le R de remplacement, il est important de noter que ce projet nécessite d'étudier le fonctionnement des réseaux de neurones du cortex, le rôle des différentes populations neuronales composant ces réseaux et l'action de la dopamine sur ceux-ci lors d'un apprentissage moteur. Ceci ne peut être réalisé que chez des souris vigiles réalisant la tâche de préhension de nourriture. Aucun modèle in vitro ne peut donc être utilisé dans cette étude.

18116 L'agriculture est depuis toujours en constante évolution. Pour l'aider dans cette mutation la recherche agronomique a initiée de nombreux programmes de recherche, auparavant orientés vers l'augmentation des performances et l'amélioration de la productivité des espèces animales élevées et destinées à produire du lait et/ou de la viande. Aujourd'hui, elle s'orienterait plutôt à maintenir le niveau de production des animaux (ovins, bovins. . .) tout en prenant plus en compte les contraintes du milieu, les risques environnementaux (production des gaz à effet de serre, pollution des sols. . .) ou attentes sociétales (bien être animale, qualité des produits, traçabilité de l'alimentation. . .). Pour répondre à une partie de ces enjeux, notre établissement utilisateur a un besoin constant d'animaux. Pour réaliser des études fines des mécanismes physiologiques d'ingestion et de la digestion des aliments chez les ruminants, les animaux modèles utilisés sont, ici des bovins laitiers. C'est un modèle animal de référence pour établir les valeurs de digestibilité et d'ingestibilité des aliments pour ruminants, et pour comprendre les processus digestifs afin de les modéliser. Pour certaines études, en particulier pour la compréhension des mécanismes de digestion et de mesure de la cinétique de dégradation des aliments, le recours à des animaux porteurs de canules est indispensable. Le projet dure 5 ans et les expérimentations conduites nécessitent de disposer chaque année de 70 vaches laitières avec un renouvellement de 24 génisses annuellement, dont 20 porteuses de canules, ainsi que leur descendance. Il y aura 166 animaux mobilisés sur la durée

du projet. Ceci implique de renouveler une partie de cet effectif chaque année. Il existe des méthodes alternatives de type in vitro mais dont la précision des résultats ne permet pas toujours la généralisation. Cependant, elles sont mises en oeuvre dès que possible permettant de remplacer ou de réduire au maximum le nombre d'animaux canulés utilisés et la sévérité des procédures appliquées.

La règle des 3R a été prise en compte pour l'élaboration du projet et de cette demande :

i) Réduire : avoir recours à moins d'animaux. Par exemple : schémas expérimentaux minimisant le nombre d'animaux, en utilisant une approche en carré latin.

ii) Raffiner : cela consiste à améliorer les conditions d'élevage et d'hébergement des animaux dans le but d'augmenter autant que possible leur bien-être (habituation aux procédures, conditions d'hébergement et de contention adaptées, maintien du contact entre eux quand c'est possible, réduction du temps de présence en stalle de digestibilité, temps de repos suffisant entre les procédures appliquées et surveillance quotidienne de leur bonne santé). Il s'agit aussi d'accorder une préférence à des procédures non-invasives, de donner des soins pré, per et postopératoires adéquats, de réduire la durée de l'étude et d'appliquer les points limites établis pour réduire la douleur et l'angoisse des animaux.

iii) Remplacer : quand c'est possible des méthodes invitro seront utilisées

18117 La myopathie à agrégats tubulaires est une maladie musculaire rare qui présente aussi des défauts touchant d'autres tissus comme les yeux (miosis), la peau (ichthyosis), les plaquettes (thrombocytopenie), la rate (hyposplénie/asplénie) et la taille des souris (petite). Les mutations trouvées chez les patients dans le gène STIM1 sont responsables d'une entrée excessive de calcium dans la cellule provoquant une multitude de signes cliniques. Ce projet vise à étudier chez l'animal, une mutation pour le gène STIM1 identique à celle retrouvée chez des patients. Une étude approfondie de cette pathologie nous permettra de suivre l'évolution des symptômes afin de mieux comprendre les mécanismes biologiques impliquées afin d'apporter une potentielle nouvelle thérapie. A ce jour, aucun traitement n'est disponible et cette étude vise à mettre en place une thérapie par croisement génétique. En effet, nous envisageons un croisement de la souris malade (Stim1 KI), portant la mutation dans le gène Stim1, avec une souris qui exprime 50% du gène Stim1 (Stim1 KO). De cette manière, nous espérons réduire l'entrée excessive de calcium dans la cellule due à la mutation afin d'améliorer les phénotypes préalablement observés. Cette étude est indispensable pour l'avancement dans la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques dans le traitement des myopathies à agrégats tubulaires ainsi que d'autres maladies liées à l'excès de calcium.

Plusieurs procédures expérimentales seront réalisées avec un maximum d'un test par jour. Le nombre d'animaux sera réduit au maximum pour obtenir une puissance statistique suffisante. Ainsi, nos précédentes études montrent que 15 souris maximum par groupe seront nécessaires pour obtenir une étude concluante (REDUCTION). Donc, nous prévoyons 334 animaux et cette estimation tient compte des différents croisements nécessaires pour obtenir les différentes mutations mais également des animaux d'expériences issus de ces accouplements.

Pour ces travaux il est primordial d'utiliser la souris, modèle animal de choix, physiologiquement et structurellement proche de l'Homme, pour étudier d'une part la physiopathologie et d'autre part l'amélioration des symptômes suite à notre thérapie (REMPACEMENT). Le bien-être des animaux sera contrôlé quotidiennement et tout signe de douleur sera pris en charge en prenant les mesures appropriées en fonction du niveau de douleur observé. De la nourriture en gel sera déposée et du gel ophtalmologique sera utilisée selon les besoins des animaux. En cas de douleur intense, un analgésique pourra être administré et les animaux seront mis à mort prématurément pour éviter toute souffrance inutile. Certaines procédures seront réalisées sous anesthésie générale en utilisant des plaques chauffantes pour éviter l'hypothermie des animaux. (RAFFINEMENT).

18118 Le système immunitaire possède de nombreuses cellules spécialisées qui traquent et éliminent les microbes s'introduisant dans notre corps. Parmi ces cellules, les lymphocytes B sont

particulièrement importants car ils produisent des anticorps (Ac). Les Ac sont des molécules capables d'identifier et de détruire les corps étrangers. Lors des réponses immunes, les anticorps sont modifiés par l'introduction des mutations somatiques. De cette manière des anticorps plus efficaces et spécifiques sont générés afin de mettre en place une défense immunitaire optimisée et adaptée au pathogène rencontré.

L'objectif de ce projet est d'étudier le rôle dans l'amélioration des anticorps (introduction des mutations somatiques dans les gènes des immunoglobulines) lors des réponses immunes de Fam72a, un gène que nous avons récemment identifié. Pour l'étudier, nous avons besoin du modèle souris (*Mus musculus*) car il n'existe aucun modèle cellulaire capable d'induire des mutations somatiques in vitro. En effet, les différentes cellules du système immunitaire doivent interagir dans les organes lymphoïdes in vivo, ce qui est impossible de reproduire in vitro.

Ce projet nécessite de 30 animaux, 3 cohortes de 10 souris (5 sauvages et 5 mutantes pour le gène d'intérêt). Chaque cohorte sera immunisée avec un antigène modèle classiquement utilisé en immunologie pour étudier la réponse anticorps (NP-CGG). Deux semaines après immunisation, les souris seront sacrifiées et les lymphocytes B de la rate seront purifiés. Les gènes codant pour les immunoglobulines seront alors amplifiés par PCR et séquencés pour étudier la fréquence des mutations somatiques et la nature des mutations induites. Les 3 cohortes seront immunisées de manière indépendante afin d'avoir 3 réplicats expérimentaux et prendre en compte ainsi la variabilité biologique dans l'analyse. Chaque cohorte conduit à des centaines des séquences (et des milliers des bases séquencées), ce qui limite le nombre d'animaux nécessaires et permet une analyse statistique robuste de la fréquence (test X²), la nature (test X²) et la distribution (t-test) des mutations somatiques induites.

Les animaux seront suivis quotidiennement afin d'éviter toute souffrance, ils recevront un traitement anti-douleur dès que nécessaire et seront sortis du protocole expérimental si le niveau de douleur dépasse le seuil fixé.

18119 Dans le cadre de la 2ème année de Licence Sciences, Technologies, Santé mention Biologie, le programme prévoit des travaux pratiques (TP) qui illustreront les cours magistraux. Les thématiques de ces TP sont : la détermination du volume sanguin, la contraction du muscle lisse utérin et l'action des hormones; l'effet de la castration sur l'involution des organes androgéno-dépendants ; effet de la pancréatectomie sur la glycémie ; effet de la thyroïdectomie sur la croissance); soient au total 5 TP différents. Les résultats issus de plusieurs groupes d'étudiants sont poolés et des analyses de variance sont utilisées pour augmenter la puissance des tests statistiques et diminuer le nombre d'animaux utilisés.

Pour ce projet pédagogique, le recours à l'animal est indispensable ; son utilisation sera limitée dans le temps et interrompue si l'animal présente des signes d'inconfort ou de douleur perturbant son activité, suivant les procédures d'euthanasie appropriées. Une administration d'un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) en sous-cutanée sera effectuée avant et le jour suivant la chirurgie chez tous les animaux. Le comportement général de l'animal, son poids, son apparence, la présence d'eau et de nourriture dans chaque cage enrichie seront surveillés quotidiennement (7 j/7). le nombre maximal d'animaux utilisés par an est de moins d' 1 rats par étudiants. L'effectif maximal calculé pour atteindre les objectifs est de 365 rats, il a été déterminé par la puissance des tests statistiques et la grandeur de la variation attendue. Le remplacement ne peut ici s'effectuer puisque la physiologie ne peut être appréciée que dans un modèle vivant intégré. Notre projet respecte donc la règle des « 3R » autant que possible.

18120 La réalisation d'études de toxicologie est une obligation réglementaire lors du développement d'un médicament humain, médicament vétérinaire ou pour toute substance chimique. Ces études servent à évaluer la sécurité d'un médicament avant les premiers essais cliniques chez l'homme ou l'animal ou à évaluer la sécurité de substances chimiques avant mise sur leur mise sur le marché. L'objectif de ce projet est la réalisation des études réglementaires de toxicologie générale, toxicologie de la reproduction et du développement et toxicologie juvénile et des études préliminaires (Recherche de dose, pharmacocinétique) chez le rongeur. Ces études consistent en

une administration unique ou répétée du produit à tester suivi d'observations régulières des animaux, suivi du comportement, de la consommation alimentaire et du poids, évaluation des effets sur les paramètres sanguins ou urinaires et analyse macroscopique ou histopathologique. Le choix du rongeur est basé sur la réglementation qui demande la réalisation d'études précliniques sur deux espèces, une espèce rongeur et une espèce non rongeur. Le nombre d'animaux utilisé est défini par la réglementation et les guidelines et est adapté à la nécessité d'obtenir des résultats fiables sur un effectif suffisant tout en limitant le nombre d'animaux au strict nécessaire. Ce nombre est estimé à 36170 par an soit 180850 animaux. Ce nombre important s'explique par la variété importante d'études dans ce projet et la durée du projet (5 ans). Il n'est pas possible de substituer l'animal par des méthodes alternatives car le modèle doit pouvoir mimer au mieux les interactions complexes biologiques et physiologiques retrouvées chez l'être humain et doit aussi permettre l'observation de signes cliniques. Pour améliorer leur bien-être, les animaux sont hébergés en groupes sociaux dès que cela est compatible avec la procédure expérimentale. Les rats et souris sont hébergés sur litière de copeaux de bois et reçoivent un enrichissement adapté tel que papier kraft, bâtonnets de bois à ronger et tunnels. . . Les techniques engendrant le moins d'inconfort ou sur une durée la plus courte possible pour l'animal seront privilégiées. Les autres techniques ou procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie avec le cas échéant un protocole d'analgésie adapté. Les animaux sont suivis quotidiennement sous la supervision d'un vétérinaire. Des points limites précoces sont appliqués de telle sorte qu'en cas de signes cliniques ayant des répercussions significatives sur l'animal, des mesures sont rapidement prises pour limiter la souffrance (mise en place d'un traitement analgésique, diminution de la dose testée, suspension de la procédure).

18121 Les blessures nerveuses périphériques sont fréquentes et la récupération fonctionnelle suite à ce genre de traumatisme est bien souvent sous-optimale, particulièrement dans les cas de transection nerveuse. Les patients souffrent alors de déficits fonctionnels permanents. L'intervention classique consiste à prélever un nerf sensitif superficiel et l'insérer entre les deux extrémités de la lésion. Cette façon de faire comporte toutefois plusieurs désavantages et les résultats obtenus sont souvent insatisfaisants. Plusieurs sociétés de recherches tentent de développer des systèmes de conduit pouvant remplacer l'autogreffe. L'objectif de ce projet est de tester la réparation du nerf sciatique après son ablation partielle chez le rat. Notre société est une CRO spécialisée en expérimentation animale (dans le suivi et l'hébergements des animaux, la chirurgie et leurs manipulations) et va, après partielle transection ou ablation d'une partie du nerf sciatique tester sa reconstruction au cours du temps. La reconstruction va se faire au moyen d'implants résorbables et sera suivie par des tests électrophysiologiques et anatomopathologiques. Notre client développe des polymères biocompatibles qui permettent, quand ils sont utilisés en tant qu'implants ou de colle, la reconstitution de plusieurs types de tissus. Le but de ce projet est, après avoir validé la reconstitution du nerf sciatique sur l'animal, de tester en clinique la reconstitution des nerfs après une lésion.

Après avoir caractérisé et évalué ces polymères ex vivo, notre client souhaite les évaluer in vivo. L'objectif de ce projet est d'évaluer la régénération du nerf par la récupération de ses propriétés électrophysiologique (influx nerveux) et la conséquence de la régénération de l'influx nerveux sur le muscle par la récupération du poids musculaire au niveau des muscles innervés par le nerf régénéré et par analyse histopathologique du nerf (régénération nerveuse) et des muscles (réinnervation musculaire).

Afin de réaliser cet objectif, le rat a été choisi comme modèle expérimental pour sa pertinence. En effet, par sa taille, comparé à la souris, il permet plus aisément de pratiquer un acte chirurgical. La taille des implants sera aussi plus compatible avec le rat que la souris. Plusieurs groupes de rats seront utilisés et évalués dans le cadre de cette procédure expérimentale. Il s'agira d'une procédure expérimentale classique, dont les bases sont connues et publiées dans des revues spécialisées. La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée sur le terrain : 1) Réduction : le nombre d'animaux utilisé a été rationalisé au maximum tenant compte, des analyses statistiques qui seront effectuées 2) Raffinement : Un enrichissement de l'environnement

des animaux est adapté en fonction des espèces. La température et l'hygrométrie de l'animalerie est contrôlée et adaptée aux espèces hébergées. Une étude pilote sera réalisée afin d'étudier le temps de récupération post chirurgical et afin de mettre en place un système de réduction du stress, de la douleur et de la souffrance des animaux après l'opération et pendant l'étude. Un suivi étroit des animaux sera fait par le technicien responsable de l'étude en lien avec un ou plusieurs membres de la SBEA afin d'échanger avec le vétérinaire en cas de besoin 3) Remplacement : Des études ex vivo ont déjà été réalisées par notre client. Malheureusement, ces études ne peuvent suffire car ces modèles ne permettent pas de mimer les propriétés biologiques et mécaniques des organes entiers. Ce projet consiste à valider ces implants in situ et va permettre de les développer pour la clinique. Nous allons utiliser dans ce projet un nombre de rat limité à 500 sur une durée de 5 ans.

18122 Les complications liées à l'athérosclérose telles que l'infarctus du myocarde et les accidents vasculaires cérébraux (AVC) représentent la principale cause de mortalité dans le monde. Malgré l'arsenal thérapeutique mis à disposition et les progrès majeurs faits au cours de ces dernières années, la prévalence de ces pathologies ne diminue pas. Jusqu'à très récemment, la prévention s'est focalisée sur la prise en charge des facteurs de risque classiques tels que l'hypertension artérielle, le diabète et l'hypercholestérolémie et en négligeant d'autres facteurs de comorbidités comme la santé bucco-dentaire. Dans ce contexte, une étude clinique publiée récemment a montré que la présence d'une maladie parodontale (le parodonte étant le tissu de soutien des dents) sévère chez des patients présentant un AVC augmentent la survenue d'évènements vasculaires secondaires et la mortalité, et ceci même après ajustements des facteurs de risque confondants.

La maladie parodontale est une pathologie infectieuse chronique qui affecte plus de 80 % de la population âgée de plus de 65 ans. Elle se caractérise par une inflammation et une perte de l'attachement de la gencive autour de la dent ce qui aboutit à la formation d'une poche dans laquelle se niche les pathogènes parodontaux.

De nombreuses études pré-cliniques et cliniques ont pu mettre en évidence le lien entre maladie parodontale et AVC, cependant aucun lien causal n'a pu être démontré. Alors que les mécanismes d'action restent méconnus, il est accepté de façon consensuelle que les germes parodontaux et en particulier *Porphyromonas gingivalis*, la principale bactérie parodontale, peuvent passer dans la circulation sanguine. Cette bactériémie est silencieuse, transitoire et se produit de façon itérative principalement au cours des traitements bucco-dentaires mais aussi lors des phénomènes de mastication.

La mise en place de ce projet chez la souris pourrait à moyens et longs termes permettre la mise en place de nouvelles recommandations visant à améliorer la prise en charge de la maladie parodontale chez les patients qui ont un AVC et plus largement chez les patients à haut risque cardiovasculaire. Pour valider notre hypothèse, nous devons utiliser des modèles expérimentaux chez l'animal car c'est le seul moyen à l'heure actuelle pour étudier les différents aspects de notre projet.

Le but de ce projet est d'évaluer

: i) l'impact de *Porphyromonas gingivalis* sur l'aggravation des dommages tissulaires lors d'un AVC via son effet sur la rupture de la barrière hémato-encéphalique (vaisseaux cérébraux imperméables qui séparent le tissu cérébral de la circulation sanguine) ou la réponse inflammatoire et ii) l'effet potentiellement bénéfique du traitement parodontal (mimé ici par un arrêt de la bactériémie) sur la récupération du cerveau post-AVC.

Ce projet qui va se dérouler pendant 1 an, fait appel à l'utilisation d'un modèle ischémie reperfusion cérébrale ou AVC chez la souris. Pour cela, après anesthésie, nous introduirons un monofilament en nylon dans l'artère cérébrale moyenne de façon transitoire pendant 1 heure. Afin de mimer le passage des bactéries dans la circulation sanguine comme chez l'homme, nous injecterons par voie intra-veineuse les bactéries 5 minutes avant le retrait du monofilament. Les animaux seront maintenus en vie jusqu'à 1 mois après l'induction de l'AVC, les animaux seront euthanasiés afin de récupérer le sang et le cerveau.

Afin de minimiser l'utilisation du nombre d'animaux, quand cela est possible, nous utiliserons des modèles *in vitro* à partir de culture cellulaire (par exemple pour l'étude de la barrière hématoencéphalique) et une étude statistique a été effectuée afin de calculer le nombre d'animaux nécessaires, de 160 dans cette étude.

Les animaux seront surveillés quotidiennement et, des mesures visant à améliorer le bien-être (enrichissement) seront prises. Si des signes de douleurs venaient à apparaître alors des mesures visant à réduire la douleur (analgésie) seront prises avant, pendant et après les expériences. L'apparition de points limites entrainera l'euthanasie des animaux

18123 Les cancers du système digestif et du système hématopoïétique demeurent un problème majeur en Santé Publique. Leurs causes sont multiples, aboutissant à la perte de fonction de gènes suppresseurs de tumeurs et à l'activation d'oncogènes. Notre étude se focalise sur un gène homéotique codant pour un facteur de transcription exprimé sélectivement dans l'épithélium intestinal adulte chez le sujet sain. Ce gène, dont l'expression est réduite dans les cancers du côlon les plus agressifs, exerce la fonction de suppresseur de tumeurs dans l'intestin. Il constitue donc une cible thérapeutique potentielle. Cependant, une expression anormale de ce gène apparaît dans des lésions précancéreuses et cancéreuses du système digestif antérieur (œsophage, estomac, pancréas) ainsi que dans une proportion importante des leucémies. Dans ces situations pathologiques, son rôle précis reste à définir. L'objectif de ce projet est double : premièrement, étudier si la surexpression de ce gène homéotique sélectivement dans l'épithélium intestinal permet de contrecarrer la tumorigenèse dans cet organe ; deuxièmement définir l'impact de l'expression anormale de ce gène dans les cancers du système digestif antérieur et dans les leucémies. Cette étude sera réalisée chez la souris à l'aide de modèles transgéniques de gain et de perte de fonction de ce gène homéotique, associés à des modèles génétiques de cancérogenèse spontanée ou induite. Le projet a été conçu et sera mené dans le respect de la règle des 3R.

- Remplacement : Les études de physiopathologie seront nécessairement réalisées chez la souris. Néanmoins les études mécanistiques découlant des observations faites chez l'animal seront réalisées sur des modèles de cultures *ex vivo* d'organoïdes dérivés de ces souris et/ou sur des lignées cancéreuses humaines.

- Raffinement : Les animaux seront élevés dans des conditions sanitaires et de bien-être optimales. Les procédures ont été réfléchies afin de limiter au minimum l'angoisse, la douleur et la souffrance des animaux. Un suivi régulier comprenant l'observation de critères définis pour chaque protocole sera effectué. Des points limites ont été définis permettant de soustraire l'animal aux procédures expérimentales limitant ainsi la souffrance et le stress. Des analgésiques seront administrés dès qu'un signe de douleur sera détecté.

- Réduction : Les protocoles ont été élaborés de façon à utiliser le moins de souris possible. Ainsi, dans plusieurs procédures les mêmes souris seront utilisées pour les études dans plusieurs organes (intestin, estomac, œsophage, pancréas) ou dans des études longitudinales permettant ainsi de réduire le nombre d'animaux. De plus, le maintien des souches de souris correspondant à des modèles de cancérogenèse spontanée ou induite sera géré de façon globale avec les autres projets en cours au laboratoire utilisant ces souris. Le nombre d'animaux nécessaires pour chaque procédure a été défini sur la base de la littérature et de façon à permettre des analyses statistiques (Log-rank test, test de Student, test de Wilcoxon-Mann-Whitney). Au maximum, la réalisation de ce projet nécessitera l'utilisation de 1670 souris pour 5 années d'étude.

18124 Ce projet a pour but de cryoconserver des lignées, ainsi que de redériver (décontaminer) des lignées de souris à partir d'embryons frais ou congelés pour la recherche scientifique. La décontamination des lignées par transfert d'embryons permet l'obtention d'animaux indemnes d'agents pathogènes et de certains opportunistes. La cryoconservation permet la sauvegarde de lignées rares et précieuses, la simplification des échanges d'animaux entre chercheurs et la diminution du stress des animaux lors du transport.

Ces différentes techniques nécessitent l'utilisation de très jeunes embryons (<4 jours), obtenus par accouplements des mâles d'intérêts avec des femelles, après super ovulation, c'est-à-dire après injection d'hormones pour déclencher l'ovulation.

Ces embryons sont ensuite réimplantés chirurgicalement chez une mère-porteuse, préalablement accouplée avec un mâle stérile, ce qui stimule hormonalement la femelle afin qu'il y ait une bonne maturation de l'endomètre (épaississement + irrigation) pour que les embryons trouvent une muqueuse utérine propice à leur développement.

Pour respecter la règle des 3R, nous mettrons en place les actions suivantes:

1- Remplacer: Ce projet ne peut être réalisé que chez la souris, aucun remplacement par une technique alternative n'est possible.

2- Réduire: Le nombre d'animaux nécessaire par lignée a été calculé au plus juste pour une efficacité optimale. Ce nombre se base sur l'expérience des demandes au cours des années précédentes

3- Raffiner: Les animaux ont tous une période d'acclimatation et leur milieu de vie est contrôlé. Toutes les cages sont enrichies de coton compacté qui permet de créer des nids. Lors des chirurgies, les animaux reçoivent une anesthésie et une analgésie adéquates pour éviter toute douleur et sont surveillés quotidiennement.

Des points-limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire. L'amélioration constante des techniques est une préoccupation permanente afin de répondre aux exigences de raffinement et de réduction. Pour l'ensemble des lignées redérivées ou archivées, les besoins pour la recherche sont estimés à 2980 souris par an, soit 14900 animaux pour les 5 ans du projet. Ce nombre est un maximum, il est susceptible d'être diminué en fonction des demandes.

De plus, la cryoconservation permet la réduction du nombre d'animaux élevés mais non utilisés. L'élevage de souris génétiquement modifiées, spécialement conçues pour la recherche médicale, est une nécessité afin de pouvoir étudier les maladies génétiques mais également beaucoup d'autres pathologies, comme le cancer, les maladies cardiovasculaires ou les maladies neurologiques, et développer de nouveaux traitements.

18125 Le phénomène d'agrégation plaquettaire in vitro est un problème fréquemment rencontré en biologie médicale, limitant l'obtention de spécimens sanguins adéquats pour les analyses hématologiques chez de nombreuses espèces animales domestiques et de laboratoire. Cette difficulté pré-analytique est notamment rencontrée chez le chat, la souris et le mini-porc, espèces animales connues pour y être particulièrement sensibles. Dans le cadre d'une étude visant au raffinement d'une procédure (remplacement d'une procédure terminale par une procédure sans euthanasie de l'animal) chez la souris, nous avons été confrontés aux difficultés liées à la formation de nombreux caillots et agrégats plaquettaires dans le sang prélevé. Il nous a donc paru essentiel d'améliorer la qualité des échantillons sanguins chez la souris de laboratoire. Diverses molécules antiagrégantes ont été étudiées chez l'homme et chez l'animal et parmi elles, un analogue des prostaglandines (Iloprost), un anti-inflammatoire non stéroïdien (aspirine) et un antiagrégant plaquettaire (cangrelor) se sont révélés prometteurs pour empêcher ou limiter la formation d'agrégats plaquettaires in vitro. Une étude préliminaire visant à évaluer l'effet d'un analogue de synthèse de la prostaglandine I₂ (l'Iloprost, Ilomedine ND) sur l'agrégation plaquettaire dans le sang total lors d'un prélèvement terminal à la veine cave caudale chez la souris C57BL/6 a montré des résultats intéressants mais incomplets, avec persistance d'agrégats plaquettaires in vitro (N° d'agrément 201706161711197). Il nous paraît donc important de tester d'autres antagonistes de l'agrégation plaquettaire et de les comparer à l'Iloprost lors d'un prélèvement non terminal. D'autre part, la méthode de prélèvement non terminale (site de prélèvement et dispositif utilisé) varie selon les laboratoires et ses répercussions sur la qualité des échantillons sanguins est peu documentée dans la littérature. Nous avons souhaité tester différentes techniques de prélèvement sanguin non terminal chez la souris afin de déterminer la méthode (technique et éventuel additif) qui produit les échantillons de meilleure qualité pour les analyses hématologiques en limitant le plus possible la formation d'agrégats plaquettaires.

Notre étude comporte trois étapes successives, réalisées sur les mêmes animaux (souris mâles et femelles C57BL/6j) à deux semaines d'intervalle entre chaque étape afin de laisser les souris renouveler leur stock de cellules sanguines.

1/ Lors de la première étape, trois antiagrégants plaquettaires seront comparés entre eux sur la base du nombre d'agrégats plaquettaires dans les échantillons sanguins auxquels ils sont associés. 80 souris des deux sexes seront divisées en quatre lots identiques et prélevées une fois à la veine faciale à l'aide d'un dispositif conçu pour les prises de sang de très petit volume chez l'homme, avec ajout systématique d'un des trois antiagrégants ou de sérum physiologique dans le dispositif. Le prélèvement est prévu sous anesthésie générale gazeuse "flash" afin de limiter au maximum le stress induit par la manipulation, la contention et la piqure. Le réveil des animaux s'effectuera dans une cage chauffée et au calme sous la surveillance permanente d'un vétérinaire.

2/ La deuxième étape aura pour objectif de comparer les techniques de prélèvement sans ajout d'antiagrégant. Les 80 souris seront divisées en quatre lots identiques et prélevées une fois, soit à la veine faciale avec trois méthodes possibles (capillarité avec microvette capillarité avec minivette, goutte à goutte), soit à la veine jugulaire par la méthode classique de cathétérisme à l'aiguille. Comme pour la première étape, tous les prélèvements se feront sous anesthésie gazeuse (flash ou au masque) et le réveil s'effectuera en cage chauffée sous surveillance d'un vétérinaire.

3/ La troisième étape synthétisera les résultats obtenus à la faveur des deux premières: la technique de prélèvement et l'antiagrégant qui auront induit le moins d'agrégats seront choisis et couplés afin d'effectuer une dernière série de prises de sang sur les 80 souris divisées en deux lots: technique seule versus technique et antiagrégant. Les conditions d'anesthésie et de réveil seront les mêmes qu'aux étapes 1 et 2.

Les prélèvements sanguins seront exclusivement réalisés par un vétérinaire formé à la manipulation des rongeurs de laboratoire et le volume sanguin prélevé à chaque étape ne dépassera pas les limites imposées par les règles du bien-être animal soit 10% du volume sanguin circulant de l'animal en une fois avec un délai d'attente d'au moins deux semaines entre les prélèvements.

- - Le principe de remplacement de la souris par une autre espèce (poisson) ou par des lignées cellulaires, n'a pas été possible pour notre étude dont la problématique porte sur la particularité du sang de souris.

- - Afin de répondre aux exigences du principe de réduction et si la situation sanitaire future le permet, ces mêmes animaux seront utilisés en formation initiale vétérinaire pour les travaux pratiques d'anatomie. De la même manière, le nombre d'animaux utilisé a été déterminé afin de correspondre au minimum nécessaire pour pouvoir mettre en évidence des différences statistiquement significatives entre les lots, soit 10 animaux par lot.

- - L'objectif même de cette étude est le raffinement de la prise de sang chez la souris: nous cherchons à mettre au point une technique de prélèvement non terminal, le moins douloureux et générant le moins de répercussions possible sur l'animal. Nous avons décidé d'anesthésier systématiquement les souris, y compris pour des techniques qui sont habituellement réalisées sur animaux vigiles (prises de sang à la veine faciale). Entre chaque étape, les animaux seront hébergés en cages ventilées dans un local climatisé avec nourriture et boisson à volonté. Une surveillance sera effectuée quotidiennement sous la responsabilité directe d'un vétérinaire. Les animaux auront à disposition un enrichissement varié sous forme de tunnels, igloos, copeaux et foin. à la faveur desquels. Les euthanasies seront euthanasiés par inhalation de CO2 dans un module dédié (méthode répondant aux exigences de raffinement des procédures).

18126 La thérapie antisens est une nouvelle approche thérapeutique contre les maladies génétiques et les infections. Cette stratégie thérapeutique est basée sur l'utilisation des oligonucléotides anti-sens (ASO), des petites molécules d'ADN, qui empêchent l'expression d'un gène spécifique afin d'éviter par exemple la production d'une protéine toxique. Le plus gros défi de la thérapie antisens dans le contexte des thérapies des maladies du système nerveux central, est l'accès de l'ASO à la cible intracérébrale, car, l'ASO ne franchit pas la barrière hémato-encéphalique. Dans ce contexte, l'ASO doit donc être administré directement au sein du liquide cébrospinal en privilégiant l'injection

intrathécale (IT). Une exemple de thérapie par ASO, administré par la voie intrathécale est SPINRAZA (nusinerzen), un thérapie contre la maladie amyotrophie spinale5Q. Aujourd'hui, la distribution cérébrale des ASOs après administration IT reste relativement peu explorée, mais on sait qu'elle est impactée par les modifications chimiques apportées à la structure de l'ASO. Ces modifications chimiques sont appliquées aux extrémités de l'ASO sans changement au niveau de la partie codante de l'oligonucléotide anti-sens. Elles améliorent la stabilité de l'ASO et l'entrée dans les cellules neuronales. Ces modifications chimiques sont donc indépendante de la cible visée par les oligonucléotides de l'ASO et peuvent donc être appliquées à n'importe quel ASO à visée thérapeutique. Identifier les modifications chimiques les plus pertinentes pouvant améliorer le traitement des atteintes du système nerveux central reste un défi à relever.

La Tomographie par Emission de Positons (TEP) est une technique d'imagerie médicale, permettant d'évaluer et de suivre in vivo la biodistribution d'un composé thérapeutique après l'avoir radiomarqué. Alternativement, l'imagerie TEP quantitative de la cible de l'ASO permet également mesurer l'efficacité in vivo de l'ASO.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'imagerie TEP comme outil 1) de suivi de la distribution cérébrale des ASOs après injection IT chez le rat ; et 2) de mesure d'efficacité in vivo de l'ASO après avoir apporté des modifications chimiques.

Ce projet comporte plusieurs étapes : 1) le développement d'une méthodologie permettant un mode d'administration IT robuste et reproductible chez le rat; 2) le marquage des ASOs à l'aide d'un isotope radioactif (radiosynthèse) pour l'imagerie vivo en imagerie TEP in vivo; 3) la mesure in vivo de l'impact des modifications chimiques sur la biodistribution ; 4) la mesure in vivo de l'influence des modifications chimiques sur l'efficacité thérapeutique. Les données obtenues seront corrélées aux analyses sur tissu provenant des mêmes animaux. Au total, 5 modifications chimiques différentes apportées sur un ASO de référence déjà bien caractérisé seront évaluées.

Recours à l'animal :

Le recours à l'animal est indispensable pour l'évaluation in vivo sur la biodistribution et l'efficacité. En effet, ces modifications chimiques peuvent améliorer la stabilité de l'ASO dans l'organisme, et impacter ainsi l'efficacité de l'ASO. Ceci ne peut pas être mesuré en culture cellulaire. L'espèce de choix pour cette première évaluation in vivo est le rat, la taille du cerveau des rats étant plus adaptée à la résolution des outils d'imagerie pour les études précliniques que la souris. Ce projet utilisera au total 246 rats sur 5 ans pour l'évaluation de 5 modifications chimiques différentes.

Règles de 3R :

Au cours de ce projet la règle des 3R sera appliquée :

Remplacement – Avant toute application in vivo les modifications chimiques sont évaluées sur culture cellulaire in vitro. Seules les modifications chimiques qui auront montrées in vitro une efficacité et une non-toxicité seront évaluées dans ce projet.

Raffinement – Toutes les procédures (injection IT et imagerie) se passent sous anesthésie générale, complétées par une analgésie locale et soins post-opératoires adaptés pour éviter tout stress et douleurs liés aux interventions. A chaque manipulation des points limites liés à l'anesthésie, la chirurgie et l'imagerie sont définis afin d'éviter toute souffrance. Les rats seront hébergés par deux en milieu enrichi et un suivi sera mis en place afin d'éviter toute souffrance animale.

Réduction – Le recours à l'imagerie permet de réduire façon conséquente le nombre d'animaux. En effet l'imagerie TEP est peu invasive et permet un suivi longitudinal du même animal. Ceci permet de réduire le nombre d'animaux tout en gardant la puissance statistique de l'étude.

18127 Les rongeurs sont régulièrement utilisés pour la recherche dans le domaine de la santé humaine. Ils sont notamment inclus dans des études réglementaires de toxicologie dont le but est d'évaluer la toxicité de nouvelles molécules mises en formulations sur l'animal afin de l'extrapoler chez l'homme.

En tant que sous-traitant de l'industrie pharmaceutique, nous proposons à nos clients de réaliser la phase expérimentale d'études permettant la détermination de la dose maximale tolérée, ce qui permettra de définir les doses

qui seront ensuite utilisées dans les études réglementaires de toxicologie demandées par les autorités pour constituer les dossiers AMM.

Dans ce projet, le nombre d'animaux sera égal à 6 (5 animaux traités et 1 animal réserve). L'espèce utilisée sera la souris Balb C plus particulièrement la souris FVB particulièrement utilisée dans le domaine de l'oncologie.

Dans ce projet, la classe thérapeutique de la molécule étudiée sera oncologie. La molécule sera administrée par voie orale, deux fois par semaine à trois jours d'intervalle.

Les doses administrées seront des doses croissantes, augmentées progressivement, jusqu'à observation de signes cliniques. Les animaux seront observés deux fois par jour par un personnel expérimenté.

Après chaque administration et à l'apparition de signes cliniques, un ou trois prélèvements sanguins seront réalisés, si l'état de santé des animaux le permet, par un personnel expérimenté et selon les bonnes pratiques vétérinaires conformément à la réglementation en vigueur.

D'un point de vue scientifique et réglementaire il est indispensable de mesurer les effets toxiques de cette nouvelle molécule sur l'animal pour l'extrapoler plus tard au niveau de l'homme.

Aucune méthode alternative ne permet actuellement de reproduire la réponse d'un être vivant suite à l'administration

de nouveaux médicaments, c'est pour cela qu'il est indispensable de recourir à l'animal dans son intégralité.

Ce projet inclut 6 animaux, c'est le nombre minimal d'animaux requis pour avoir des résultats exploitables.

Les animaux seront hébergés en groupe avec un enrichissement du milieu adapté.

Une attention particulière sera alors portée au raffinement et à l'enrichissement du milieu pour éviter l'ennui (buchette à ronger, nid. . .).

Les points limites ou points d'arrêt anticipés sont:

- Immobilité prolongée de l'animal, décubitus
- Suffocation, convulsion, détresse respiratoire
- Apparence physique dégradée, absence de toilettage (ex : poil ébouriffé ou souillé)
- Changements majeurs de comportements (ex : automutilation, agitation intense. . .)

18128 Ce projet a pour but d'évaluer l'acceptabilité de comprimés contenant une molécule test codée E846 en fonction de sa composition (avec ou sans saveur) et de son mode d'administration afin de définir le protocole d'essai clinique qui sera réalisé sur le terrain.

La molécule E846 appartient à une famille d'inhibiteurs de kinases qui sont impliquées dans le contrôle, au niveau du système nerveux périphérique et central, de la douleur chronique, en particulier arthrosique.

Cette molécule a déjà été étudiée dans des tests précliniques, et en particulier dans deux études toxicologiques incluant des chiens, traités par voie orale répétées sur 4 semaines et 13 semaines respectivement.

Suite à ses études, une dose sans effet indésirable (NOAEL) chez le chien a été clairement établie à 20 mg/kg /jour.

À ce jour, le test item a également été administré à des volontaires humains en bonne santé dans une étude de phase 1 à dose ascendante unique jusqu'à 540 mg (à jeun), sans problème de sécurité particulier.

Ce projet comprend deux procédures différentes. La première procédure (l'étude pilote) permettra d'évaluer l'acceptation orale du produit avec ou sans saveur appétente et d'évaluer l'intérêt d'ajouter

une telle saveur à la formulation du produit E846. À cette fin, 4 chiens Beagle en bonne santé recevront par voie orale 2 formulations de E846 (avec ou sans saveur).

Suite à cela, une seconde procédure (étude pivot) sera réalisée sur 8 chiens Beagle en bonne santé. L'acceptation du produit sera testée en utilisant différents modes d'administration orale et les paramètres pharmacocinétiques plasmatiques du E846, après une administration orale unique de E846 à une dose de 5 mg/kg seront également évalués.

Les prélèvements sanguins seront toujours réduits au minimum. Ils seront être réalisés par ponction avec une aiguille au niveau des veines jugulaires en alternant les sites de prélèvement autant que possible.

Toute intervention sur l'animal sera effectuée par une personne habilitée et expérimentée afin de réduire au minimum le stress.

Aucune méthode alternative ne permettant actuellement de reproduire l'acceptation orale d'un produit, ni la diffusion d'un produit dans le sang des animaux, il est donc indispensable de recourir à l'animal entier.

Dans ce projet 12 animaux au total seront donc utilisés, c'est le nombre minimal d'animaux requis pour avoir des résultats exploitables.

Durant toute la phase expérimentale, les animaux seront hébergés généralement par groupe, sauf les jours d'administration où les animaux seront hébergés en individuel jusqu'au T 8h maximum après administration. Une attention particulière sera portée aux animaux pour avoir un enrichissement du milieu adapté pour éviter l'ennui: contact visuel et olfactif entre congénères, surface suffisante de l'hébergement, présence de jouets, de tablettes. . .

Un suivi quotidien (voir plusieurs fois par jour) sera mis en place permettant l'observation générale des animaux et la détection précoce d'éventuels effets du produit sur l'animal.

18129 La mémoire est une fonction cognitive essentielle dans la formation de l'identité de chaque individu où les expériences passées forgent la manière de réagir à une situation présente ou future. Dans certaines pathologies comme la maladie d'Alzheimer la mémoire est un des premiers déficits cognitifs observés qui prive le patient d'autonomie et le met en situation d'handicap.

Cette mémoire peut être de différents types. Elle peut se définir en terme de durée. On parle alors de mémoire à court versus mémoire à long terme. La première est nécessaire pour faire une tâche spécifique pendant un temps donné et va être ensuite oubliée. La mémoire à long terme renferme le savoir-faire ou encore les souvenirs personnels de chaque individu. Ces mémoires peuvent être maintenues toute une vie et font de l'Homme, un être unique avec son histoire propre.

Malheureusement dans certaines pathologies comme Alzheimer cette perte mnésique déshumanise totalement le patient. Alors que ce dernier se souvient parfaitement comment tricoter, il a oublié l'existence de ses enfants et de ses petits-enfants au plus grand désespoir de ses proches.

Enfin une dernière distinction dans la mémoire est le stade dans lequel cette mémoire se trouve. Elle se distingue en trois phases que sont : l'apprentissage, la consolidation et le rappel. Dans la pathologie Alzheimer il a été démontré, qu'à la différence du vieillissement où l'on observe un déclin progressif du rappel mnésique, on diagnostique une incapacité à apprendre de nouvelles informations qui en fait une particularité de cette pathologie.

Notre projet vise donc à comprendre le fonctionnement normal de la mémoire afin de prévenir ses dysfonctionnements dans la pathologie. Nous allons pour cela étudier l'implication du circuit anatomique connectant l'Hippocampe et le Cortex préfrontal dans une mémoire à court terme versus une mémoire à long terme. Nous allons ensuite étudier le rôle de ce circuit au cours des trois phases que sont l'apprentissage, la consolidation et le rappel.

Pour ce faire nous allons dans un premier temps identifier le circuit anatomique grâce à des traceurs. Deuxièmement nous allons valider le rôle de ces deux structures et des connexions entre ces deux structures pendant les phases d'apprentissage, de consolidation et de rappel dans notre tâche à court terme et à long terme. Enfin dans un dernier axe nous allons étudier l'activité des

neurones de chaque structure au cours de nos tâches mnésiques afin de comprendre comment ces structures dialoguent entre elles.

Ce projet se justifie pleinement d'un point de vue scientifique et obéit à la règle des 3R : Remplacement : notre modèle de souris est le modèle le plus adéquat pour cette étude car les structures impliquées chez l'Homme dans la mémoire sont conservées chez la souris et présentent le même phénotype comportemental associé à un apprentissage.

Réduction : Chaque souris est utilisée dans autant de procédures qu'il est envisageable sans qu'elles interfèrent entre elles, dans le but de limiter le nombre d'animaux. Ainsi l'histologie et l'activité neuronale seront réalisées sur un même animal lors de l'apprentissage de deux types de tâches mnésiques. Les tests statistiques sont choisis afin d'obtenir la meilleure significativité avec un minimum d'individu. Nous utiliserons 780 animaux sauvage C57BL/6JRj pour ce projet.

Raffinement : Il est connu que les performances au cours des tests mnésiques dépendent du niveau de stress des animaux. C'est pourquoi nous portons une attention toute particulière aux conditions d'hébergement et de soin des animaux, ainsi qu'à la diminution du stress et de la douleur pour chaque procédure. Tous les actes chirurgicaux sont réalisés sous anesthésie générale avec la mise en place d'un protocole de prise en charge de la douleur per et post-opératoire par administration d'antalgiques. Les animaux sont par ailleurs suivis conformément à une grille d'analyse permettant notamment la mise en œuvre de points limites précoces et adaptés.

18130 -Contexte scientifique : Au sein de notre unité, nous travaillons principalement sur les cancers cutanés induits par le soleil et plus particulièrement les rayons ultraviolets de types B (UVB). Les cancers cutanés, appelés aussi carcinomes, sont très fréquents chez les personnes qui sont fortement et régulièrement exposées aux rayons du soleil au cours de leurs vies. Ils représentent 90 % des cancers cutanés diagnostiqués en France. Il est, par conséquent, primordial d'axer la recherche sur la compréhension des mécanismes qui sont à l'origine de cette carcinogénèse UVB induite afin de mieux les appréhender et les traiter. Lors de précédents travaux, nous avons mis en évidence d'importants changements au niveau du métabolisme énergétique de la cellule au cours du processus de carcinogénèse. Ces changements peuvent être différents selon les tumeurs.

-Description du projet : Au cours de ce projet notre objectif sera d'évaluer les modifications métaboliques aux différents stades de la carcinogénèse et entre les différents types de tumeurs afin de vérifier si ces modifications peuvent être utilisées comme biomarqueurs pronostic ou diagnostic. De plus une meilleure compréhension de cette reprogrammation métabolique au cours de la carcinogénèse cutanée permettrait de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques permettant un traitement préventif ou curatif selon le stade tumoral. Pour étudier l'impact de ce remodelage nous allons implanter des cellules tumorales humaines à différents stades de la carcinogénèse à des souris immunodéficientes afin d'éviter tout rejet de greffe. Deux études sont prévues dans le cadre de ce projet.

Dans un premier temps, l'étude TRAITEMENT, les souris développant des tumeurs seront traitées avec des modulateurs métaboliques. Dans un second temps, nous manipulerons les cellules cancéreuses pour inhiber l'expression de nos cibles thérapeutiques et nous suivrons la croissance tumorale en fonction des gènes inactivés.

Les retombées attendues sont :

- l'impact des différents métabolismes énergétiques (oxydatif ou glycolytique) dans la progression tumorale
- l'impact de ces derniers aux différents stades de la carcinogénèse.

Dans le respect de la règle des 3R :

-En matière de raffinement : le bien-être de nos animaux sera pris en compte dès leur naissance jusqu'à leur mort : hébergement en cages collectives, enrichissement de l'environnement et points limites précoces adaptés à chaque protocole et/ou situation nous permettant de prendre les décisions qui s'imposent face à la souffrance ou l'inconfort de nos animaux. Utilisations d'anesthésiques et d'analgésiques dès que nécessaire.

-Remplacement : A ce jour, il n'existe pas de méthodes alternatives suffisamment prédictives pour mimer le processus complexe que nous étudions et semblables à celle de l'homme. Nous ne pouvons pas remplacer l'utilisation des animaux par des tests in vitro ou in silico car le mécanisme que nous étudions est trop complexe pour être modélisé sans expérimentation chez la souris

-Afin de restreindre le nombre d'animaux, nous combinerons nos lots témoins. De plus, le nombre d'animaux a été défini d'un point de vue statistique afin de réduire leur nombre. Nous avons déterminé via des tests statistiques qu'un lot de 10 souris par groupe était nécessaire pour avoir des données statistiquement exploitables à la fin de l'étude en tenant compte de nos 10 ans d'expériences en matière de cancérogénèse UVB induite. Nous avons de plus, recouru à un système d'imagerie qui nous permet de suivre le développement des tumeurs dans le temps. Cela nous permet de ne pas réaliser de sacrifices d'animaux intermédiaires pour documenter l'évolution de la maladie.

Ainsi pour la totalité du projet, nous prévoyons d'utiliser un total de 2700 souris échelonnées sur 5 ans.

18131 La santé métabolique et la susceptibilité aux maladies métaboliques peuvent en partie être attribuées au programme d'expression de notre patrimoine génétique qui organise le moment et l'endroit où les gènes et leurs produits sont exprimés. Le mode de vie et les facteurs environnementaux peuvent conduire à la modification de l'expression de nos gènes, c'est ce que l'on appelle l'épigénétique. Les petits ARN contribuent à moduler le programme d'expression des gènes dans le temps et dans l'espace, intégrant ainsi la réponse biologique au mode de vie et aux facteurs environnementaux pouvant entraîner une maladie.

L'objectif premier de ce programme est de comprendre l'influence du régime alimentaire sur la santé métabolique à long terme, tant des générations présentes que futures. Dans le cadre de ce projet, le groupe s'intéresse en particulier à identifier les mécanismes par lesquels les facteurs de style de vie et les facteurs environnementaux influencent les cellules et notamment les spermatozoïdes, et comment ces processus altèrent la fonction à long terme des tissus et des organes métaboliques.

Ce projet comporte quatre procédures : 1. Impact des régimes alimentaires sur le sperme du mini porc, 2. Impact des régimes alimentaires sur le sperme du lapin, 3. Prélèvements d'organes chez le mini porc, 4. Ovariectomie et hystérectomie chez la lapine « boute-en-train ». D'une durée de 5 ans, 480 animaux seront utilisés. Il n'est pas possible de substituer l'utilisation d'animaux dans le cadre de ce projet pour comprendre les mécanismes d'épigénétique sur les spermatozoïdes.

Avantages : De plus en plus d'études montrent qu'il existerait un lien entre obésité et prévalence de certaines maladies dans la descendance et notamment l'autisme. Il s'agit donc d'un enjeu de santé publique qui, si l'on peut mieux comprendre ces mécanismes, permettrait ainsi de les prévenir. Ce projet nous permettrait d'obtenir des notions clefs pour la compréhension de ces mécanismes.

Domages escomptés : Lors de la mise sous régime enrichi en graisse, les animaux vont avoir une prise de poids importante pouvant causer des troubles métaboliques et/ou articulaires. Afin de limiter ces dommages les mini porcs auront une prise de poids maximum de 2 kilos par semaine, les lapins auront une prise de poids maximum 20% par semaine.

Méthodes alternatives (principe de remplacement) : Un organisme entier est nécessaire pour étudier l'influence de l'alimentation sur les modifications épigénétiques au niveau du sperme. Ce projet fait partie d'un projet multi-espèce, et il s'agit ici d'étudier le lapin et le mini-porc qui permettent de faire des prélèvements de sperme suffisamment important pour des analyses ex vivo.

Nombre et type d'animaux, conditions d'hébergement et de soins (principe de réduction et principe de raffinement) : Ce projet dure 5 ans et prévoit d'utiliser au maximum 480 animaux soit 210 mini porcs (dont 10 seront dédiés à la formation aux gestes techniques) et 270 lapins (dont 10 lapins seront dédiés à la formation aux gestes techniques et 20 femelles « boute-en-train » utilisées pour l'entraînement des lapins au prélèvement de sperme).

Dès leur arrivée, les animaux seront hébergés dans des cages ou box individuels avec un environnement enrichi adapté à chaque espèce (jouets, mordillos, plateforme, briques de bois à grignoter, fibres de peuplier compressées, contact visuel et olfactif entre les animaux, musique,

commutation progressive de la lumière et interactions fréquentes avec les humains...). La boisson sera disponible ad libitum et les régimes enrichis seront rationnés.

Des points limites préalablement définis et adaptés permettront d'assurer un suivi de l'état général des animaux et de préserver leur bien-être. En cas d'altération de l'état de l'animal, la surveillance sera rapprochée et les animaux seront soignés en fonction de la sévérité de la douleur observée.

18132 Avec près de 450 nouveaux cas diagnostiqués chaque année, les leucémies (cancer du sang) représentent la 1^{ère} cause de cancer chez l'enfant. La nétrine (NTN1) est une molécule présente dans les cellules et qui peut jouer deux rôles opposés en fonction de son interaction ou non avec d'autres molécules. Liée à sa protéine partenaire, NTN1 va permettre la survie, la différenciation ou la migration cellulaire, tandis que l'absence d'interaction va entraîner la mort cellulaire. Il a été montré que NTN1 est exprimée dans certaines tumeurs pédiatriques et sa présence en grande quantité dans les cellules leucémiques pédiatriques est corrélée avec un cancer de mauvais pronostic. Cette molécule pourrait ainsi participer à la survie des cellules tumorales.

Notre projet vise à développer un nouvel outil thérapeutique qui permettrait d'améliorer le traitement et la gestion des leucémies pédiatriques de mauvais pronostic, souvent réfractaires aux chimiothérapies standards. Un de ces outils est une molécule qui reconnaîtrait spécifiquement NTN1 et l'empêcherait d'exercer son action au sein des cellules cancéreuses. Ce projet, d'une durée de 2 ans, s'articule autour de 2 axes expérimentaux : le premier doit permettre d'amplifier in vivo les cellules leucémiques humaines issues de différents patients grâce à un modèle souris, le second consistera à utiliser cette « banque de cellules » ainsi obtenue pour réaliser des analyses ex vivo et tester in vivo le potentiel thérapeutique d'une molécule ciblant NTN1.

La procédure expérimentale consistera donc à injecter les cellules leucémiques pédiatriques à des souris immunodéficientes NSG (souris dépourvues de système immunitaire et permettant ainsi la greffe et la prolifération de cellules humaine sans risque de rejet). L'injection se fera soit par voie intraveineuse chez des souris adultes après irradiation (veine de la queue de souris éveillée) soit par voie intra-hépatique chez des souriceaux nouveau-nés âgés de 1 à 3 jours (dans le foie visible par transparence sous la peau des souriceaux nouveau-nés éveillés). L'étape d'irradiation est indispensable à la mise en place du modèle chez les souris adulte, il permet de favoriser la prise de greffe des cellules humaines. A la dose utilisée, cela n'a pas d'impact sur le bien-être des souris. Les méthodes d'injection des cellules (par voie intraveineuse ou intra-hépatique) sont indolores. Nous avons choisi de réaliser deux modes d'injection en raison de la fragilité des cellules leucémiques pédiatriques. En effet, les échantillons de cellules de certains patients supportent mal la congélation/décongélation et nous ne disposerons que d'un nombre très limité de cellules. Dans ce cas précis, l'injection intra-hépatique sur souriceaux nouveau-nés sera privilégiée. Nous suivrons la prise de greffe par prélèvement sanguin (au niveau de la veine de la joue sur souris éveillée) tous les 15 jours à partir de 6 semaines après l'injection. Si nous n'arrivons pas à détecter des cellules leucémiques dans le sang, nous réaliserons des prélèvements au niveau de la moelle osseuse toutes les 3 semaines (réalisés au niveau du fémur sur souris anesthésiées et avec une analgésie préalable) afin de vérifier que les cellules tumorales sont bien présentes. Cette première partie permettra d'amplifier in vivo le nombre de cellules leucémiques (prolifération dans la moelle osseuse et dans la rate, comme dans le cas des leucémies chez l'Homme) qui pourront ensuite être ré-injectées à d'autres souris (injection intra-veineuse à des souris immunodéficientes adultes uniquement) pour la mise en place de la seconde partie du projet consistant à tester l'efficacité thérapeutique d'une molécule dirigée contre NTN1. Ainsi, lorsque les cellules leucémiques pédiatriques seront détectables en nombre suffisant dans le sang des souris, la molécule ciblant NTN1 ou une molécule contrôle sera injectée par voie intraveineuse, à raison de 2 injections par semaine pendant 2 mois. Les effets thérapeutiques seront évalués par suivi du nombre de cellules leucémiques

circulantes dans le sang (prélèvement sanguin à la joue) et par imagerie corps entier (sous anesthésie gazeuse) tous les 15 jours après le début du traitement.

Le projet sera réalisé en respectant la règle des 3 R « Remplacer, Réduire, Raffiner ».

A l'heure actuelle, il est impossible d'évaluer l'effet thérapeutique de molécules sur des cellules leucémiques pédiatriques en culture in vitro. En effet, ces cellules sont extrêmement fragiles et elles meurent très rapidement lorsqu'elles ne sont pas maintenues dans un environnement mimant parfaitement celui retrouvé dans l'organisme humain. L'utilisation d'un modèle souris est donc indispensable et impossible à remplacer par des systèmes exclusivement in vitro.

Nous avons également réduit au minimum le nombre de souris utilisées dans ce projet, tout en veillant à conserver une puissance statistique suffisante. Nous utiliserons au plus 456 souris immunodéficientes, dont 200 souris injectées au stade nouveau-nés, réparties de la manière suivante:

- les cellules leucémiques de 35 patients seront amplifiées soit dans des souris adultes au moment de l'injection (2 souris par groupe x 10 patients = 20 souris adultes) soit dans des souris nouveau-nés (8 souris par groupe x 25 patients = 200 souris nouveau-nés). Puis des greffes secondaires seront réalisées avec les cellules précédemment amplifiées (4 souris par groupe x 35 patients, soit 140 souris adultes).

- les tests d'évaluation thérapeutique seront menés sur des groupes de 8 souris adultes (5 traitées versus 3 contrôles) ayant été injectées avec les cellules leucémiques amplifiées in vivo et issues de 12 patients différents (nous sélectionnerons ces patients parmi les 35 patients inclus initialement dans la première partie du projet en fonction du niveau et du délai de la prise de greffe), soit 96 souris adultes.

Une attention toute particulière sera également portée au bien-être des animaux par une surveillance journalière qui sera assurée par le personnel de l'animalerie, en complément de celle des expérimentateurs. L'hébergement se fera dans des cages avec enrichissement (carrés de coton, tunnels en carton). Un suivi rigoureux des souris tout au long des protocoles, selon des grilles d'évaluation permettant d'évaluer le bien-être des animaux, sera réalisé. Ce suivi clinique consiste à l'observation quotidienne des souris (état du poil, activité de la souris) et une surveillance hebdomadaire selon une grille d'évaluation clinique sera réalisée. En cas de modification de comportement et apparence, la surveillance est renforcée tous les 2-3 jours. Dans le cas des expériences avec les souris nouveau-nés, nous veillerons à ce qu'il n'y ait pas de rejet par la mère au cours de la première semaine. Lorsqu'une souris atteint un point limite préalablement défini, elle sera euthanasiée. L'ensemble des souris sera euthanasié au plus tard 6 mois après le début de la procédure.

18133 La stéatose hépatique est une lésion du foie correspondant à la surcharge de graisse dans le cytoplasme des hépatocytes. Elle s'accompagne d'une inflammation hépatique et du développement progressif d'une fibrose lésionnelle. La prévalence de la stéatose hépatique est estimée entre 20 % et 30 % dans les pays développés. Il s'agit donc d'une pathologie extrêmement fréquente. Sa prévalence tend de plus à augmenter parallèlement à l'accroissement de la population obèse et/ou diabétique. A ce jour, il n'existe pas de traitement pour la stéatose hépatique et le développement de tels composé fait l'objet de recherches intensives par les laboratoires pharmaceutiques.

L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre du développement d'un traitement de type thérapie cellulaire en développement destinés à l'amélioration de la stéatose hépatique associée à l'obésité. L'objectif de la présente étude sera d'évaluer l'impact de ce traitement sur la prise alimentaire, le poids corporel, la glycémie et l'inflammation/fibrose hépatique chez un modèle de souris C57Bl/6J dit "STAM". La stéatose hépatique est induite chez ce modèle par la combinaison de deux interventions:

- Une administration de streptozotocine (STZ) à faible dose réalisée au second jour post-natal
- Une alimentation enrichie en graisse dès la 4ème semaine post-natale

Dans ce contexte, les souris mâles développent une stéatose hépatique entre 5 et 6 semaine d'âge ainsi qu'une fibrose hépatique entre 9 et 12 semaines d'âge. Il est à noter que les souris femelles présentent une résistance au développement de la stéatose.

L'étude est réalisée à partir de femelles gestantes, qui seront réceptionnées 5 jours avant la date théorique de mise-bas.

Deux jours après la naissance (D2), les nouveau-nés recevront une injection sous-cutanée de STZ et seront replacés avec leur mère. Après 4 semaines, les souriceaux seront sexés et sevrés et les mères ainsi que les femelles des portées seront mises à mort. A partir du sevrage, et jusqu'à l'issue de l'étude, les animaux seront soumis à une alimentation enrichie en graisse (60% de l'énergie apportée par les lipides). A partir de D56 et jusqu'à la fin de l'étude, les animaux recevront une administration sous-cutanée de cyclosporine (immunosuppresseur) tout les deux jours afin d'éviter toute réaction immunitaire suite à l'administration de la thérapie cellulaire. A D63, D70 et D77 les animaux recevront une administration intra-veineuse de la thérapie cellulaire en développement (cellules) via le sinus retro-orbital. Le poids corporel et la prise alimentaire des animaux seront mesurés une fois par semaine à partir de la quatrième semaine (mise sous HFD) et jusqu'à l'issue de l'étude. Des prélèvements sanguins sont prévus à D56, D63, D70, D77 et D84 pour mesure des taux plasmatiques des enzymes hépatiques Aspartate aminotransférase (ASAT) et Aspartate transaminase (ALAT). Enfin, à D84, les souris mâle seront mises à mort et leur foie prélevé pour réaliser une analyse histologique et des dosages biochimiques.

La présente étude nécessitera l'emploi de 17 souris femelles gestantes C57Bl/6J qui devraient permettre la production de 85 souriceaux (nous comptons 5 souriceaux par portée selon les directives du fournisseur) dont une quarantaine de mâles dont 32 seront strictement nécessaires pour l'étude.

La règle des 3Rs a été prise en compte dans l'élaboration du présent protocole:

- Raffinement: Le modèle animal qui sera utilisé est un modèle parfaitement caractérisé dans la littérature et couramment utilisé dans les études précliniques cherchant à mettre en évidence les effets bénéfiques de composés sur la prise alimentaire, le poids corporel et la stéatose hépatique. Le protocole a été planifié de façon à limiter au maximum tout stress et tout inconfort pour les animaux. Les femelles gestantes seront hébergées individuellement, et ce jusqu'au sevrage des souriceaux. Un enrichissement sera apporté sous forme d'igloo et de matériel de nidification. Après sevrage, les mâles issus des portées seront hébergés en cages collectives (4 souris/cage) et un enrichissement du milieu sera assuré par l'ajout d'igloos et de briquettes de bois spécifiques pour rongeurs. Enfin, un suivi journalier des animaux à l'aide d'une grille de score permettra une action rapide en cas d'atteinte des points limites établis, notamment l'emploi d'analgésie pour soulager la douleur le cas échéant.

- Réduction: Le nombre d'animaux utilisés a été rationalisé à partir de l'expérience acquise par notre laboratoire sur l'analyse des paramètres d'intérêt. Ainsi, le nombre d'animaux par groupe a été adapté en fonction des paramètres d'intérêt de façon à être en mesure de mettre en évidence une différence statistiquement significative sur les paramètres étudiés.

- Remplacement: L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe aucune méthode de substitution n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude de l'impact d'un composé sur le poids corporel, la prise alimentaire et la stéatose hépatique.

18134 Dans certains pays européens dont la France, la faune sauvage (en particulier les blaireaux, *Meles meles*) est infectée par la tuberculose bovine à *Mycobacterium bovis*, ce qui limite l'éradication chez les bovins de cette importante maladie commune à l'homme et aux animaux. En France, la vaccination des blaireaux est envisagée en complément des mesures de lutte actuelles contre la tuberculose, avec une préférence pour un vaccin oral permettant de vacciner un grand nombre d'animaux sauvages. Le développement d'un vaccin oral pour le blaireau est un projet complexe, long et coûteux actuellement en cours en Espagne, en collaboration avec la France, le Royaume Uni et l'Irlande.

Cette saisine est la continuité du dossier 201610211414126 qui s'achèvera en juillet 2022 et le remplacera. Au cours du 201610211414126, le modèle expérimental d'infection intra-trachéale de furets par *M. bovis* a été mis en place, avec l'objectif de développer un analogue animal de laboratoire pour les blaireaux, afin de tester l'immunogénicité et l'effet protecteur de plusieurs

vaccins oraux contre le développement des lésions, mais également contre l'infection par *M. bovis*. Le protocole infectieux mis en œuvre chez les blaireaux visait à permettre le développement de lésions chez tous les animaux infectés dans un délai court, car les blaireaux captifs supportent moins bien les conditions de confinement que les furets. Avec des furets, une infection chronique et donc plus physiologique de la tuberculose peut être induite, en mettant en contact suffisamment longtemps des animaux excréteurs et des animaux naïfs, selon un protocole déjà mis en place à l'université de Georgie, USA, avec le pathogène *M. tuberculosis* pour tester des vaccins anti-tuberculeux à usage humain. Ce modèle infectieux est considéré comme plus adapté pour tester la capacité des vaccins anti-tuberculeux à stimuler les réponses immunitaires innées capables de contrer la colonisation initiale des muqueuses respiratoires par le pathogène. Il constitue en outre un raffinement de l'approche car il permettra de préserver le caractère peu sévère de la tuberculose caractéristique chez les blaireaux comme les furets. Il n'existe pas actuellement d'alternative à l'expérimentation animale pour tester l'efficacité des vaccins antituberculeux; ce projet utilise le nombre minimal d'animaux par lot pour obtenir des réponses significatives.

Ce projet comprend 3 procédures :

1/ La première procédure consiste à définir le modèle infectieux par *M. bovis* par transmission directe entre furets. Les animaux excréteurs seront des animaux infectés expérimentalement selon le protocole établi lors de la saisine 201610211414126, avec une dose de *M. bovis* délivrée par la voie intratrachéale entraînant le tableau pathologique connu chez les blaireaux infectés. La souche infectieuse sera la souche de *M. bovis* anglaise déjà utilisée chez les blaireaux et les furets, afin de poursuivre les études de développement de vaccin oral déjà en cours en Europe. La durée d'exposition sera de 8 mois, comme lors des protocoles similaires mis en place à l'Université de Georgie.

2/ La seconde procédure vise à choisir les vaccins oraux et leurs doses/formes galéniques capables de stimuler des réponses immunitaires muco-séales et périphériques montrant une bonne prise vaccinale, avant de tester si cette réponse est protectrice lors d'études d'efficacité avec challenge infectieux. Aucun marqueur périphérique de protection anti-tuberculeuse n'est disponible (chez l'animal ou l'homme) en l'absence de test infectieux *in vivo*. Cependant, les études menées dans d'autres pays d'Europe ont montré que des marqueurs d'exposition aux vaccins sont indispensables chez les blaireaux pour attendre une réponse protectrice contre *M. bovis*.

Ces marqueurs seront en outre d'une grande valeur sur le terrain comme biomarqueurs d'exposition des animaux aux vaccins, pour repérer quelle proportion de la population a consommé les apprêts. Les animaux vaccinés seront observés sur une durée de 13 semaines au terme desquelles les réponses immunitaires et colonisation des vaccins dans les tissus seront testées, ainsi que le tableau pathologique pour apporter des informations sur l'innocuité des vaccins. Les réponses immunitaires à 4 et 8 semaines seront également testées. Huit vaccins/doses/formes galéniques par la voie orale au total seront testés chez des furets.

3/ La dernière procédure correspond à l'objectif 2 de la saisine 201610211414126 déjà acceptée qui est reconduit ici, avec l'objectif de tester la réponse et la protection induites par des vaccins oraux antituberculeux. Dans cette procédure, les 2 épreuves utilisées seront complémentaires pour apporter des preuves de l'efficacité protectrice des candidates vaccinaux, à la fois contre l'infection dans des conditions les plus proches possible d'une transmission naturelle (contacts dans la procédure 1) mais également contre le développement de lésions tuberculeuses dans le contexte d'une infection expérimentale (même dose intratrachéale que dans la procédure 1, sur 12 semaines).

Au cours des 5 années du projet, un maximum de 210 animaux dont 200 furets (40 pour la mise au point de l'épreuve, 40 pour tester la réponse aux vaccins oraux et 120 pour en tester l'efficacité) et 10 blaireaux.

Une nouvelle saisine sera ultérieurement soumise après revue complète des résultats afin de tester l'efficacité protectrice chez des blaireaux captifs du vaccin oral choisi chez les furets.

18135 L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre du développement d'un composé X en tant que traitement anti-inflammatoire.

L'objectif de la présente étude sera d'évaluer l'impact de ce composé sur l'inflammation et l'anorexie transitoire induites par une administration aiguë de lipopolysaccharides (LPS), un composant de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. L'administration de LPS est connue pour induire chez la souris un état d'inflammation systémique associé à une anorexie transitoire.

Le traitement (véhicule, composé X à 3 doses, Composé X inactivé ou composé de référence) sera administré de façon aiguë par voie intrapéritonéale simultanément au LPS. Trois prélèvements sanguins en série seront pratiqués après le traitement afin de mesurer son impact sur l'inflammation induite par le LPS. La prise alimentaire individuelle sera mesurée 24h après l'administration des traitements, cette dernière étant fortement influencée par l'état d'inflammation et constituant ainsi un paramètre d'intérêt majeur.

Le présent projet nécessitera l'emploi de 48 souris C57Bl/6 réparties en 6 groupes expérimentaux de 8 animaux.

La règle des 3Rs a été prise en compte dans l'élaboration du présent protocole:

Raffinement: Le modèle animal qui sera utilisé est un modèle d'inflammation bien caractérisé dans la littérature et couramment utilisé dans les études précliniques cherchant à mettre en évidence les effets bénéfiques de composés sur l'inflammation systémique. Le protocole a été planifié de façon à limiter au maximum tout stress et tout inconfort pour les animaux. Les animaux seront hébergés en cages individuelles afin de permettre la mesure de prise alimentaire journalière individuelle, mais les cages (transparentes) seront positionnées côte à côte de façon à maintenir un contact visuel entre les animaux et atténuer la sensation d'isolement. Par ailleurs, un enrichissement du milieu sera assuré par l'ajout d'igloos et de matériels de nidification ainsi que de briquettes de bois spécifiques pour rongeur. Enfin, un suivi journalier des animaux à l'aide d'une grille de score permettra une action rapide en cas d'atteinte des points limites établis.

- **Réduction:** Le nombre d'animaux utilisés a été rationalisé à partir de l'expérience acquise par notre laboratoire sur l'analyse des paramètres d'intérêt. Ainsi, le nombre d'animaux par groupe a été adapté en fonction des paramètres d'intérêt de façon à être en mesure de mettre en évidence une différence statistiquement significative sur les paramètres étudiés.

- **Remplacement:** L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe aucune méthode de substitution n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude de l'impact d'un composé sur l'inflammation systémique et l'anorexie transitoire associée.

18136 La Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie génétique qui touche le muscle chez l'enfant, provoquant une faiblesse musculaire généralisée et évolutive. Les patients sont contraints à l'usage du fauteuil roulant vers l'âge de 10 ans, et décèdent d'insuffisance respiratoire ou cardiaque vers l'âge de 30 ans. Il n'existe pas, à ce jour, de solution thérapeutique curative sur le marché pour la DMD. Les modèles in vitro ne permettent de valider que les premières étapes de l'élaboration de nouveaux médicaments et il faut ensuite envisager un passage sur les modèles animaux. De plus le modèle souris couramment employé (souris mdx) n'est pas satisfaisant car il ne reproduit pas fidèlement l'ensemble de la symptomatologie de la maladie humaine contrairement au chien GRMD (Golden Retriever Muscular Dystrophy), qui reproduit de manière fidèle les manifestations cliniques et fonctionnelles rencontrées chez les patients mais qui nécessite des infrastructures particulières coûteuses et un suivi vétérinaire lourd contraignant.

Pour pallier au manque de modèle fidèle à la maladie et de taille moyenne, nous avons développé un modèle de rat myopathe qui mime fidèlement la symptomatologie des patients DMD et représente donc un modèle de taille raisonnable à développement rapide permettant la validation préclinique de potentiels traitements.

Cette étude a pour objectif de décrire de manière quantifiée et exhaustive l'effet de deux stratégies de thérapie génique permettant l'expression d'une protéine tronquée mais fonctionnelle permettant d'alléger le phénotype de la DMD. Les constructions pour ces deux stratégies ont été intégrées dans un vecteur viral et seront administrées par une injection intraveineuse unique chez les rats

DMD soit précocement (4 semaines) lorsque les sujets sont encore asymptomatiques soit plus tardivement lorsque la maladie est déjà établie (3 mois) pour voir s'il est possible de limiter son développement voir de le stopper. Cette étude utilisera un total de 128 rats, qui seront traités de l'âge de 4 semaines jusqu'à l'âge de 6 et 12 mois ou de l'âge de 3 mois jusqu'à l'âge de 9 mois et comparés à des rats DMD et des rats sains traités avec un vecteur viral contrôle commun aux deux stratégies, suivis de la même manière et sur la même période. Ce nombre d'animaux a été réduit au minimum en tenant compte de la variabilité observée dans une population de rats DMD tout en ayant suffisamment de matériel pour réaliser toutes les analyses biologiques nécessaires à l'évaluation de la maladie. Pour limiter le stress, les rats seront évalués à l'aide de différentes mesures non invasives dérivées de méthodes utilisées chez les patients et adaptées aux rats avec des friandises en récompense. Les rats seront habitués aux manipulations dès leur plus jeune âge et seront hébergés par 2-3 individus selon l'âge dans des cages contenant des enrichissements correspondant à leur espèce. Ils seront observés quotidiennement afin de suivre au plus près les éventuelles complications liées à leur maladie. Des points limites précis et suffisamment précoces pour leur éviter toute souffrance prolongée et inutile ont par ailleurs été définis. Un effet bénéfique est attendu sur l'ensemble des paramètres évalués et cette étude permettra de déterminer précisément le niveau de cet effet.

18137 Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est un agent infectieux responsable du SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise). En l'absence de traitement antirétroviral (ARV), le VIH cause une infection chronique du système immunitaire humain associée à des infections opportunistes et certains cancers. La principale forme de contamination est le contact sexuel vaginal, anal et/ou oral non protégé. Les autres voies de transmission incluent la voie sanguine, par transfusion de sang contaminé, partages ou réutilisation des seringues et aiguilles contaminés et de la mère à l'enfant pendant la grossesse, l'accouchement ou l'allaitement.

On estime à 38 millions le nombre de personnes infectées actuellement et 690 000 morts par an. Ayant fait plus de 37 millions de victimes en 37 ans, la pandémie VIH/SIDA reste un problème de santé publique mondial majeur car, malgré l'introduction des ARVs qui a diminué significativement la mortalité liée au VIH ainsi que le nombre de contaminations, cette thérapie ne permet pas une guérison des individus infectés. De plus, la pandémie COVID-19 pourrait avoir un impact majeur dans les pays en développement sur l'approvisionnement des ARV. Il est estimé qu'une interruption de six mois du traitement du VIH pourrait entraîner plus de 500 000 décès supplémentaires.

Pour contrôler l'infection par le VIH et, à terme, y mettre fin au niveau mondial, nous avons besoin non seulement des ARV mais aussi d'un vaccin accessible à tous. Les vaccins ont toujours été le moyen le plus efficace et de moindre coût pour prévenir les maladies infectieuses, voire de les éradiquer. À l'instar des vaccins contre la variole et la polio, un vaccin préventif contre le VIH pourrait contribuer à sauver des millions de vies. Le candidat vaccin que nous proposons d'évaluer dans notre étude a pour but de stimuler une réponse immune protectrice combinant une activation optimale des lymphocytes T CD4 folliculaires (Tfh) et des lymphocytes B responsables de la génération d'anticorps neutralisant le virus. Notre stratégie vaccinale (α LC. Env) a pour but de cibler l'antigène du virus VIH (Env) vers les cellules de Langerhans (LC). Les LCs constituent la première ligne de défense de notre peau et de nos muqueuses et sont capables de détecter et prendre en charge l'antigène vaccin pour activer les Tfh et les lymphocytes B.

Notre hypothèse principale est que la voie d'administration du vaccin est importante pour cibler les LCs et entraîner une immunité protectrice optimale. Pour la validation de cette hypothèse, nous comparerons différentes voies d'immunisation dont la voie cutanée, la voie intramusculaire mais aussi les voies vaginale et rectale et nous réaliserons une étude intégrative des réponses immunitaires induites. Seul le modèle in vivo permettra de vérifier la validité du concept car les modèles in vitro ne tiennent pas compte de la complexité du système immunitaire et des barrières physiologiques d'un mammifère. Afin de faire une preuve de principe de l'efficacité de notre vaccin (α LC. Env), le modèle animal murin sera privilégié avant le primates. Nous testerons l'impact des différentes voies d'administration et compositions vaccinales sur la génération de la réponse immunitaire in vivo au cours du temps.

De nombreuses études menées auparavant dans ce contexte permettent de proposer la mise en place d'expérimentations sur un nombre limité de cohortes, avec une réduction du nombre d'animaux utilisés au strict minimum. Ainsi, 4 expériences sont prévues comprenant 2 différentes lignées de souris génétiquement modifiées dans le compartiment immunitaire et 1 lignée souris contrôle. Les premières expériences auront pour but la sélection de la dose d' α LC. Env et de l'adjuvant pour la meilleure immunogénicité. Une fois la formulation choisie, une analyse des réponses immunitaires mémoires sera évaluée au cours du temps après différents modes d'immunisation. Enfin, cette formulation sera comparée au prototype vaccin VIH à vecteur viral (MVA. Env).

Les expériences sont conçues dans le respect des règles des 3R, avec les stratégies suivantes :

- Remplacement : Le but d'un vaccin est de stimuler le système immunitaire afin de déclencher une réponse immunitaire efficace contre l'agent pathogène d'intérêt. Les méthodes disponibles in vitro ne permettent pas de prendre en considération les barrières pharmacologiques et métaboliques auxquels ils sont soumis. Il est nécessaire d'utiliser un modèle in vivo afin de tenir compte de toute la complexité des tissus immunisés et d'avoir toute la chaîne de mise en place de la réponse immunitaire à savoir la réponse innée dans le tissu puis la réponse adaptative dans les organes lymphoïdes drainant qui permettront la mémoire immunitaire nécessaire pour un vaccin efficace.

- Réduction: Une planification statistique préalable a permis de réduire le nombre d'animaux tout en préservant la validité statistique des essais vaccinaux. Chaque groupe de souris comprendra 6 animaux. Au total, notre projet utilisera 4752 animaux (souris).

- Raffinement :

a. Différents méthodes d'immunisation non ou peu invasives ;

b. Suivi des signes de souffrance ou douleur, et des actions adaptées selon l'analyse clinique, (p. ex. l'utilisation d'analgésique et anti-inflammatoire) ;

c. Anesthésie locale ou systémique lors des interventions considérées comme invasives ;

d. Utilisation des méthodes les moins douloureuses de prélèvement sanguin

Le projet offre une occasion unique de renforcer et de poursuivre les approches de ciblage des DC pour prévenir ou guérir l'infection par le VIH-1.

18138 Le but du programme est de mesurer la consommation et les comportements alimentaires des trois populations de canard (Barbarie, Pékin, mulard), indifféremment désignées comme « canard gras », intervenant dans la production de foie gras, afin d'évaluer la faisabilité d'une sélection de canards répondant mieux au gavage.

Contexte :

En France, le foie gras est produit à 95% à partir de canard mulard mâle. Il est issu du croisement entre une cane de race Pékin et un canard de Barbarie. Le mulard est un animal stérile. Par conséquent les programmes de sélection visant à améliorer la quantité et la qualité du foie gras portent sur les deux populations parentales. En pratique, la sélection repose sur le testage sur descendance pour estimer l'aptitude des Barbaries et des Pékins à produire des mulards performants en quantité et qualité des foies gras. C'est un processus long et d'efficacité modérée. Des critères pertinents mesurés directement sur les animaux candidats à la sélection permettraient une sélection plus efficace. Par ailleurs, comme pour de nombreux animaux de production, l'alimentation représente les deux tiers du coût de production d'un canard gras. Ainsi, l'amélioration de l'efficacité alimentaire (capacité à valoriser l'aliment) est un des enjeux majeurs de la sélection, pour lequel une mesure précise de la consommation est requise. Comme souvent en recherche, la mise au point d'appareils de mesure de la consommation individuelle a permis de lever un verrou mais a également mis en évidence une variabilité des comportements alimentaires, et ouvert la voie vers d'autres investigations.

Objectifs :

Nous souhaitons, par ce programme, investiguer la faisabilité d'une sélection pour le foie gras basée sur des nouvelles données de comportement alimentaire. On entend par comportements

alimentaires l'ensemble de caractères descriptifs tels que le nombre et la durée des repas, la vitesse d'ingestion ou encore le temps consacré à l'alimentation. Pour cela nous utilisons des mangeoires électroniques (Distributeurs Automatiques de Concentré ou DAC) qui enregistrent chaque visite, pèsent l'animal et calculent la consommation d'aliment. Ces prototypes permettent la mesure de la consommation sur des animaux élevés au sol en groupe qui peuvent interagir entre eux. Ils se substituent aux cages individuelles autrefois utilisées pour mesurer la consommation, tout en permettant aux animaux d'exprimer les comportements sociaux observés sur le terrain.

Cinq procédures expérimentales seront mises en œuvre au cours du prolongement du projet (une première version ayant déjà été approuvée par le Ministère). Sauf mention contraire ces procédures concernent tous les animaux à l'exception des canes de Barbarie.

- La pose d'une puce électronique à la base du cou permettant la détection et l'identification de l'animal ainsi que l'enregistrement de sa consommation par le dispositif.

- Une estimation de l'adiposité des animaux afin de corriger la consommation dans les analyses statistiques qui estiment l'efficacité alimentaire. La procédure est non invasive et se traduit par une contention douce d'environ 5 min dans une chambre où l'on mesure la conductivité électromagnétique.

- Pour 130 animaux mulards une alternative à la conductivité électromagnétique sera testée avec l'interprétation des images échographiques obtenues en appliquant une sonde externe au niveau de l'abdomen et des muscles pectoraux. Cette mesure aura lieu à la fin du contrôle de la consommation et juste avant l'abattage.

- Une prise de sang permettant l'analyse de la composition du plasma des animaux lors de la mise en gavage. La même analyse étant menée ensuite sur du matériel recueilli sur la chaîne d'abattage après mise à mort. Cela concerne les mulards et Barbaries mâles. Le but est de relier cette composition plasmatique avec la production de foie gras.

- L'alimentation forcée (gavage de 23 repas pour les mulards et 25 pour les Barbaries mâles), en se calant sur la pratique agricole courante.

Dispositif animal :

Cette saisine concerne un supplément d'effectif par rapport à une saisine initialement approuvée pour un projet de 1760 animaux. Le confinement imposé par la pandémie COVID-19 en 2020 nous a empêchés de pratiquer les mesures initialement prévues. Nous avons prévu de produire et élever 560 animaux Pékin des deux sexes (2 fois 280), 190 mâles Barbarie et 250 mâles mulards.

Cette saisine concerne donc 1000 animaux.

Respect des 3 R's :

- Le juste dimensionnement (Réduction) a été réfléchi après avoir évalué les propriétés statistiques des paramètres génétiques estimés en fonction des effectifs mesurés. Par ailleurs le recul acquis avant l'interruption du programme nous a permis de mieux apprécier le nombre d'animaux permettant un déroulement optimal de l'expérimentation (fonctionnement des DAC) afin de s'assurer de la puissance statistique du dispositif.

- Le remplacement n'est pas possible. Il n'existe pas de modèle biologique alternatif permettant de prédire la production de foie gras

- Le raffinement se manifeste ici dans la mesure au sol et en groupe de la consommation d'aliments, préférée à une mesure en cage individuelle et avec une densité permettant l'expression des comportements sociaux. Les mesures (essentiels) de l'adiposité de l'animal sont non invasives et effectuées par un personnel aguerris.

18139 Les plaquettes sanguines sont de petites cellules dépourvues de noyau qui circulent dans le sang. Elles sont des acteurs essentiels du maintien de l'intégrité vasculaire. Elles sont les premiers éléments cellulaires à intervenir dans l'arrêt du saignement lors d'une blessure vasculaire par la formation d'un clou plaquettaire via des mécanismes d'adhésion, de sécrétion et d'agrégation, trois étapes majeures de l'hémostase physiologique. En revanche, lors d'une situation pathologique, elles peuvent amener à l'occlusion des vaisseaux sanguins (thrombose), entraînant par conséquent

des pathologies ischémiques graves comme l'infarctus du myocarde ou l'accident vasculaire cérébral, qui représentent la première cause de mortalité dans le monde. Comprendre les mécanismes qui régulent l'adhésion et l'activation des plaquettes permettrait d'identifier de nouvelles cibles anti-thrombotiques.

Les facteurs qui contribuent à la régulation de ces mécanismes sont nombreux et interconnectés. Une famille de protéines, les tyrosines phosphatases (PTPs) regroupent un ensemble d'enzymes qui diffèrent dans leurs fonctions et leurs localisations. Certaines interviennent dans la transmission de signaux de nombreux récepteurs de surface vers l'intérieur de la plaquette et sont ainsi impliquées dans les mécanismes d'adaptation de l'activation cellulaire. De plus, certains déficits génétiques spontanés ou induits ont permis de révéler le rôle majeur joué par les PTPs dans le contrôle de l'homéostasie cellulaire.

Le but de notre étude est d'étudier l'impact de la perte de ces enzymes sur les fonctions plaquettaires et plus particulièrement dans les fonctions, d'adhérence et d'activation des plaquettes in vitro et in vivo, notamment dans des processus complexes et intégrés que sont la thrombose, l'hémostase ou encore l'intégrité vasculaire.

Pour réaliser ces études, nous utiliserons des lignées de souris déficientes pour ces enzymes. L'absence de ces enzymes n'est pas délétère pour les souris et n'est pas décrit pour avoir des répercussions néfastes sur leur qualité de vie. Les expériences consisteront d'une part en des prélèvements de sang pour réaliser des mesures ex vivo et d'autre part en l'observation in vivo en temps réel de la formation du thrombus dans différents modèles de thrombose in vivo.

Un autre aspect du projet sera également de tester des composés agissant directement ou indirectement sur la phosphatase, sur les fonctions plaquettaires. Pour cela, des souris non mutées seront traitées avec plusieurs inhibiteurs afin de déterminer leur effet sur les fonctions plaquettaires.

Nous serons attentifs à être en adéquation avec la règle des 3R.

Remplacer Les plaquettes ne possédant pas de noyau, elles ne sont pas manipulables génétiquement et ne peuvent pas être cultivées, empêchant ainsi tout modèle reposant sur la culture cellulaire. C'est pour cela que l'utilisation d'animaux est incontournable pour réaliser ces études.

Réduire Nous maîtrisons l'ensemble des techniques utilisées, ainsi nous n'avons pas besoin d'utiliser des animaux dans des manipulations de mise au point. De plus pour limiter le nombre total d'animaux nécessaires à notre recherche, nous préleverons à la fin des procédures les tissus des animaux pour obtenir des données supplémentaires ex-vivo. Le nombre d'animaux utilisés lors de cette étude est réduit au minimum, ce nombre étant fixé à 16 souris/groupe au maximum pour l'obtention des résultats statistiquement significatifs.

Raffiner Une attention particulière est portée au bien-être des animaux en particulier par un enrichissement de leur milieu de vie qui leur permet d'assouvir les comportements liés à leur espèce. Au cours des procédures, des traitements de prévention de la douleur et des anesthésies adaptées sont appliqués. L'utilisation de modèles d'animaux a été établie en raffinant au maximum les conditions de travail, afin de limiter leur angoisse, stress et douleur lors des manipulations. Pour ce faire, des points limites ont été établis pour les procédures décrites. Ces points limites permettront de soustraire l'animal aux procédures expérimentales permettant de limiter la souffrance et l'inconfort de l'animal.

Pour chaque procédure, les animaux sont anesthésiés, maintenus à une température de 37°C par l'utilisation d'une plaque chauffante (tout au long de la procédure) et un traitement approprié contre la douleur leur est administré. De plus, pendant toutes les expérimentations, les animaux sont surveillés par du personnel entraîné.

Cette étude nécessitera l'utilisation de 1692 souris.

18140 Aujourd'hui, il y a une tendance dans les populations humaines occidentalisées à avancer la fin de l'allaitement (sevrage) du nourrisson ce qui pourrait avoir un impact direct sur la santé du nouveau-né. La fin de l'allaitement résulte soit d'un choix des mères, soit d'une impossibilité physiologique (maladie, fatigue ou blessure). Dans tous les cas, qu'il y ait un sevrage plus précoce ou non, ces

périodes post-natales peuvent requérir un accompagnement des mères et des nourissons. L'allaitement et le sevrage conditionnent l'empreinte microbienne maternelle, ce qui est crucial et a un impact sur le schéma de colonisation microbienne chez le nouveau-né (primocolonisation). Le microbiote intestinal est une communauté de microorganismes (bactéries, champignons, virus, etc.) hébergée par l'hôte et dynamique. Cette communauté est influencée par de multiples facteurs tout au long de la vie d'un individu. La transmission du microbiote par la mère est le facteur le plus important qui conditionne la primocolonisation.

Au cours du développement précoce du nouveau-né, des perturbations dans les interactions entre le microbiote et l'hôte pourraient nuire de manière irréversible et durable à la maturation du système immunitaire, prédisposant l'hôte à développer des maladies inflammatoires et à une altération de la fonction de la barrière intestinale. Cette barrière,

composée par des éléments physiques, biochimiques et immunitaires élaborés par la muqueuse intestinale, a un rôle double : d'une part, elle est semi-perméable car elle permet des phénomènes tels que l'assimilation des nutriments mais d'autre part, elle sépare le milieu extérieur du milieu intérieur et garde notamment les agents pathogènes hors du corps de l'hôte. Par ailleurs, chez l'humain, le sevrage précoce est associé à certaines maladies inflammatoires et immunitaires. En conséquence, des interventions ciblées au tout début de la vie pourraient constituer des stratégies faciles à mettre en œuvre pour compenser les perturbations du microbiote dues à un sevrage précoce.

Dans ce projet, nous nous proposons d'étudier l'influence d'une stratégie nutritionnelle dans la mise en place d'un microbiote intestinal dont la composition favorise le maintien en bonne santé dans un modèle souris de sevrage précoce. Les phénomènes observés chez les souriceaux présentent une bonne similarité avec ceux observés chez les nouveau-nés humains pour ce qui concerne les altérations précoces du microbiote intestinal comme celles attendues lors d'un sevrage précoce. En effet, nous savons déjà que dans le cas de souriceaux nés par césarienne, on retrouve des perturbations du microbiote semblables à celles observées chez des bébés humains nés par césarienne également.

Dans un premier temps, nous évaluerons l'impact du sevrage précoce chez les souriceaux. Dans un deuxième temps, nous donnerons à des souris gestantes une supplémentation par un probiotique qui sera administré par gavage et/ou un prébiotique présent dans l'aliment des souriceaux. Nous évaluerons l'impact de la supplémentation sur le lait maternel, sur la composition du microbiote intestinal maternel et chez les souriceaux. Chez les souriceaux, nous observerons notamment l'inflammation intestinale (dosages sanguins et réponse immunitaire) et également la composition du microbiote intestinal. Ces paramètres nous sont accessibles par des interventions simples et faiblement douloureuses ou stressantes : prises de sang, récupération de lait maternel sous anesthésie et de fèces.

Enfin, dans les deux parties, le protocole de sevrage précoce sera répété après une génération sans intervention pour analyser si le sevrage précoce a des impacts trans-générationnels.

Nous utiliserons au maximum 536 animaux en expérimentation au cours de ce projet (mères et souriceaux compris), soit environ une centaine par an pendant 5 ans.

Ces travaux nécessitent l'utilisation d'animaux vivants car les phénomènes ciblés (développement de l'intestin, inflammation intestinale, variation de composition du microbiote) ne peuvent pas être étudiés par des méthodes de substitution. Pour toutes les procédures expérimentales, nous avons calculé le nombre minimal de souris requis afin d'aboutir à des données analysables par méthodes statistiques. Nous améliorons le bien-être des animaux via un enrichissement apporté dans les cages (fourniture de cellulose permettant la construction de nids par les animaux, bâtons à ronger), l'hébergement en cages collectives, la prise en charge de la douleur si nécessaire. Nourriture et eau sont accessibles en permanence. Nos procédures sont faiblement invasives et de courtes durées (1 mois maximum).

Les animaux sont observés quotidiennement. Par ailleurs, des critères d'arrêt ont été définis (perte de poids pour les mères, absence de gain de poids pour les petits, immobilité). Nous espérons que

ces travaux permettront d'établir les bases de recommandations nutritionnelles pour des enfants ne pouvant pas bénéficier d'un allaitement maternel.

18141 Ce projet s'inscrit dans le cadre de la recherche sur le diabète, pathologie qui se caractérise par une élévation anormale du taux de glucose dans le sang. La régulation du glucose chez les mammifères est contrôlée principalement par l'insuline. La production de cette hormone à un niveau adéquat en fonction des demandes de l'organisme est assurée par deux mécanismes adaptatifs majeurs : la régulation de la sécrétion des cellules β et celle du nombre de ces cellules. A l'heure actuelle, essayer de restaurer une quantité suffisante de cellules β fonctionnelles représente une stratégie nouvelle et prometteuse pour le traitement du diabète, notamment le diabète de type 2 (carence partielle en cellules β).

Des effets prometteurs d'agents pharmacologiques particuliers ont été rapportés dans des études, sur la régulation du métabolisme du glucose, en particulier sur les réponses insulinosécrétoires des cellules β pancréatiques. Par ailleurs, il existe un effet de ces agents pharmacologiques à long terme impliquant la prolifération cellulaire, la différenciation, le développement et la régénération de certains tissus notamment nerveux et hépatiques.

Comme les cellules β pancréatiques conservent une capacité de régénération dans un contexte de déficience cellulaire, le but de notre projet est donc d'aborder plus précisément, par une étude in vivo sur des modèles animaux de diabète, l'impact d'un traitement précoce par ces agents pharmacologiques, sur la masse des cellules β du pancréas endocrine et son effet éventuel sur le développement du diabète.

Notre étude sera menée sur un total de 170 rats pendant une période de 2 ans, dans le respect de la règle des '3R':

- Réduire : les différentes procédures expérimentales ont été consciencieusement pensées et élaborées afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en permettant d'obtenir des résultats statistiquement satisfaisants.
- Raffiner : l'ensemble des procédures de ce projet vise à concilier une interprétation fiable des résultats et le respect du bien-être animal. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation.
- Remplacer: Notre projet correspond à un travail de physiologie intégrée qui permettra de comprendre le rôle ces agents pharmacologiques sur le développement et la croissance du pancréas endocrine, et aujourd'hui, aucun modèle in vitro ne permet de reproduire ce développement.

18142 Dans le contexte de réduire l'utilisation d'antibiotiques en clinique et afin de limiter l'émergence de la résistance bactérienne, le développement de stratégies thérapeutiques alternatives est fortement encouragé. C'est dans cette optique que certaines entreprises développent de nouveaux composés dotés d'action antimicrobienne. Parmi eux, le composé GL-117 une petite molécule chimique présentant une activité in vitro anti bactérienne intéressante contre les pathogènes gram négatifs tels que E. coli. Afin de compléter la caractérisation clinique de ce composé, des études de toxicité et d'efficacité chez le rongeur sont indispensables.

Cette étude s'articulera autour de deux axes :

1- Phase de toxicité qui permettra de déterminer la dose maximale du composé GL-117 tolérée par l'animal.

2- Phase d'efficacité permettant d'évaluer l'activité antimicrobienne du composé GL-117 (à différentes concentrations) dans un modèle d'infection bactérienne aiguë (septicémie) à E. coli par rapport à la ciprofloxacine, antibiotique de référence.

143 souris CD1 (45 pour la phase 1 et 98 pour la phase 2 de l'étude) sont nécessaires pour la mise en œuvre de ce projet.

Dans le cadre de cette étude, une attention particulière sera portée au respect de la règle des 3R.

Le nombre d'animaux nécessaire pour répondre aux hypothèses et permettre une analyse statistique robuste a été réduit à 5 (pour la phase 1, au lieu de 10) grâce à l'expérience acquise lors d'études précédentes.

Pour la phase 2, 6 animaux (au lieu de 10) pour la validation de l'inoculum seront nécessaires. Cependant, pour évaluer l'efficacité du composé GL-117 par rapport à la ciprofloxacine, des groupes de 10 souris seront indispensables. Aussi, la phase 1 de cette étude permettra de cibler efficacement deux concentrations du composé à évaluer en phase 2.

Des analyses in vitro ont déjà été réalisées sur l'efficacité de cette molécule GL-117. Toutefois l'efficacité de tels composés ne peut être confirmée que dans des modèles pré-cliniques, c'est pourquoi aucune stratégie de remplacement ne peut être envisagée.

Enfin, un enrichissement du milieu (jouets en plastique, igloos en carton) sera utilisé et une surveillance accrue (deux à trois fois par jour) sera également réalisée pour cette étude (raffinement). D'une façon générale pour l'ensemble de l'étude, la prise d'anti-inflammatoires est contre indiquée du fait de l'interaction reconnue avec les modulateurs de l'inflammation, ce qui risquerait même de faire flamber l'infection.

18143 Les désordres vestibulaires sont des pathologies liées en premier lieu à des atteintes de l'oreille interne. Ces pathologies se caractérisent par des sensations de vertige, des déficits posturo-locomoteurs pouvant conduire à des chutes, des mouvements incontrôlés de l'œil, ainsi que des altérations cognitives et sont souvent accompagnés de nausées et de vomissements. Ces symptômes peuvent avoir des causes multiples, tels que des accidents vasculaires cérébraux, des infections ou des traumatismes de l'oreille, ou encore des atteintes ototoxiques (composés toxiques pour l'oreille). Ils peuvent aussi résulter tout simplement du vieillissement normal de l'oreille interne. Les désordres vestibulaires représentent 3 % de l'ensemble des pathologies chez les plus de 50 ans et près de 1 % des urgences hospitalières en France. La prise en charge thérapeutique des désordres vestibulaires associe approches pharmacologiques et traitements par physiothérapie. Néanmoins les solutions pharmacologiques restent peu efficaces par manque de spécificité.

Notre projet propose de tester chez le rongeur, le potentiel bénéfique de composés pharmacologiques sur les déficits posturo-locomoteurs et/ou cognitifs induits par une atteinte vestibulaire suite à l'administration transtympanique de composés ototoxiques ou inflammatoires.

Ce projet couvre au total l'utilisation de 19480 rongeurs sur 5 années dont 13800 rats et 5680 souris nécessaire pour atteindre les objectifs scientifiques dans deux procédures expérimentales en vue d'évaluer l'effet antivertigineux des futurs candidats médicaments et leurs mécanismes d'action au bénéfice des patients. Ce projet ne peut être effectué que sur animal vivant vu la nécessité d'induire les syndromes de la pathologie vestibulaire sur un organisme physiologique entier afin de pouvoir évaluer l'efficacité et le mode d'action des potentiels candidats médicaments. Une analyse des données bibliographiques et/ou des études préliminaires in vitro seront menées pour mieux cibler les composés pharmacologiques à tester et donc réduire le nombre d'animaux à utiliser dans le cadre de ce projet.

Les études réalisées au sein de l'établissement, par du personnel formé et compétent, sont encadrées par des recommandations internes, incorporant tous les aspects en lien avec le recours à l'utilisation d'animaux à des fins scientifiques (éthique, hébergement, soins, manipulation, expérimentations ...), et ayant pour objectif de prévenir toute douleur, inconfort ou détresse chez l'animal (par l'utilisation d'anesthésiques). Une période d'acclimatation au nouvel environnement est respectée avant le début des manipulations ainsi qu'une période d'habituation aux expérimentateurs et aux gestes techniques permettant ainsi de réduire tout stress ou angoisse chez l'animal. Tenant compte des publications scientifiques et de nos données historiques, le nombre d'animaux prévu est réduit au strict nécessaire. Tous ces éléments assurent l'application maximale du principe des 3R.

Les données recueillies au cours de ce projet serviront de base aux études précliniques réglementaires qui conditionneront un éventuel passage en clinique d'un futur candidat médicament pour traiter les symptômes des désordres vestibulaires chez l'Homme.

18144 Les smolts sont les juvéniles de saumon âgés de 1 à 2 ans, prêts à descendre la rivière pour aller grossir en mer. Ils rencontrent un certain nombre de difficultés sur leur parcours de migration vers la mer, plus ou moins importantes en fonction du cours d'eau. Le projet vise à étudier la dévalaison de smolts sur un linéaire de 91 km d'un cours d'eau moyen en aval des zones de reproduction.

Ce cours d'eau fait l'objet depuis une trentaine d'années d'un plan de restauration du saumon atlantique disparu du bassin dans les années 1900 du fait de l'édification de grands barrages hydroélectriques. Un plan de restauration a permis le retour du saumon mais la reproduction sur les zones de frayères est très faible. Le défaut de continuité écologique tant à la montaison qu'à la dévalaison, alors même qu'il est classé au titre de l'article L. 214-11 du code de l'environnement imposant d'établir la libre circulation des poissons et des sédiments, freine cette restauration.

En 2019, un premier suivi de 100 smolts en dévalaison a abouti à une perte de près de 95 % des individus à l'aval de l'axe. Une seconde année de suivi est nécessaire afin de conforter ces résultats. L'objectif est de valider et de préciser les résultats obtenus en 2019 concernant la perte totale qui surviendrait sur ce linéaire mais également identifier les principaux secteurs de pertes afin de prioriser la restauration. Ces données pourraient également permettre la mise en place des mesures temporaires d'évitement des turbines dans l'attente de l'aménagement de l'ensemble des usines hydroélectriques.

La technique de télémétrie choisie est le radiopistage. L'objectif est d'équiper 100 smolts d'émetteurs radio et de suivre leur dévalaison entre début avril et fin mai. La population de saumons étant très faible dans le cours d'eau étudié et afin de réduire l'impact environnemental, les juvéniles de saumons marqués seront issus d'une pisciculture. Deux marquages et lâchers seront réalisés en deux lieux différents : l'un de 50 individus en amont immédiat du linéaire étudié, l'autre de 50 individus également à mi-parcours afin de garantir des données suffisantes sur l'ensemble du linéaire d'étude. Afin d'éviter de marquer des poissons affaiblis ou trop petits, il est prévu une marge de 50 poissons. Ainsi, 75 smolts seront transportés sur chaque lieu de marquage et lâcher à une semaine environ d'intervalle. Un total de 150 individus participera à l'étude.

Les individus seront transportés jusqu'au premier lieu de marquage par camion équipé d'un système d'oxygénation adapté. Sur le lieu de marquage, les poissons seront acclimatés à la température de l'eau du cours d'eau étudié par adjonction d'eau de la rivière. La température des cuves et du cours d'eau sera régulièrement contrôlée. Les poissons seront prélevés un par un dans une cuve afin de procéder au marquage. Chaque poisson sera anesthésié dans un bain contenant du produit anesthésiant selon un dosage adapté. Il sera ensuite mesuré et pesé. Le dosage utilisé pour l'anesthésie des poissons doit permettre d'éviter la souffrance et le stress. L'expérience montre que la manipulation comprenant la biométrie et le marquage intra-gastrique dure en général moins d'1 minute et un maximum de 2 minutes. Le marquage se fera par implantation de l'émetteur dans la cavité stomacale, en maintenant le poisson dans le bain anesthésiant.

Chaque poisson marqué sera transféré, sans épuisement, dans un bac de réveil afin d'observer son comportement. Après réveil, il sera transféré dans un bassin alimenté par l'eau de la rivière afin d'observer son comportement pendant un laps de temps minimum de 4 heures. Les poissons qui n'auront pas été marqués seront transférés dans un vivier placé dans la rivière. L'ensemble des individus sera ensuite libéré dans le cours d'eau juste avant ou pendant le coucher du soleil, soit entre 19h30 et 20h30.

Cette procédure sera renouvelée de la même façon pour le second marquage environ une semaine plus tard.

Le marquage des smolts interviendra la première quinzaine d'avril, période située dans la fenêtre naturelle de dévalaison des smolts. Le linéaire étudié sera couvert par la pose de 16 récepteurs fixes installés la plupart du temps au droit d'ouvrages. Ce suivi sera complété par un suivi mobile à pieds, en voiture et en canoë.

Remplacer :

L'étude vise la perte de juvéniles de saumon lors de leur dévalaison. Il est donc indispensable de recourir à des individus de l'espèce et du stade visés (smolt de saumon atlantique) afin d'obtenir des données pertinentes.

Réduction :

150 animaux seront utilisés. Ce nombre correspond à deux lâchers de 50 poissons plus 50 poissons permettant de faire un choix parmi les smolts à marquer (taille, blessures...). Un total de 100 poissons sera donc marqué afin de recueillir suffisamment de données pour obtenir des résultats fiables. Une première année d'étude ayant montré qu'une perte importante (95%) intervient tout au long du parcours, les effectifs ne peuvent pas être réduits sous peine de fragiliser la robustesse des résultats.

Raffinement :

Le marquage choisi est l'insertion intra gastrique. Ce type de marquage permet de réduire la souffrance en évitant une intervention chirurgicale puisqu'il ne génère pas d'incision donc de blessure. Le recours à une anesthésie adaptée permet de manipuler le poisson sans risque pour celui-ci et de diminuer son stress. Un soin particulier sera apporté au raffinement dans toutes les étapes de la procédure :

- acclimatation à l'eau de la rivière (contrôle de la température de l'eau des cuves en comparaison avec celle de la rivière),
- contrôle de l'oxygène,
- tri des poissons afin de ne pas marquer des poissons faibles ou petits,
- épuisement réduit pour limiter les risques de pertes d'écaillés,
- bac de réveil pour observer le comportement du poisson marqué avant transfert, dans un bassin alimenté par l'eau de la rivière,
- contrôle en continu de la température de l'eau dans les cuves et dans le bain anesthésiant,
- surveillance des animaux pendant un minimum de 4 heures avant le lâcher.

Le lâcher des poissons est réalisé au crépuscule, les smolts ayant préférentiellement une activité de dévalaison nocturne en milieu naturel.

18145 Les glomérulonéphrites rapidement progressives (GNRP) représentent un syndrome clinique rare qui peut conduire à une destruction des reins. Diverses maladies telle que le lupus ou d'autres pathologies auto-immunes peuvent causer une GNRP. D'un point de vue histologique, elles sont caractérisées par une prolifération cellulaire excessive qui va progressivement détruire les reins aboutir à une insuffisance rénale avec présence de protéines dans les urines. Elles nécessitent en urgence un traitement immunosuppresseur, voire des échanges plasmatiques. La GNRP est donc une urgence diagnostique et thérapeutique qui doit être reconnue et référée rapidement au néphrologue. Malheureusement les thérapies à notre disposition sont limitées et consistent en l'administration de fortes doses de molécules cytotoxiques (chimiothérapie). Des données préliminaires suggèrent qu'une voie de signalisation intracellulaire est anormalement activée dans les cellules rénales au cours de la GNRP. Nous souhaitons étudier cela dans différents modèles murins de GNRP afin de valider cette nouvelle cible thérapeutique potentielle pour les patients. Nous créerons une nouvelle lignée de souris qui devrait être protégée de la progression de la maladie rénale. Nous testerons une molécule inhibitrice de cette voie de signalisation qui s'administre par voie orale.

Le nombre d'animaux est justifié par la nécessité d'atteindre des résultats statistiquement significatifs.

Nous appliquerons la règle des "3R" avec:

1-le nombre minimal d'animaux pour avoir la puissance statistique (n=360),

2-Dans un contexte de recherche physiopathologique, l'expérimentation animale ne peut en aucun cas être remplacée par des expériences in vitro, où les cellules sont sorties de leur environnement.

3-En raison du phénotype dommageable potentiel, les animaux seront attentivement surveillés, des points limites seront établis et des antalgiques administrés si besoin. Certains points limites entraîneront l'interruption de la procédure et la mise à mort de l'animal.

Ce projet d'une durée de 5 années permettra d'améliorer la connaissance et très certainement le traitement des maladies rénales chroniques.

18146 Les reins permettent l'élimination des déchets de l'organisme en assurant la filtration du sang et la production de l'urine au niveau de structures appelées glomérules. De nombreuses maladies peuvent toucher les glomérules et entraînent généralement une dysfonction rénale conduisant à l'apparition de protéines dans les urines (protéinurie) normalement absente en cas de bon fonctionnement de l'organe. A l'extrême, cette protéinurie peut elle-même aggraver les lésions rénales et aboutir à la destruction de l'ensemble du rein.

La hyalinose segmentaire et focale (HSF) et la glomérulonéphrite extracapillaire à croissant (GNEC) sont deux pathologies qui, malgré des origines différentes, conduisent au même remodelage délétère altérant le bon fonctionnement des glomérules. Dans ces deux pathologies, certaines cellules du glomérule, appelées cellules épithéliales pariétales, se mettent à proliférer et migrer de façon anarchique jusqu'à entraîner la destruction complète des glomérules conduisant à relativement court terme, à une insuffisance rénale terminale. Cependant les mécanismes physiopathologiques à l'origine du recrutement des cellules pariétales épithéliales ne sont que partiellement connus.

Afin d'étudier le rôle du récepteur sérotoninergique appelé 5HT2B dans la prolifération et la migration des cellules épithéliales pariétales au cours de pathologies "glomérulo-prolifératives", nous utiliserons différents modèles de souris génétiquement modifiées qui exprimeront ou non, ce récepteur. Ces souris ne présentent pas de phénotype dommageable à l'état basal. Nous chercherons également à valider in vivo des cibles thérapeutiques préalablement identifiées par des études in vitro. Nous testerons dans nos modèles murins les effets de différentes molécules stimulant ou au contraire bloquant le récepteur 5HT2B.

Nous utiliserons deux modèles murins des pathologies étudiées. Le modèle DOCA-salt consiste à implanter sous la peau une pastille délivrant des corticoïdes chez des souris ayant préalablement subi l'ablation d'un rein. Ce modèle permet d'induire une hypertension artérielle provoquant un stress glomérulaire important à l'origine de lésions rénales de type HSF. L'hypertension artérielle sera suivie tout au long des expériences par des mesures de pressions artérielles bihebdomadaires. Le modèle anti-NTS consiste en l'injection d'un sérum néphrotoxique induisant une réaction inflammatoire majeure à l'origine de lésions glomérulaires semblables à celles de la GNEC humaine. De plus, les souris, comme les patients atteints de GNEC, ne présentent pas de douleur néphrotique. La fonction rénale sera suivie tout au long des expériences par des prélèvements d'urines en cages métaboliques. Un prélèvement de sang sera réalisé juste avant la mise à mort pour la réalisation de dosages biochimiques.

L'insuffisance rénale est une maladie complexe. Seule l'expérimentation animale, résumant l'ensemble des interactions cellulaires au sein du rein dans un organisme vivant, permettra d'étudier les mécanismes impliqués dans la destruction glomérulaire. La souris est un modèle de choix car son architecture et sa physiologie rénale sont proches de celles connues chez l'homme. Par ailleurs, le fait de pouvoir modifier les gènes de la souris en utilisant la transgénèse est un vrai atout. Ce programme de recherche est développé dans le respect des règles éthiques des 3R:

1/ Remplacement : La culture cellulaire nous permet de tester nos hypothèses mécanistiques mais la complexité du rein et de la maladie rénale nécessite l'utilisation d'un modèle animale.

2/ Réduction : Nous utiliserons le nombre minimum d'animaux requis pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et atteindre l'objectif scientifique du projet.

3/ Raffinement : Afin de prévenir au maximum la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux, les procédures se dérouleront avec une surveillance régulière et des antalgiques sont prévus en cas de nécessité. Enfin, des points limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire. Les actes chirurgicaux seront réalisés sous anesthésie générale.

Ce projet s'inscrit sur une durée de 5ans. Le nombre de souris utilisés sera de maximum : 2830.

A terme, les résultats de ce projet permettront de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques de la destruction des glomérules dans l'HSF et la GNEC. Ils pourraient

également permettre l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et ainsi aboutir à une meilleure prise en charge des patients atteints par ces pathologies.

18147 L'objectif de ce projet est de tester l'implication de mutations candidates identifiées chez des patients atteints de troubles de développement des parties postérieures du cerveau, le cervelet et le tronc cérébral. Ce projet s'intéresse d'une part à des malformations congénitales marquées de ces structures, apparaissant très tôt au cours de la vie fœtale. Celles-ci ont des effets dévastateurs, car elles touchent plusieurs régions et perturbent des fonctions vitales, telles que la déglutition et la respiration. D'autre part, ce projet étudiera des mutations impliquées dans l'ataxie cérébelleuse précoce, suspectée d'être liée à une dégénérescence des neurones au cours de la vie infantile. Grâce aux avancées technologiques dans le séquençage systématique des génomes de familles touchées, de nouvelles mutations candidates sont régulièrement identifiées chez des patients. Cependant lorsqu'une mutation génétique est suspectée, un important travail reste à accomplir pour démontrer son implication dans la maladie et valider ainsi le diagnostic génétique. Par ailleurs, des travaux expérimentaux sont nécessaires pour comprendre comment elle peut conduire aux malformations observées, et à terme ouvrir des perspectives thérapeutiques, actuellement quasiment inexistantes. Le développement du cerveau, organe extrêmement structuré et composé de multiples types cellulaires interconnectés, est un processus complexe. De ce fait, il est pour le moment impossible de le modéliser parfaitement *in vitro*, et le recours à l'expérimentation animale *in vivo* reste incontournable. Pour ce projet le modèle animal choisi est le poisson zèbre. Il permet en effet de transposer rapidement les mutations candidates identifiées chez les patients et tester leur impact du fait de sa grande fécondité, de son développement embryonnaire rapide et des outils génétiques efficaces à disposition. Le développement des régions postérieures du cerveau du poisson zèbre présente de plus de nombreuses similitudes avec l'Homme, ce qui le rend pertinent pour les pathologies étudiées.

Le projet, d'une durée totale de 4 ans, consistera donc à créer des modèles génétiques chez le poisson zèbre, reproduisant des mutations humaines et d'en tester les conséquences sur la formation du cervelet et du tronc cérébral, par des analyses histologiques, des analyses d'imagerie et transcriptomiques. Nous testerons également des molécules ayant un potentiel thérapeutique sur nos modèles. L'ensemble du projet impliquera l'utilisation de 2045 poissons, au stade alevin ou adulte. Les protocoles expérimentaux définis prennent soin de respecter la règle des 3R:

Remplacement : Le projet nécessite une approche *in vivo*, néanmoins nous avons choisi d'avoir recours au poisson comme espèce modèle. La fécondation et l'ensemble du développement étant externes chez cette espèce, la création de modèles génétiques, l'étude du développement embryonnaire ou les traitements pharmacologiques ne requièrent pas de gestes invasifs chez l'animal.

Réduction : Nous optimiserons au maximum le taux d'efficacité des manipulations génétiques pour réduire le nombre de poissons adultes générés. Le nombre d'animaux utilisés sera restreint aux besoins statistiques de nos analyses et revu à la baisse quand ce sera possible grâce à des analyses à mi-parcours. Par ailleurs, nous utiliserons la congélation de sperme pour préserver la disponibilité des lignées obtenues pour la communauté scientifique, tout en restreignant au maximum le nombre de reproducteurs maintenus.

Raffinement : Le bien-être des animaux au sein de l'animalerie est assuré au quotidien, par un contrôle précis des paramètres d'eau, de lumière et de température, par l'apport de nourriture vivante stimulant l'instinct de prédation et un enrichissement social des poissons avec mise en reproduction régulière. Toute manipulation nécessitant de restreindre le mouvement des animaux, ou pouvant engendrer une douleur, sera effectuée sur animaux anesthésiés. Une surveillance journalière des alevins et poissons en élevage permettra de repérer les individus qui pourraient présenter des signes de détresse ou de souffrance, qui dans ce cas seront mis à mort de façon anticipée.

Notre projet permettra en conclusion de valider l'implication de plusieurs gènes dans l'apparition de troubles du développement du cervelet et du tronc cérébral et de poser définitivement le diagnostic génétique chez les patients. Il permettra en outre d'aller plus loin dans la compréhension des

pathologies, étape cruciale pour proposer de nouvelles approches thérapeutiques qui pourront être testées.

18148 Le cancer colorectal (CCR) est le troisième cancer le plus fréquent chez l'Homme. Sa prévalence est en constante progression depuis 1975 et représentait environ 1,2 million de cas en 2008. Avec environ 609 000 décès imputés par an, c'est également la quatrième cause de décès par cancer. Les formes familiales de CCR ont fait l'objet de nombreuses études et les gènes associés sont bien connus. Cependant, les cancers colorectaux sporadiques représentent ~80-90% des cas. Aussi, on considère qu'au moins 80% des causes de CCR sont liées à des facteurs environnementaux, alors les facteurs génétiques familiaux représentent seulement 10 à 20% de la causalité. Le microbiote intestinal, qui regroupe l'ensemble des microorganismes présents dans le tractus digestif, est un élément essentiel de l'environnement colique et les interactions entre microbiote et CCR font l'objet d'un intérêt croissant. Il a été notamment constaté chez les patients atteints d'un CCR un déséquilibre dans la composition du microbiote appelé dysbiose avec notamment une surreprésentation des bactéries *Escherichia coli* au niveau des tumeurs. Ces souches de *E. coli* fabriquent une toxine capable d'altérer l'ADN, la colibactine. La caractérisation de ces souches d'*E. coli* a révélé qu'elles sont capables d'adhérer et d'envahir les cellules épithéliales intestinales. Le contrôle de leur multiplication intracellulaire dans la cellule hôte ainsi que des dégâts causés à l'ADN, se fait par un mécanisme appelé autophagie. L'autophagie est un processus biologique nécessaire au maintien de l'homéostasie cellulaire et au renouvellement des organites cellulaires. L'autophagie consiste en la formation à l'intérieur du cytoplasme d'une vésicule membranaire permettant de séquestrer les organelles non fonctionnelles, les protéines mal repliées ou des pathogènes afin de les dégrader. Le processus autophagique est perturbé dans de nombreux cancers dont le CCR mais son rôle dans le développement de la maladie reste encore très mal compris. Notre hypothèse est qu'un défaut d'autophagique pourrait favoriser in vivo la colonisation des *E. coli* associés au cancer colorectal, impactant ainsi directement le développement du CCR. De manière à vérifier cette hypothèse, ainsi qu'à mieux comprendre le rôle de l'autophagie dans le développement du CCR, nous disposons de souris génétiquement modifiées déficientes pour l'autophagie soit dans les cellules épithéliales intestinales soit dans les cellules de la lignée myéloïde (macrophages...). Les souris ne développent pas spontanément de CCR. Cependant, l'inflammation et le développement du CCR sont intimement liés. C'est pourquoi, les animaux seront exposés à un agent induisant une inflammation intestinale (le DSS) et nous regarderons si un défaut d'autophagie entraîne ou non l'apparition tumorale. Par ailleurs, les animaux seront également infectés avec une souche d'*E. coli* isolée d'un patient souffrant d'un CCR et là aussi, nous observerons si dans le contexte d'un défaut d'autophagie, cette bactérie participe au développement du CCR. Enfin l'implication éventuelle de la colibactine sera étudiée en infectant des souris par un mutant bactérien incapable de fabriquer la toxine.

Sur la durée du projet qui est de 5 ans, nous utiliserons un maximum de 240 souris. Aucune méthode alternative n'existe car nous désirons étudier l'impact de l'autophagie et des bactéries sur le développement du CCR. Les animaux seront hébergés dans des cages standards (température 20-24°C, hygrométrie : 50% plus ou moins 10%, Cycle : 12h/12h, Éclairage : 350/450 lux) avec un accès illimité à l'eau et à la nourriture. De plus le milieu sera enrichi à l'aide de maisons en plastique ou de galettes en carton. Dans le cadre de la règle des 3R, un maximum de prélèvements sera réalisé afin de limiter le nombre d'animaux utilisé. Une attention particulière sera prêtée au comportement des animaux par les expérimentateurs et les personnes chargées du bien-être animal afin de surveiller l'apparition éventuelle de signes de douleur. Le poids des souris sera également suivi avec attention (pendant le traitement par l'agent inflammatoire et après son arrêt) car il reflète bien l'inflammation intestinale, la sévérité d'une diarrhée ainsi que le développement du CCR. Une perte de plus de 20% du poids initial constituera un critère d'arrêt. L'animal en question sera mis à mort.

18149 La dysplasie bronchopulmonaire (BPD) est une affection respiratoire chronique qui se développe chez des nouveaux nés prématurés présentant un faible poids. Elle est secondaire à un arrêt du

développement pulmonaire distal et se manifeste par une oxygène-dépendance persistante à 36 semaines d'aménorrhée. Des atteintes vasculaires sévères et diffuses entraînent une hypertension pulmonaire (HTP), complication évolutive grave de la BPD puisqu'elle multiplie par 4 le risque de décès des enfants atteints de BPD sévère. Les mécanismes de l'HTP secondaire à une BPD (HTPBPD) sont encore mal connus et l'on ne dispose pas de stratégie thérapeutique suffisamment efficace. L'objectif de ce projet est d'utiliser un modèle animal d'HTP-BPD permettant d'étudier des mécanismes impliqués dans l'HTPBPD et d'évaluer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Dans ce modèle, déjà décrit dans la littérature des rats nouveau-nés sont exposés à une atmosphère contenant 90% d'oxygène dans les 24h suivant la naissance et pendant 14 jours. Ce modèle reproduit chez le rat nouveau-né les altérations physiopathologiques observées chez le grand-prématuré et nous permettra donc d'en caractériser les mécanismes cellulaires et moléculaires. Ce modèle sera également utilisé chez la souris dans les mêmes conditions pour pouvoir utiliser des souris transgéniques. L'efficacité des traitements, choisis en fonction des anomalies observées, pourra aussi être évaluée sur ces modèles. Nous envisageons d'étudier environ 8 portées par an pour les rats et 5 portées par an pour les souris, dans chacun des groupes (malade et contrôle). Les portées comportant en moyenne 12 animaux pour les rats et 10 pour les souris, l'étude portera sur environ 192 rats et 100 souris malades ou contrôles par an, soit au total 960 rats et 500 souris sur 5 ans. Pour respecter la règle des 3R, les expérimentations seront planifiées afin d'obtenir un maximum de résultats expérimentaux sur un faible nombre d'animaux. Les expériences sur animal seront arrêtées si les résultats obtenus sont statistiquement significatifs (ou résolument non significatifs) avant la fin de la totalité des séries prévues.

Parallèlement à ce protocole, des études seront réalisées sur des cellules de poumons humains en culture, exposées ou non à l'hyperoxie. Ce remplacement du modèle animal par un modèle in vitro permettra d'élucider certains mécanismes intracellulaires sans utiliser d'animaux. Raffinement : l'exposition à l'hyperoxie n'induit pas de souffrance en elle-même. Toutefois, une surveillance des animaux sera réalisée, de manière à détecter tout signe de stress et/ou de douleur tout au long du protocole, en particulier par une surveillance quotidienne et par l'enrichissement du milieu (litière en copeaux, tunnels, nids en cellulose pour la mise bas). L'HTP n'induit pas de souffrances élevées mais plutôt une gêne respiratoire exacerbée lors d'un effort. Etant donné que les animaux ne seront pas soumis à l'effort, la souffrance est considérée comme modérée. Nous avons une grande expérience du suivi notamment respiratoire des animaux sous des atmosphères en oxygène variées au laboratoire et nous serons particulièrement attentifs aux points limites qui constitueront un arrêt des protocoles.

18150 La transplantation hépatique est l'unique option thérapeutique pour traiter les maladies en phase terminale (cancer, insuffisance...). Avec le vieillissement de la population et l'augmentation du nombre de transplantations au cours de ces dernières années, nous devons faire face à une pénurie d'organes transplantables. Cela se traduit par une augmentation du nombre de patients sur en attente d'un greffon. Le taux de mortalité des patients sur la liste d'attente étant élevé, les centres de transplantations ont étendu leurs critères d'inclusions dans le but d'augmenter le nombre de foies disponibles. Les foies dits « marginaux » provenant de donneurs à critères élargis (DCE) sont le plus souvent des foies provenant de donneurs âgés, décédés par arrêt circulatoire ou présentant des caractéristiques spécifiques telles que la stéatose, qui se définit par l'accumulation de gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes (cellules du foies). Il a été démontré que les foies DCE étaient plus sensibles à l'ischémie-reperfusion (IR), phénomène à l'origine de la formation de lésions liées au manque d'oxygène (phase d'ischémie) suivi par la reperfusion de l'organe lors de la transplantation, pouvant conduire à la mort prématurée du greffon.

La méthode de préservation standard utilisée en clinique aujourd'hui est la préservation statique froide (2-8°C). Cette technique permet une préservation efficace des greffons « sains » pendant une durée limitée dans une solution de préservation (SP). Cependant, les greffons DCE étant plus sensibles à la période d'ischémie, cette méthode de préservation montre vite ses limites. Pour améliorer la qualité de préservation de ces organes, l'utilisation des machines de perfusion semble être une piste prometteuse. Les bénéfices de la perfusion dynamique hypothermique ont déjà été

démontrés en transplantation rénale et est couramment utilisée aujourd'hui en clinique dans ce cadre-là. Cependant il n'existe pas de consensus quant aux durées de perfusion ni aux quantités d'oxygène nécessaires pour optimiser la préservation des greffons.

C'est dans ce cadre que s'inscrit notre étude. A partir d'un système expérimental de perfusion « ex vivo » développé au sein du laboratoire, nous allons dans un premier temps chercher à déterminer les durées de perfusion hypothermique les plus adaptées pour améliorer la qualité du greffon DCE. A la suite de ça, nous comparerons l'efficacité d'une nouvelle SP par rapport à celles utilisées en clinique et nous définirons le taux d'oxygène à utiliser dans le système de perfusion.

Les foies seront prélevés sur des rats sous anesthésie générale en reproduisant les conditions d'un arrêt cardiaque programmé comme ce qui se pratique en clinique. La chirurgie se fera donc sans douleur. Les foies prélevés seront immédiatement placés en préservation statique puis mis sur une machine de perfusion ex-vivo avec la SP. Afin de reproduire une transplantation, mais sans utiliser un deuxième rat, le foie sera perfusé sur le même système de perfusion ex vivo mais en conditions normothermique (35-37°C) afin de reproduire les phénomènes de reperfusion. Bien que représentant un modèle imparfait par rapport à la reperfusion dans un organisme complet, l'utilisation d'une telle méthode nous permettra de diviser par 2 le nombre d'animaux nécessaires pour cette étude. Cette technique permet au foie de reprendre partiellement ses fonctions vitales, ce qui nous permet de mesurer l'effet des protocoles utilisés et des solutions de préservation. Nous prélèverons à intervalle de temps régulier le perfusé (solution de perfusion circulant dans le foie) pour quantifier des marqueurs biochimiques, génétiques et histologiques utilisés en clinique pour déterminer les niveaux de lésions d'IR.

Ce projet prend en compte la règle des 3R. Cette étude des lésions d'IR et de la récupération de la fonction hépatique à la suite de différents protocoles de préservation ne peut être remplacée par des modèles cellulaires en raison de la complexité des mécanismes induits par la transplantation hépatique. Le rat a également été choisi pour son anatomie vasculaire proche de celle de l'humain qui nous permet de reproduire les gestes fait en clinique. Nous ferons le maximum afin de limiter les groupes expérimentaux à un minimum acceptable statistiquement. Chaque condition expérimentale testée concerne un lot de 8 animaux pour une interprétation statistique et scientifique des résultats (Réduire). De la même façon, le protocole a été adapté afin de supprimer la souffrance des animaux. Les chirurgies seront de plus réalisées par un personnel compétent et formé à l'expérimentation animale, ce qui permettra ainsi de réduire l'angoisse des animaux et de contribuer à leur bien-être. Enfin, dans un souci de raffinement, une attention particulière sera apportée au bien-être des animaux tout au long de la vie de ceux-ci. Les animaux feront l'objet d'un suivi quotidien de leur état de santé, les conditions d'élevage et d'hébergement seront optimisées (enrichissement du milieu...) et des procédures seront mises en place en cas de problèmes observés.

Le projet utilisera trois lignées de rats différentes :

- Nous utiliserons 112 rats âgés 6-8 semaines issus de la lignée Zucker possédant une mutation génétique induisant l'obésité pour modéliser les greffons stéatosiques.
- Nous utiliserons 64 rats âgés 6-8 semaines issus de la lignée Brown-Norway comme groupe contrôle afin de comparer l'efficacité de la nouvelle SP en condition de préservation statique et dynamique entre les groupes DCE et non-DCE.
- Enfin nous utiliserons 48 rats Sprague-Dawley âgés 6-8 semaines afin de poursuivre les travaux de notre laboratoire sur la détermination des niveaux d'oxygène.
- Au total nous utiliserons 224 rats.

Nous espérons pouvoir montrer l'efficacité de la nouvelle solution de préservation durant la préservation statique et dynamique du foie et affiner les paramètres (temps, % d'oxygène, séquence) du protocole de préservation. Les foies utilisés seront conservés pour constituer une banque d'organes et tester dans le futur de nouveau marqueur permettant d'approfondir ultérieurement nos connaissances sur la récupération du greffon hépatique dans le cadre de futures études.

Les résultats de cette étude nous permettraient de traiter plus efficacement les greffons DCE ce qui diminuerait les complications post-transplantation. Une utilisation efficace de ces greffons permettrait de grandement augmenter la réserve de greffons disponibles pour la transplantation, et donc de réduire le nombre de patients sur liste d'attente.

18151 Ce projet de recherche a pour objectif d'étudier la contamination des plumes, et des produits dérivés (farine), par les résidus antibiotiques en élevage avicole. Dans ce projet les niveaux d'exposition et les risques induits pour la chaîne alimentaire et l'environnement, seront particulièrement étudiés et nécessite la réalisation d'une expérimentation animale.

Contrairement aux denrées alimentaires produites par les animaux de rente, les sous-produits (par exemple, les plumes) destinés à la fabrication de produits dérivés (par exemple, la farine de plume) ne sont pas soumis à des limites réglementaires ni à des interdictions concernant la présence de résidus d'antibiotiques pouvant faire suite aux traitements vétérinaires administrés aux animaux. Les plumes sont pour partie réintroduites dans la chaîne alimentaire animale et de l'environnement. Riches en matière azotée, elles sont transformées en produits dérivés (farines) pour l'alimentation animale (petfood ou piscicole) ou bien directement incorporées dans la fabrication d'engrais. Les plumes et les farines de plumes pourraient donc constituer un réservoir potentiel de résidus d'antibiotiques exposant de manière involontaire l'environnement et les poissons via l'alimentation, et risquant alors de contribuer à l'émergence de l'antibiorésistance. Pourtant, les quelques études rapportées dans la littérature font état de la présence de résidus d'antibiotiques dans la plume à des teneurs pouvant dépasser les teneurs maximales autorisées ou Limites Maximales Résiduelles fixées pour les denrées alimentaires. En outre, la rémanence de ces résidus mesurée dans la plume semble généralement plus longue et plus stable que dans les denrées alimentaires. Les données scientifiques concernant les résidus dans les plumes sont encore insuffisantes, particulièrement en France et seule une étude américaine révèle la présence de dix résidus d'antibiotiques dans des farines de plumes de diverses provenances, et ce malgré les procédés mis en œuvre pour produire la farine.

Pour réaliser ce projet deux procédures sont nécessaires : une procédure pilote permettant d'établir la procédure principale. Les objectifs à atteindre sont : (i) évaluer la distribution des résidus antibiotiques étudiés (amoxicilline, sulfadiazine, triméthoprime et tétracycline) dans les plumes de volaille adultes préalablement traités par ces antibiotiques à des doses thérapeutiques (ii) évaluer le développement de l'antibiorésistance de souches bactériennes au travers des fientes des poulets traités et non traités ainsi que sur les plumes contaminées ou non par les fientes.

L'expérimentation animale se déroulera de façon longitudinale tout au long du projet sur des poulets de chair âgés de 3-4 semaines. Quelques plumes (1 gramme soit environ 10 plumes) seront prélevées à différents intervalles ainsi que du sang (1 ml). Cette étude est menée spécifiquement afin d'évaluer la contamination des plumes par les résidus antibiotiques. Il n'existe pas de modèle expérimental alternatif. L'utilisation animale ne peut donc être évitée. Le nombre d'animaux est calculé de manière à obtenir la quantité suffisante de plumes, de sang et de fientes respectivement 8 et 46 animaux seront inclus dans la procédure pilote et la procédure principale pour un total de 54 animaux. Les procédures expérimentales sont conçues pour limiter autant que possible la souffrance animale, en limitant les interventions sur animaux. Les poulets seront logés dans des box ou des cages, en respectant les normes du bien-être animal et avec à disposition des enrichissements appropriés.

18152 L'hypoxie est la marque de nombreuses tumeurs malignes solides, soutenant la carcinogenèse ainsi que la résistance aux radiations et à la chimiothérapie. De faibles niveaux d'oxygène dans les tumeurs entraînent des changements hémodynamiques qui limitent le transport des agents chimiothérapeutiques et qui atténuent l'efficacité de la radiothérapie. À ce jour, des efforts importants ont été consacrés pour cibler les régions localisées de l'hypoxie tumorale (transfusion de globules rouges, radiosensibilisateurs. .) mais aucune de ces approches n'a abouti à des résultats fiables. Partant du principe que la formation aberrante de vaisseaux sanguins est l'un des facteurs contribuant à l'hypoxie, des stratégies thérapeutiques alternatives ont émergé qui ciblent

la biologie vasculaire des tumeurs. Cependant, là aussi des effets secondaires néfastes sont observés (altération de la pression artérielle, troubles visuels, cytopénies. .) limitants leurs effets cliniques. Dans ce contexte, une recherche sur une nouvelle thérapie qui pourrait combattre directement l'hypoxie tumorale sans avoir d'effets indésirables sur les tissus sains a été menée et a abouti au développement de la molécule LEAF-4L6715 qui permet de resensibiliser les tissus hypoxiques à la radiothérapie in vivo.

L'objectif de ce projet de recherche est de valider les propriétés d'oxygénation du LEAF-4L6715 dans un modèle de cancer mammaire chez la souris immunodéficiente en imagerie tomographie par émission de positons et tomодensitométrie à rayons X (μ TEP/ μ TDMX). La quantification de l'hypoxie tumorale évaluée avec l'injection du radiotracteur 18F-MISO, un marqueur spécifique de l'hypoxie cellulaire, sera objectivée après l'injection du LEAF-4L6715. Ces mesures seront réalisées à plusieurs points après et avant l'injection du LEA-4L6715. L'efficacité de cette molécule devrait résulter en une diminution de la captation du 18F-MISO par les cellules tumorales et donc par une diminution du signal au cours du temps lors des séances d'imagerie in vivo.

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

- Réduire : le nombre d'animaux dans chaque groupe a été calculé afin d'inclure le minimum d'animaux pour pouvoir réaliser des tests statistiques sur les résultats obtenus. Un test statistique sera utilisé pour analyser les effets du LEAF-4L5715 entre les points de mesure.

- Raffiner : l'environnement des animaux est enrichi (tunnel, carré de coton déchiquetable pour maintenir une activité locomotrice, frisure de papier pour nidifier) , les animaux sont placés à plusieurs par cage. L'eau et la nourriture sont fournis ad libitum. Les souris greffées auront un suivi quotidien réalisé par du personnel préalablement formé et à l'aide d'une grille d'observation adaptée afin d'éviter toute souffrance liée au développement des tumeurs. Cette grille contient des critères précoces d'interruption d'expérimentation en fonction de l'aspect clinique des animaux(évolution pondérale, apparence physique générale, comportement). Tous les moyens nécessaires seront mis en œuvre pour éviter tout stress ou douleurs lors des procédures (anesthésie, analgésie).

- Remplacer : des études in vitro sur des lignées cellulaires ont montré l'efficacité du LEAF-4L6715 à réduire l'hypoxie cellulaire La complexité du développement tumoral (circulation sanguine, environnement tumoral) ne pouvant être étudié uniquement sur des cellules en culture, il est primordial de tester cette molécule sur des modèles animaux greffés avec des cellules tumorales.

36 souris immunodéficientes seront utilisées dans ce projet de recherche.

18153 La formation de métastases cancéreuses correspond à la dissémination des cellules cancéreuses à partir d'une tumeur primitive vers différents organes. Lorsque plusieurs organes sont touchés par la formation de métastases, on parle de cancer généralisé. Il est bien plus difficile de traiter un cancer généralisé qu'une tumeur primitive.

Le projet vise à inhiber la formation de ces métastases cancéreuses. Les cellules cancéreuses dites invasives, qui se détachent de la tumeur primitive, pour envahir d'autres organes, sont confrontées à des forces de frottement importantes, dues à leur traversée de zones denses peuplées d'autres cellules ou à leur progression dans les fluides physiologiques (sang, lymphe...). Ces forces de frottement engendrent des ruptures de la membrane plasmique, membrane qui entoure chacune de nos cellules et les protègent du milieu extérieur. Les cellules cancéreuses ne devraient leur survie qu'à une machinerie de réparation membranaire très efficace. Nous souhaitons nous attaquer à cette machinerie afin d'empêcher la réparation des cellules cancéreuses lors de tentatives de formation de métastases.

Pour valider, cette hypothèse de travail nous allons étudier chez la souris la formation de métastases à partir de cellules contrôles, connues pour former des métastases pulmonaires, et les mêmes cellules dans lesquelles nous aurons inhibé la machinerie de réparation membranaire, par génie génétique.

S'il s'avère qu'une déficience de la machinerie de réparation membranaire empêche la formation de métastases, alors nous ferons des tests thérapeutiques, chez la souris, à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre des protéines de la réparation membranaire.

Les dispositions prises sont conformes à la législation et au respect de la règle des 3R :

- « Remplacer » les modèles animaux : Notre projet de recherche repose sur une approche expérimentale qui rend indispensable l'utilisation d'un modèle animal. Il n'existe pas de modèle cellulaire reproduisant la formation de métastases cancéreuses. Néanmoins, un ensemble d'expériences préliminaires ont été réalisées *in vitro*, avec des cellules cancéreuses humaines, afin de valider la création de dommages membranaires lors de leur migration sur de la matrice extracellulaire et l'existence d'une machinerie de réparation.
- « Réduire » le nombre d'animaux en expérimentation : Notre projet contient une expérience pilote constituée uniquement de 20 souris, réparties en 2 lots de 10 souris (cellules contrôles et modifiées), permettant d'optimiser les procédures expérimentales avant de mettre en place deux expériences de plus grande envergure. Pour ces deux expériences, le nombre d'animaux nécessaire et suffisant (400) a été déterminé pour obtenir une puissance statistique permettant de pouvoir répondre aux différentes questions posées. Nous utilisons au total 420 souris (étude pilote et expériences).
- « Raffiner » la méthodologie utilisée : L'élevage, le suivi quotidien et les expériences seront réalisés dans une structure agréée qui tient compte de l'éthique animale, notamment des conditions de bien-être. Ce projet sera réalisé en s'assurant qu'aucune angoisse, douleur ou souffrance ne soit ressentie par les animaux. De plus, les animaux feront l'objet d'une surveillance rapprochée quotidienne afin de détecter les points limites de souffrance. Les critères d'interruptions des expériences ont été fixés afin que l'animal ne souffre pas.

18154 La polyarthrite rhumatoïde est une maladie inflammatoire chronique qui touche 0,5 à 2 pour cent de la population mondiale. Elle est d'origine auto-immune c'est-à-dire qu'elle résulte d'un dysfonctionnement du système immunitaire qui s'attaque aux constituants normaux de l'organisme, dans le cas présent aux cartilages et aux os. Elle entraîne des douleurs articulaires intenses chez les patients pouvant mener à un handicap moteur. Les articulations majoritairement touchées sont les articulations des mains, pieds, poignets, chevilles et genoux mais la maladie peut s'étendre à d'autres organes. Un des volets de la stratégie thérapeutique consiste à réduire l'inflammation avec l'administration d'anti-inflammatoires tels que des corticoïdes. L'utilisation de ces molécules est cependant associée à de nombreux effets secondaires graves.

Notre équipe développe des nanomédicaments. Ce sont des médicaments de taille nanométrique (quelques milliardièmes de mètre) composés d'une substance active et d'un « vecteur » qui va permettre de protéger la substance active et la transporter dans l'organisme jusqu'à sa cible. Ce système permet d'encapsuler des molécules thérapeutiques et d'augmenter leur libération au niveau du site pathologique tout en permettant de diminuer les doses responsables d'effets indésirables dans les autres organes. Dans ce projet, nous proposons différents types de nanomédicaments innovants, injectables par voie intraveineuse et contenant une ou plusieurs molécules anti-inflammatoires dans le but de traiter de manière prolongée les symptômes de la polyarthrite rhumatoïde. Ces nanomédicaments agiraient comme des réservoirs de principe actif dans l'organisme et libéreraient ce dernier de manière prolongée, permettant de diminuer la fréquence des injections chez les patients. De plus, du fait de leur très faible taille (100-150 nm), ils seraient capables de se concentrer au niveau des articulations inflammatoires à traiter, donc d'augmenter l'efficacité du traitement et de diminuer l'apparition d'effets indésirables.

L'objectif de ce travail est d'étudier le devenir du nanomédicament dans l'organisme après son administration et d'évaluer son efficacité thérapeutique. Le recours à l'animal est incontournable car cette maladie met en jeu une réponse immunitaire complexe qu'il est impossible de modéliser *in vitro* ou *in silico* car elle fait intervenir différents acteurs cellulaires (cellules inflammatoires telles que les globules blancs) et de nombreux médiateurs de l'inflammation (cytokines). Le modèle d'arthrite induite au collagène chez la souris est un modèle pertinent car il partage de nombreuses caractéristiques avec la polyarthrite rhumatoïde humaine. Il consiste à immuniser une souris avec

des injections de collagène ce qui va induire une réponse inflammatoire contre les articulations de la souris. C'est un modèle qui régresse spontanément ce qui permet de limiter la douleur ressentie par la souris.

Une planification statistique minutieuse permettra de réduire le nombre d'animaux tout en préservant la validité statistique de l'étude. Pour la réalisation de ce projet, nous utiliserons 720 souris sur 5 ans.

Les animaux seront hébergés en groupes dans un environnement enrichi afin de favoriser leur bien-être. Ils seront surveillés quotidiennement et une grille d'évaluation sera mise en place pour suivre l'évolution de l'inflammation et mettre en place des points limites le cas échéant. Des méthodes d'anesthésie seront utilisées pour exécuter toute intervention douloureuse.

18155 L'infection par le virus de l'hépatite C (VHC) est un facteur de risque majeur pour le développement de la cirrhose et du carcinome hépatocellulaire (CHC). Bien que les nouvelles approches thérapeutiques semblent éradiquer le VHC, ils ne permettent pas d'éliminer totalement le risque de cirrhose et de CHC pour lesquels il n'existe pas de traitement efficace en dehors des chirurgies lourdes. L'étude des pathologies du foie induites par l'infection chronique avec le VHC est freinée par le manque de modèles pertinents, particulièrement chez l'animal. En effet, ce virus n'infecte pas les petits modèles de rongeurs de laboratoire, mais seulement des primates, notamment les chimpanzés. Une équipe américaine a récemment décrit un virus (hépacivirus), de la même famille que le VHC, infectant les rats sauvages (rat hépacivirus, RHV) et les souches de rats utilisés dans les laboratoires. Ce modèle animal original pourrait constituer à terme un excellent modèle de substitution et motive notre intention de le mettre au point en France.

Les pathologies du foie sont aussi le résultat de la surconsommation d'alcool et de régimes alimentaires déséquilibrés en sucres et graisses. De plus, ces conditions sont souvent associées aux infections virales dans nos sociétés occidentales. Pour mimer et comprendre ces maladies hépatiques, nous avons développé l'idée d'associer le modèle de rats infectés par le RHV avec le modèle combinant l'administration d'un régime de type « Western Diet » (WD, riche en graisses et en sucres et boisson sucrée), avec ou sans prise d'alcool. Ce nouveau modèle mixte nous permettra d'étudier l'impact des perturbations du métabolisme des lipides dans ce contexte multi-morbidités, et d'en étudier les mécanismes au niveau cellulaire et moléculaire afin de définir des cibles thérapeutiques potentielles. Une telle étude de ces aspects physiopathologiques de l'infection virale par le virus de l'hépatite C n'a jamais été réalisée jusqu'alors à l'aide d'un modèle animal immunocompétent. De plus, ce modèle nous permettra d'étudier l'évolution de la pathologie hépatique dans le contexte d'une élimination du virus par les antiviraux prescrits actuellement, lorsque ceux-ci sont utilisés à un stade avancé de la maladie. Dans les phases de tests précliniques futurs, cela permettra d'étudier l'efficacité des médicaments sur les pathologies hépatiques induites par ces différences stress, mais aussi la tolérance/toxicité du traitement dans des conditions tissulaires semblables à celles décrites chez l'homme.

Ce projet a été conçu dans une démarche éthique et avec une application du principe des 3R telle qui s'en suit.

Remplacer : le développement des pathologies hépatiques est un processus qui implique différents types cellulaires au sein du foie et associe plusieurs facteurs, dont des perturbations métaboliques systémiques. Les lignées de cellules cancéreuses humaines du foie ne permettent pas de reproduire tous ces processus, en partie multi-organes. L'utilisation du modèle animal n'est donc pas pour l'instant remplaçable dans ce type d'étude. En revanche, ce modèle d'infection par un hépacivirus développé chez le rat permettra de réduire, voire de s'affranchir de l'utilisation de chimpanzés et autres primates non humains pour atteindre les objectifs du projet décrit ici.

Raffiner : les animaux seront hébergés en groupes avec un enrichissement du milieu. Un suivi quotidien des animaux sera réalisé. Nous caractériserons en profondeur ces nouveaux modèles animaux afin de déterminer la chronologie d'apparition des pathologies, leurs degrés de similitude avec celles observées chez l'homme. Cette approche représente un raffinement essentiel des modèles in vivo de pathogenèses hépatiques. Le raffinement des 3R s'étend donc au-delà de ce

projet avec un impact fort sur la méthodologie à venir et la transposition des résultats à l'homme. L'utilisation d'anesthésiants et/ou analgésiques sera réalisé comme décrit dans les procédures afin de prévenir et/ou réduire au minimum la douleur, la souffrance et l'angoisse dans le cas où elles surviendraient.

Réduire : Ces mises au point de modèle permettra de nous préparer pour des études précliniques ultérieures avec le meilleur modèle et ainsi de réduire le nombre d'animaux utilisé dans les phases précliniques. De plus, un calcul des effectifs nécessaires basé sur des variables biologiques bien définies nous permettra d'atteindre une significativité des résultats avec un minimum d'animaux. Notre approche statistique est basée sur la comparaison de deux moyennes. La mise au point et l'étude du modèle d'infection au RHV nous permettra de définir les meilleures conditions pour le développement d'une infection chronique afin de réduire les lots d'animaux exposés aux différents régimes alimentaires. Des prélèvements sanguins et tissulaires seront réalisés et conservés pour des études ultérieures afin de limiter la répétition des procédures. Enfin, un suivi longitudinal des infections par prélèvement et études de marqueurs sanguin permettra de limiter le nombre d'animaux utilisés.

Nombre d'animaux pour ce projet : 166 rats.

18156 L'obésité, qui est classée en tant qu'épidémie depuis 1997 par l'OMS, touche plus de 1,9 milliards d'adulte dans le monde. L'obésité qui se caractérise par une surcharge pondérale est un facteur de risque majeur du développement de nombreuses complications, dont la dyslipidémie, l'insulino-résistance menant au diabète de type 2, la stéatose hépatique ou encore le développement de maladies cardiovasculaires ou de divers cancers.

Dans ce contexte, la production intestinale de glucose (PIG) est une fonction particulièrement intéressante, puisqu'elle contrôle positivement le métabolisme et exerce des effets « anti-obésité » et « anti-diabète ».

Grâce à un modèle murin d'activation de la PIG (depuis le stade in utero), nous avons montré que cette fonction exerce des effets protecteurs vis-à-vis du développement de l'obésité et ses complications majeures (dont la stéatose hépatique, le diabète) induits par 5 mois de régime hypercalorique riche en gras et en sucres.

Dans un objectif thérapeutique qui pourrait être appliqué à l'homme, il est maintenant crucial de déterminer si l'activation de cette fonction est capable de corriger l'obésité et ses complications (dont le diabète et la stéatose hépatique) déjà installés par un régime hypercalorique. Pour cela, nous disposons au laboratoire d'un modèle de souris d'activation de la PIG à un moment choisi (par l'injection de tamoxifène ; souris I. G6pcsurexp. Ind).

Plus précisément, nous induirons un surpoids chez des souris I. G6pcsurexp. Ind (PIG non activée au départ) et contrôles grâce à l'apport d'une alimentation riche en gras et en sucres pendant 3 mois. Après ce temps, les souris recevront du tamoxifène afin d'activer la PIG chez les souris I. G6pcsurexp. Ind. Le régime hypercalorique sera poursuivi pendant 2 mois supplémentaires.

Cette étude nous permettra de déterminer si l'activation de la PIG est capable de corriger les troubles métaboliques provoqués par 3 mois de régime hypercalorique.

Ce temps de régime assez court n'entraînera pas de troubles majeurs chez les animaux. En effet, après 5 mois de régime au total, les souris présenteront un surpoids pouvant être accompagné d'un prédiabète et d'une légère stéatose hépatique.

Les souris seront élevées et hébergées par groupe 3-4 souris par cage en milieu enrichi (coton de nidation, bois à ronger) et contrôlé. Aucun des modèles murins utilisés dans cette étude ne présente de signe de stress, ni de douleur par rapport aux souris contrôles.

Ce projet sera réalisé selon le respect de la règle des 3R (remplacement, réduction, raffinement) :

Remplacement :

Cette étude nécessite l'utilisation de modèles animaux puisque la fonction étudiée, la PIG, a des impacts sur l'ensemble du métabolisme de l'organisme et implique des dialogues entre organes. En effet, le glucose produit par l'intestin est détecté au niveau des senseurs de glucose dans les

vaisseaux qui vont transmettre un signal nerveux au niveau du cerveau. En réponse, le cerveau va émettre des signaux nerveux en périphérie, régulant en particulier le métabolisme du foie.

Réduction :

Le nombre de souris a été calculé au plus juste à partir des connaissances des pathologies étudiées, des modèles animaux, et du métabolisme glucidique, mais aussi des résultats d'études précédentes ayant permis de valider la preuve de concept. Afin de pouvoir faire une analyse statistique, des groupes de 10 à 20 souris seront analysés. Au total, ce projet nécessitera l'obtention de 216 souris mâles transgéniques et contrôles.

Raffinement :

Les souris seront hébergées par groupe, dans un milieu enrichi pour favoriser la nidation. Les animaux seront observés quotidiennement et pesés régulièrement pour suivre leur prise de poids. Les procédures sont maîtrisées par les personnes en charge de l'expérimentation animale.

Les souris seront mises à mort à la fin du protocole ou lors de l'atteinte d'un point limite défini dans le projet selon les méthodes autorisées par la législation.

18157 Les cancers du sein sont la première cause de décès liés au cancer dans le monde occidental chez la femme. Ces cellules tumorales possèdent un fort potentiel à coloniser des organes secondaires comme les poumons. Un challenge majeur dans le traitement des cancers du sein est leur résistance aux traitements chimio-thérapeutiques. Alors que des facteurs intrinsèques à la cellule tumorale, comme ses caractéristiques génétiques peuvent être responsables de la résistance aux traitements, il est maintenant reconnu que le microenvironnement tumoral module la réponse aux traitements. Les traitements chimio-thérapeutiques peuvent modifier le microenvironnement tumoral et jouer un rôle dans la résistance des cellules tumorales. Le but du projet est d'étudier comment cet environnement modifié par le traitement thérapeutique favorise la résistance des cellules cancéreuses. Dans ce contexte, nous étudions le rôle des neutrophiles, cellules du système immunitaire, notamment des « Neutrophil Extracellular Traps » (NETs). Les neutrophiles sont maintenant reconnus pour leurs propriétés pro-tumorales, cependant leur rôle dans la résistance aux traitements reste obscur. Nos résultats générés *in vitro* et *in vivo* montrent que les neutrophiles, via leur interaction avec les cellules tumorales et via la sécrétion de NETs, protègent les cellules tumorales de la chimiothérapie. Les NETs sont des filaments d'ADN recouverts de protéines visant à piéger et tuer de nombreux micro-organismes. Nos résultats obtenus *in vivo* sous notre précédent CIEPAL (CIEPAL 647) montrent que la digestion des NETs avec de la DNase I *in vivo* améliore les effets de la chimiothérapie. *In vitro*, nous avons maintenant également identifié les voies de signalisation impliquées dans la chimiorésistance et qui sont responsables : i) du recrutement des neutrophiles par les cellules tumorales ; ii) de l'interaction entre les cellules tumorales et les neutrophiles ; iii) de la formation des NETs, ; iv) de la protection des cellules tumorales par les NETs.

Nous proposons maintenant d'étudier la relevance de nos résultats *in vivo*. Pour cela, nous souhaitons donc étudier les effets de l'inhibition pharmacologique de ces voies de signalisation sur la chimiorésistance *in vivo*. Pour ce faire, nous utiliserons des cellules murines métastatiques issues d'un cancer du sein. Ces cellules seront utilisées dans deux modèles tumoraux : 1) un modèle de tumeur primaire via implantation de cellules tumorales murines dans la glande mammaire par injection sous anesthésie générale chez la souris femelle âgée d'au moins 8 semaines ; 2) un modèle de métastase pulmonaire via implantation de cellules tumorales murines dans la veine caudale chez la souris femelle âgée d'au moins 8 semaines. Les drogues chimio-thérapeutiques utilisées seront la cisplatine (5 mg/kg ; deux fois par semaine pendant deux semaines) et la combinaison de doxorubicine et cyclophosphamide (2mg/kg ; 60 mg/kg respectivement, deux fois par semaine pendant deux semaines). Les drogues de chimiothérapies seront injectées 7 jours après implantation des cellules tumorales et ensuite deux fois par semaine. Les inhibiteurs et anticorps utilisés pour contrecarrer les effets des neutrophiles et NETs sur la chimiorésistance seront administrés 7 jours après implantation des cellules tumorales (quotidiennement pour les inhibiteurs, tous les 3 jours pour les anticorps). La croissance et la mort des cellules tumorales

seront contrôlées par mesure des tumeurs primaires, et marquage hématoxyline éosine en fin d'expérience. Un résumé graphique des procédures est disponible en annexe 1.

Un nombre total de 3678 animaux sera utilisé pour répondre à nos questions scientifiques.

Cette étude permettra de mettre en évidence les neutrophiles et NETs comme cibles thérapeutiques permettant de contrecarrer la résistance aux traitements chimio-thérapeutiques.

Ce projet est en accord avec la règle des 3R, comme définit ci-dessous.

Réduction : Le nombre d'animaux a été choisi pour détecter toute différence significative entre les groupes avec un nombre de souris minimum. Nos résultats générés *in vitro* et *in vivo* sous le CIEPAL 647 nous ont permis de générer une analyse statistique prévisionnelle permettant de réduire le nombre d'animaux utilisés dans toutes les procédures proposées.

Remplacement : L'utilisation de co-culture cellules tumorales-neutrophiles *in vitro*, utilisées en routine au laboratoire, et envisagées aussi souvent que possible, nous permette de réduire considérablement le nombre d'animaux, dans le respect de la règle des 3R.

Raffinement : Les animaux utilisés seront des souris Balb/c femelle âgées de 8 semaines. L'injection des cellules tumorales se fera sous anesthésie. Les signes cliniques attendus des animaux développant des tumeurs et des métastases sont des problèmes de déplacements, des signes de douleurs ou encore des difficultés respiratoires. Le bien-être animal sera évalué de manière objective grâce à des fiches d'évaluation adaptées à cette procédure (cf annexe 2). Ces fiches contiennent des points limites qui correspondent à un score maximum qui prend en compte plusieurs paramètres. Ces fiches nous permettront d'évaluer le statut des animaux et ainsi de décider de la poursuite de la procédure. De plus, nos résultats acquis lors du CIEPAL 647 nous permettent de connaître la cinétique de développement de la maladie et justifient les procédures proposées. Le suivi des animaux utilisés sera réalisé 3 fois par semaine avec palpation et mesure de la taille des tumeurs et sera assuré grâce à une fiche de score qui permettra de surveiller l'état des animaux avec une évaluation objective des points limites (annexe 2). Les souris seront sacrifiées à 21 jours après implantation ou lorsque le point limite est atteint (voir annexe 2).

18158 Les tumeurs cérébrales constituent la première cause de mortalité et de morbidité par cancer chez l'enfant. Les gliomes diffus de la ligne médiane (DMG) sont les formes les plus graves et les plus mal connues sur le plan biologique. Les DMG ne forment pas de masse tumorale distincte mais infiltrent différentes structures cérébrales. Ces propriétés d'invasion et sa localisation profonde dans le tronc cérébral sont une cause d'échec des chimiothérapies mais aussi l'inefficacité du traitement conventionnel qu'est la radiothérapie. Ces tumeurs sont incurables et constituent à ce jour, le plus grand défi thérapeutique de l'oncologie pédiatrique.

Récemment, il a été identifié chez les patients 2 sous-groupes avec un profil de réponse variable à l'irradiation. La réponse à la radiothérapie de nos cellules souches provenant de patients a déjà été évaluée *in vitro*. Cependant, l'environnement tumoral joue un rôle important dans la résistance de ces tumeurs à la radiothérapie. La modélisation de ces réponses à l'irradiation dans des modèles *in vivo* vont pouvoir recréer cette variabilité de sensibilité et la complexité des interactions entre les cellules et leurs environnements. Cette étude contribuera à mieux comprendre les résistances observées chez les patients.

Une singularité des gliomes du tronc cérébral résulte dans leur phénotype systématique d'infiltration des structures normales, l'absence de masse tumorale et l'importante capacité d'invasion du tronc cérébral dans un premier temps, puis plus largement du cerveau au décours de la maladie. Ces particularités résultent des interactions des cellules tumorales avec leur stroma qui ne peuvent être appréhendées que dans des modèles *in vivo*, où la variété et complexité du microenvironnement tumoral peut être reproduite.

L'implantation de cellules tumorales modifiées dans le cerveau de souris permettra donc un suivi précis par imagerie de l'évolution de la pathologie au cours de temps. Afin d'obtenir un panel de modèles reflétant la variabilité inter-tumorale pour les différents types tumoraux tout en réduisant le nombre d'animaux utilisés, nous utiliserons des modèles cellulaires implantés déjà caractérisés.

Nous étudierons ainsi la réponse de nos modèles par l'essai de 3 doses de radiation. L'évaluation de leurs efficacités seront déterminés à l'aide de tests statistiques et 10 animaux/groupe seront suffisants pour valider l'analyse, soit l'utilisation de 230 souris sur 3 ans.

Les souris seront hébergées en groupe avec un accès à l'eau et la nourriture ad libitum et leur environnement sera adapté et enrichi pour apporter un maximum de confort. Pour limiter les douleurs, toutes les procédures seront réalisées sous anesthésie générale et un antalgique sera administré dès l'apparition des premiers signes cliniques. Des points limites précoces ont été établis pour réduire la souffrance de l'animal et seront strictement respectés.

18159 Le cancer colorectal (CRC) est le troisième cancer le plus fréquent et la quatrième cause de mortalité liée au cancer dans le monde. Bien que les traitements actuels fassent preuve d'une certaine efficacité, la récurrence se produit encore chez 50 % des patients. Les paramètres sous-jacents encore inconnus qui conduisent à cette récurrence doivent être élucidés, ce qui pourrait permettre d'éradiquer la rechute et le décès qui en résulte. En effet, au cours des dernières années, un rôle de la rigidité de la tumeur, ainsi que du flux sanguin et de la pression de croissance de la tumeur, ont été proposés comme facteurs favorisant la progression de la tumeur. Nous avons ainsi récemment décrit une voie de signalisation activée mécaniquement dans le cancer du côlon de la souris. Nous avons trouvé un capteur mécanique moléculaire qui active l'expression de gènes tumoraux comme réponse à la pression de croissance tumorale. Dans ce cadre, nous avons développé une technique innovante permettant de mimer la contrainte mécanique générée par une croissance tumorale, en délivrant une pression mécanique permanente in vivo dans le côlon de souris, grâce à une magnétisation par des particules aimantées. L'objectif du projet est fondamental et consiste à établir les processus cellulaires et moléculaires sous-jacents à l'induction mécanique de la formation de tumeurs. Pour ce faire, nous allons d'abord créer une nouvelle lignée de souris knock-out (inactivation totale d'un gène) pour ce marqueur mécano sensible. Nous allons ensuite utiliser notre technique de ciblage et de compression magnéto-mécanique produite par l'introduction d'un aimant millimétrique dans la partie dorsale de la souris suivie d'une injection intraveineuse de particules lipidiques magnétiques se localisant dans la région du côlon et induisant in vivo une pression équivalente à celle provoquée par la croissance d'une tumeur. Ce projet vise ainsi à définir de nouvelles cibles thérapeutiques pour les patients atteints du cancer colorectal.

Ce projet utilisera un nombre maximal de 318 souris.

3R (remplacer, réduire, raffiner) :

Remplacement : L'utilisation des souris transgéniques comme modèles pathologiques est actuellement le seul moyen d'aborder la problématique de ce projet préclinique fondamental. Les questions posées ne peuvent être investiguées avec des modèles cellulaires in vitro et requièrent une complexité tissulaire qui ne peut être récapitulée qu'in vivo.

Réduction : Le nombre de souris pourra être réduit en fonction des résultats obtenus à chaque étape, permettant de cibler les meilleures conditions d'analyse.

Raffinement : L'implantation de l'aimant et l'injection de particules aimantées seront réalisées sous anesthésie. Les animaux seront suivis quotidiennement et les expérimentations contrôlées de façon à minimiser et prévenir la douleur des souris. Une grille de score sera utilisé afin d'arrêter l'expérimentation avant des signes de douleur. Des soins avec la Bétadine® leur seront apportés après la pose sous cutanée de l'aimant pour contrôler la cicatrisation. Les contraintes mécaniques de croissance tumorale précoces endogènes ont été mesurées et sont faibles, sans douleur pour l'animal.

18160 Le cancer est la première cause de mortalité en France et dans de nombreux pays. Malgré des progrès thérapeutiques importants au cours des 20 dernières années, le taux de survie à 5 ans des patients atteints de tumeurs solides demeure faible. Le cancer est dû à l'accumulation d'anomalies génétiques dont la description s'est beaucoup améliorée, notamment grâce à un développement technologique constant. Cependant, cette description ne s'est pas toujours traduite par une meilleure compréhension des mécanismes d'initiation et de progression du cancer, qui nécessite

l'étude approfondie de la fonction biologique des gènes altérés. Cette compréhension pourrait mettre à jours de nouvelles vulnérabilités des cellules cancéreuses et ouvrir des perspectives thérapeutiques innovantes.

Ce projet a pour but d'étudier 3 gènes fréquemment altérés dans les mélanomes humains dont la fonction est inconnue. L'élucidation de leur rôle dans le développement du mélanome a le potentiel d'accroître la compréhension des mécanismes de transformation de cette tumeur agressive, qui touche près de 10000 personnes par an en France. La fonction des gènes d'intérêt sera analysée en évaluant les conséquences de leur expression ou de leur inactivation sur la survenue des tumeurs et sur leurs caractéristiques dans différents modèles de mélanome dans le poisson zèbre. Les analyses visant au décryptage des mécanismes moléculaires d'action de ces gènes seront quant à elles réalisées dans des modèles cellulaires in vitro.

Le poisson zèbre est un modèle de vertébré particulièrement utile pour l'étude de la génétique du cancer. Les gènes et programmes génétiques impliqués dans le développement des cancers sont conservés à 80% entre l'homme et le poisson et de très bons outils sont disponibles pour reproduire les altérations génétiques trouvées dans les tumeurs humaines dans les cellules de poissons adultes. C'est ainsi qu'ont été générés des modèles très fiables de mélanome dans le poisson zèbre. L'expression et l'inactivation de gènes proposées ici sont restreintes à certaines cellules de la peau et ne sont donc pas censées induire de pathologies autres que la formation de mélanomes à l'âge adulte. Le risque de souffrance associée à la formation de tumeurs est limité et en contrepartie, les études présentées ici devraient permettre de découvrir la fonction de nouveaux gènes impliqués dans le développement du mélanome humain.

L'étude expérimentale de la fonction de gènes impliqués dans le cancer nécessite l'utilisation de modèles animaux. Les lignées cellulaires de cancers humains cultivées in vitro sont très utiles pour tester des hypothèses sur les aspects moléculaires du rôle de certaines protéines mais elles rendent mal compte de l'influence d'un gène sur le comportement cellulaire dans le contexte global d'un organe ou d'un organisme. De plus, ces modèles cellulaires in vitro proviennent de tumeurs complètement établies et ne permettent donc pas de modéliser les étapes d'initiation et l'évolution des tumeurs au cours du temps. Une analyse statistique préalable a permis de déterminer le nombre minimum d'animaux permettant de conclure sur la significativité des effets sur les délais de survenue des tumeurs induits par les manipulations génétiques proposées. Le présent projet nécessitera l'utilisation de 8700 poissons zèbres adultes sur une période de 5 ans. Dans un but de raffinement et de réduction, l'analyse des caractéristiques biologiques des tumeurs sera réalisée sur la même cohorte que la mesure de leur taux d'incidence. Dans la mesure du possible, nous essaierons de grouper au maximum les manipulations génétiques au sein des cohortes de poissons de manière à mettre en commun les groupes témoins et réduire ainsi le nombre total d'animaux utilisés. Tout stress ou souffrance des animaux potentiellement dus au développement de tumeurs pourront être prévenus par une surveillance attentive des poissons à la recherche de signes ou de changements de comportement généralement associés à une maladie par l'application de critères d'arrêt définis.

18161 Les cancers de la tête et du cou sont fréquents, au 4ème rang en termes d'incidence. La (pharyngo) laryngectomie totale ((P)LT) est une intervention courante pour le traitement des cancers pharyngo-laryngés et entraîne la séparation définitive entre l'axe respiratoire et l'axe digestif (néo-pharynx). La complication la plus fréquente de cette chirurgie est la fistule salivaire (FS) (incidence de 20 % à 65 %). Il s'agit d'une fuite de salive entre les sutures du néo-pharynx. Un des principaux facteurs de risque est un antécédent d'irradiation. La salive, en s'écoulant dans le cou, entraîne une morbidité élevée i. e. augmentation de la durée d'hospitalisation, reprise chirurgicale, risque de rupture vasculaire et de décès i. e. rupture de carotide. Il n'existe aucune solution actuelle pour réduire l'incidence des FS.

Le présent projet vise à développer un biomatériau innovant (DM) sous la forme d'un film double couche pour la prévention des FS. Le projet est une collaboration entre un établissement de santé spécialisé en cancérologie, 2 laboratoires de recherche académique spécialisés dans les biomatériaux, 2 partenaires industriels.

Ce projet s'appuie sur des résultats préliminaires concernant le design de biomatériaux à base d'alginate.

L'objectif du projet présenté ici est l'évaluation in vivo du DM avec 3 tâches :

- 1) mise au point d'un modèle de mini-porc irradié (n=3);
- 2) mise au point d'un modèle de mini-porc laryngectomisé (n=5);
- 3) évaluation de l'efficacité du DM sur des porcs laryngectomisés avec ou sans irradiation (n=30).

Afin de répondre à ces objectifs le nombre total d'animaux utilisés sera donc de 38.

Pour optimiser l'utilisation et la protection des animaux au cours de l'expérimentation dans notre laboratoire, nous répondons à la règle des 3R dans ses différents aspects :

-Réduction : Le nombre d'animaux est calculé en respectant les critères pour une analyse statistique appropriée.

-Remplacement : Le recours à l'expérimentation animale est indispensable pour ce projet avant la réalisation d'essais cliniques chez l'homme.

-Raffinement : Les méthodes d'analyses utilisées, les plus avancées, permettent d'obtenir une précision dans les mesures conduisant à réduire la variabilité expérimentale et donc le nombre d'animaux utilisés. Le bien-être de l'animal, outre les considérations éthiques, est aussi un facteur de variabilité expérimentale, qui est pris en compte et réduit grâce au suivi rapproché quotidien des animaux, l'aide à l'alimentation en cas de besoin, l'enrichissement de leur environnement et le respect de l'aspect social du groupe. La responsabilisation du manipulateur et le respect de l'animal nous conduisent à prendre en charge la prévention de la souffrance, notamment par l'application stricte de points-limites préalablement définis. En cas de signes externes de souffrance (cachexie, prostration, fièvre) persistant pendant plus de 24h, les animaux seront mis à mort pour raisons humanitaires.

18162 Les leucémies aiguës lymphoblastiques T (LAL-T) sont des cancers du sang qui surviennent chez les enfants et les adultes.

Leur traitement repose sur une association de chimiothérapies qui provoquent des toxicités importantes et ne permettent pas de guérir l'ensemble des malades.

C'est pourquoi il est nécessaire d'évaluer de nouveaux médicaments.

Des marqueurs présents sur les cellules leucémiques ont été identifiés comme nouvelles cibles médicamenteuses d'inhibiteurs pharmacologiques existant.

Ces médicaments sont validés et sont actuellement utilisées chez l'humain pour traiter d'autres maladies que la leucémie.

L'objectif de ce projet est de valider précliniquement, sur modèle animal, l'efficacité in vivo de ces médicaments sur le traitement des LAL-T.

Ce projet suivra la règle des 3 R :

Remplacement : les cellules leucémiques de patients (dites cellules primaires) ne peuvent pas être obtenues en quantité suffisante pour tester in vitro l'efficacité des molécules d'intérêt.

Ces cellules sont fragiles et ne peuvent être maintenues en culture suffisamment longtemps pour les besoins des expériences.

L'utilisation de lignées cellulaires de leucémies aiguës ne constitue pas une alternative, puisqu'aucune d'entre elle n'exprime le marqueur d'intérêt.

De plus, de nombreuses études soulignent le rôle du micro-environnement tumoral dans la réponse au traitement, une dimension qui ne peut naturellement pas être appréciée dans les études in vitro.

Pour toutes ces raisons, l'utilisation de xénogreffes dérivées de patients (PDX) reste le modèle préclinique indispensable pour l'étude des LAL-T et pour tester l'efficacité de nouvelles thérapeutiques, comme rapporté dans la littérature scientifique.

Nous réaliserons donc des xénogreffes des cellules leucémiques primaires chez des souris transgéniques immunodéficientes, afin de développer une maladie identique.

La génération de xénogreffes permettra, dans un premier temps, de valider ce modèle par rapport à la leucémie d'origine, puis de réaliser des études en culture ex vivo.

Dans un second temps, nous souhaiterions valider précliniquement sur modèle animal l'efficacité in vivo du médicament d'intérêt.

Réduction : Ce projet nécessitera 222 souris sur 5 ans. Le nombre d'animaux a été réduit au minimum, après estimation des effectifs, afin de garantir l'obtention de résultats statistiquement recevables, à l'aide de simulations informatiques.

Raffinement : Tout au long de ce projet, nous serons attentifs au bien-être des animaux et avons défini des points limites précoces, évaluables à l'aide d'une grille que nous avons établie, dans le but de ne pas causer de souffrance animale.

Les injections de cellules leucémiques seront réalisées sous anesthésie.

Le suivi de la leucémie sera réalisé par prise de sang et permettra d'anticiper le développement de la maladie et d'intervenir avant l'apparition de signes de souffrance.

En raison des faibles chances de survie des patients présentant des résistances aux chimiothérapies actuellement utilisées, ce projet devrait permettre de valider l'efficacité de nouveaux médicaments pour des patients n'ayant plus de traitement efficace, afin d'améliorer leurs chances de survie et de guérison et permettra d'identifier, valider, et utiliser des marqueurs de réponse au traitement.

18163 L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée pour le compte d'un industriel pharmaceutique dans le cadre du développement d'une nouvelle technologie d'intérêt thérapeutiques basée sur l'administration d'ARNm encapsulés. Il s'agit d'une étude très préliminaire visant à obtenir une première preuve de concept de la capacité de ces ARNm encapsulés à être distribués dans les différents tissus de l'organisme. Pour les besoins de cette étude de distribution, ces ARNm expriment, outre la protéine d'intérêt thérapeutique, la luciférase, une enzyme capable d'émettre un certain niveau de bioluminescence lorsqu'elle clive son substrat, la luciférine. Le protocole expérimental consiste à administrer de façon aiguë les ARNm encapsulés par voie intraveineuse et la luciférine par voie intrapéritonéale. Dix-huit heures après ces administrations, les animaux seront mis à mort et les organes d'intérêt seront prélevés (cerveau, foie, poumons, cœur, reins, rate, muscles gastrocnémiens, tissu adipeux) pour mesure de la bioluminescence par un système d'imagerie.

La présente étude étant très préliminaire, elle ne nécessitera l'emploi que 4 souris C57Bl/6 réparties en 2 groupes expérimentaux de 2 animaux (2 animaux traités au véhicule + luciférase, 2 animaux traités avec les ARNm encapsulés + luciférase).

La règle des 3Rs a été prise en compte dans l'élaboration du présent protocole:

- Raffinement: Le modèle animal qui sera utilisé est un modèle parfaitement caractérisé dans la littérature et couramment utilisé dans les études précliniques. Le protocole a été planifié de façon à limiter au maximum tout stress et tout inconfort pour les animaux. Les animaux seront hébergés par deux dans chaque cage. Par ailleurs, un enrichissement du milieu sera assuré par l'ajout d'igloos et de matériels de nidification ainsi que de briquettes de bois spécifiques pour rongeur. Enfin, un suivi journalier des animaux à l'aide d'une grille de score permettra une action rapide en cas d'atteinte des points limites établis. Une analgésie pourra être mise en place si un animal venait à présenter des signes de souffrance.

- Réduction: Le nombre d'animaux utilisés a été réduit au minimum dans le cadre de cette étude préliminaire qui vise à obtenir de toutes premières données sur le potentiel de distribution des ARNm encapsulés dans différents organes périphériques.

- Remplacement: L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe aucune méthode de substitution n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude de distribution de composés thérapeutiques dans l'organisme entier.

18164 Chaque évènement vécu, expérience personnelle, ou stress peuvent avoir un impact sur notre cerveau en modifiant son activité et ses circuits de manière à conduire à la formation de souvenirs (= trace mnésique).

Le processus de mémorisation pourrait être lié à la synthèse protéique. Afin de mieux le mettre en évidence, il va être utilisé ici un inhibiteur de la synthèse protéique, l'anisomycine. Un acide aminé facilement détectable sera injecté pour suivre la synthèse protéique en fonction de l'injection d'anisomycine (durée, quantité, etc). L'objectif du projet est de déterminer les conditions d'une synthèse protéique réduite au maximum.

Nous allons donc caractériser chez la souris les effets de l'anisomycine à différentes doses et suivant différents modes d'injection en se focalisant sur ses effets d'inhibition de la synthèse des protéines et sur ses effets comportementaux locomoteurs et exploratoires.

C'est un travail de caractérisation primordiale pour le laboratoire. En effet, plusieurs projets majeurs du laboratoire cherchent à comprendre le rôle de la synthèse protéique dans l'association de deux traces mnésiques dans des conditions normales et dans des conditions pathologiques (trouble de stress post-traumatique, anxiété et dépression).

Dans ce but, différentes concentrations d'anisomycine, différentes routes d'administration (sous-cutanée, intracérébroventriculaire et intrahippocampique) et différents temps d'action seront testées chez la souris pour ses effets sur la synthèse protéique et pour ses effets comportementaux sur la locomotion et l'exploration. Le nombre total de souris nécessaire pour ce projet est de 295 souris.

Le principe des 3Rs sera appliqué:

Remplacement : aucune méthode alternative in vitro n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée (effets de l'inhibition de la synthèse protéine durant une tâche comportementale et d'apprentissage).

Réduction : Les expérimentateurs suivront un protocole rigoureux permettant de limiter les variabilités individuelles et expérimentales. Les effectifs sont calculés de manière à permettre une réduction des effectifs optimisée permettant de suivre les recommandations éthiques d'obtenir une puissance statistique suffisante avec un minimum d'animaux.

Raffinement: Les conditions d'élevage des animaux seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu (cabanes plexiglass et cartons, tubes). Les injections/implantations intracérébrales se feront sous anesthésie générale par des chercheurs formés et expérimentés. Les animaux recevront un traitement analgésique avant l'intervention, un traitement anti-inflammatoire après l'intervention et 24 heures après. Si nécessaire un traitement antibiotique sera administré. Chaque animal est placé sur une couverture thermorégulée pour éviter toute hypothermie. Les cornées sont protégées de la déshydratation. L'anesthésie gazeuse est ici privilégiée pour mieux contrôler la profondeur d'anesthésie et pour une meilleure récupération post-opératoire. Une surveillance post-opératoire d'une semaine est réalisée pour suivre chaque souris et intervenir si nécessaire.

18165 Des travaux récents montrent l'implication de ICOS (protéine du système immunitaire) dans les atteintes des nerfs chez les patients diabétiques. L'objectif principal de ce projet est de comprendre le rôle de ICOS et son ligand ICOS-L dans les processus de maintien de la myéline (gaine isolante des nerfs) dans les nerfs malades (neuropathiques). Le projet consiste à analyser l'effet des injections de poly(I:C) (Polyinosinic:polycytidylic acid) sur une accélération potentielle de la neuropathie.

Pour cela, nous utiliserons des souris déficientes pour ces gènes qui subiront des injections de poly(I:C). Les capacités locomotrices de ces souris seront ensuite évaluées grâce à des tests comportementaux non invasifs et indolores. Nous analyserons la capacité des souris à explorer leur environnement, à se déplacer sur une barre horizontale... Puis nous mènerons des études biochimiques et histologiques sur les nerfs isolés.

Afin d'être en conformité avec les exigences des 3R (remplacement, réduction, raffinement), nous utiliserons des méthodes de culture de cellules in vitro afin d'identifier les cibles des gènes ICOS et

ICOS-L, pour mieux comprendre leur rôle dans le déclenchement d'une neuropathie auto-immune. Nous allons utiliser le minimum d'animaux en expérimentation en prélevant le maximum de tissus biologiques sur chaque animal et en utilisant les tests statistiques appropriés afin d'obtenir des résultats statistiquement exploitables. Au total nous avons besoin de 100 animaux pour une étude qui s'étend sur 6 à 8 mois. Nous allons également raffiner l'étude en évitant des tests comportementaux douloureux, en appliquant des points limites (notamment la mise à mort des souris en cas de souffrance majeure) et en diminuant la durée de l'étude au maximum. En effet, une accélération de l'incidence de neuropathie chez ces souris permettra de réduire le temps d'élevage: nous pourrions étudier la neuropathie chez des souris âgées de 12 semaines au lieu d'attendre qu'elles aient 20 à 35 semaines.

Une meilleure compréhension de l'importance de ICOS et ICOSL permettrait le développement de nouvelles pistes thérapeutiques pour le traitement des atteintes neurologiques.

18166 Le cancer du pancréas est reconnu comme l'un des cancers les plus agressifs dans le monde. L'adénocarcinome pancréatique ductal (PDAC) est le plus répandu des cancers du pancréas. Il représente 85% des cancers de ce type, et possède un mauvais pronostic du fait d'un diagnostic souvent tardif, à un moment où la tumeur produit des métastases. L'espérance de vie moyenne est de 5 ans après diagnostic ce qui représente le taux le plus faible de survie (5%) de l'ensemble des cancers. Ainsi bien que les patients aient accès à différents traitements (chimiothérapie, radiothérapie, immunothérapies, thérapies ciblées), ceux-ci s'avèrent insuffisamment efficaces à ce jour.

L'objectif de cette étude est d'améliorer la réponse immunitaire anti-tumorale par une approche de combinaisons de différentes thérapies préexistantes. Si celles-ci ont démontré une efficacité limitée seule, une utilisation en combinaison permettrait d'améliorer les effets de chacune. De nombreux exemples démontrent déjà que la combinaison de différents types d'immunothérapie fait entrer en synergie les effets individuels de ces traitements, et dans certain cas, les potentialisent. Ainsi dans le cadre de notre étude, nous avons choisi des traitements ciblant différents types de cellules immunitaires, en les inhibant ou en les activant selon l'effet souhaité. Trouver les bonnes combinaisons de ces traitements est un enjeu sanitaire majeur pour les prochaines années. En effet ce type de cancer ne cesse d'augmenter dans le monde. D'après les projections il sera notamment la seconde cause de mortalité par un cancer aux USA en 2030.

L'expérimentation animale est essentielle dans ce projet et est gérée selon la règle des 3R. Sur la question du « Remplacement », les expérimentations in vitro ne rendent pas compte de toute la complexité rencontrée dans un corps, avec toutes les interactions entre les organes mises en jeu. L'expérimentation animale reste dans ce cas la meilleure solution pour étudier l'effet de ces combinaisons, d'identifier celles qui vont entraîner un effet anti-tumoral, et de décrire la mécanistique cellulaire et moléculaire associée à cet effet. Ces expériences d'expérimentation seront réalisées chez la souris, une espèce qui dans le cadre de la recherche anti-tumorale s'est avérée signifiante et apte à un transfert de technologie chez l'homme. Nous avons choisi un modèle où nous greffons les tumeurs dans les souris afin d'être au plus proche des conditions réelles de la croissance tumorale.

Dans le cadre de la « Réduction », nous avons calculé le nombre minimal de souris nécessaires pour que les résultats soient signifiants. Ce nombre, impliquant tous les groupes, est estimé à 1310 souris et est calculé sur la base d'une formule statistique validée par le ComEth et qui est couramment utilisée dans ce cadre. Ce calcul est détaillé sur un document annexe. Nous allons étudier les traitements sur 2 lignées cellulaires tumorales. Pour la première lignée, nous avons 12 lots, 1 control (25 souris), 1 avec le traitement de base (70 souris), 5 avec les traitements complémentaires seuls (70 souris pour chacun) et 5 avec les traitements combinés (70 souris pour chacun). Pour la deuxième lignée, nous avons 8 lots, 1 control (25 souris), 1 avec le traitement de base (70 souris), 3 avec les traitements complémentaires seuls (70 souris pour chacun) et 3 avec les traitements combinés (70 souris pour chacun).

Enfin en ce qui concerne le « Raffinement », nous allons donner tous les produits nécessaires au bien-être animal, réduisant au maximum la souffrance animale, qu'elle soit physique ou psychique.

Au cas où la souffrance animale apparaît sans que nous puissions la résoudre, nous avons créé une grille regroupant les symptômes caractéristiques de notre modèle. Cette grille nous permet d'évaluer la souffrance de l'animal, et ainsi de définir des points limites. Si ces points limites sont atteints, nous sacrifions l'animal. Nous donnons également deux produits analgésiques différents, dispensés avant, pendant et après l'opération pour réduire au maximum la souffrance physique.

18167 La sérotonine est une monoamine produite dans le cerveau où elle agit comme neurotransmetteur (régissant les communications entre les cellules) et régule de nombreuses fonctions dont l'humeur. Elle est aussi produite à la périphérie par l'intestin et la synthèse de sérotonine dans cet organe est retrouvée dans le sang. Au cours de la gestation, les variations des taux de sérotonine sanguine affectent le développement embryonnaire et le comportement de la descendance. Des premiers résultats montrent que des animaux contrôles issus de femelles dont les niveaux sanguins de sérotonine sont diminués de 50% présentent des modifications comportementales à l'âge adulte (augmentation de l'activité, insomnie chronique) mais pas de modification cérébrale ou anatomique évidente (le poids et taille des cerveaux sont normaux). Nous compléterons la caractérisation comportementale de ce modèle en utilisant des tests mesurant l'anxiété, l'activité circadienne, les comportements sociaux, la cognition et le filtrage de l'information sensorimotrice chez ces animaux). Les expériences seront réalisées sur un maximum de 64 souris pendant une période de 3 ans.

Cette étude prendra en compte la règle des 3R :

Remplacement : Les analyses comportementales ne peuvent se faire qu'in vivo. Nous avons recours à un modèle de souris déjà bien décrit et ce projet visent à compléter des données bien établies.

Réduction : Le nombre d'animaux estimé et les tests statistiques utilisés sont basés sur notre expérience pour ce type d'étude. Ce nombre minimum nous permettra d'être certains de répondre aux questions scientifiques de ce projet.

L'analyse statistique de ce type de données nécessite 16 animaux par groupe pour mettre en évidence une différence significative entre les 2 groupes testés. Néanmoins, si la puissance statistique des résultats était insuffisante, cette étude pourrait être dupliquée.

Raffinement : Ce modèle expérimental est réalisé sur des souris ne présentant pas d'altération évidente. La mise en place de points limites prédictifs ainsi que l'observation quotidienne du comportement des animaux permettront d'identifier et de limiter toute souffrance et douleur. Si l'un de ces points limites est atteint, les animaux concernés seront euthanasiés selon les méthodes réglementaires. Les animaux seront hébergés en groupe en milieu enrichi pour minimiser leur stress.

Ces études nous permettront de mieux caractériser les phénotypes comportementaux induits par un manque de sérotonine maternelle et de déterminer les régions cérébrales affectées. Ce projet visera également à déterminer si le manque de sérotonine maternelle est susceptible de prédisposer la descendance à développer des anomalies comportementales et anatomiques associés à des pathologies psychiatriques du neurodéveloppement comme trouble déficitaire de l'attention avec hyperactivité (TDAH), l'autisme ou la schizophrénie.

18168 Les lipopolysaccharides (LPS) sont des composants de la membrane externe des bactéries Gram négatives. Leur présence dans la circulation sanguine conduit à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires stimulant la réponse immunitaire permettant la destruction et l'élimination des bactéries pathogènes. Cependant, une réponse inflammatoire excessive peut avoir des effets délétères pour l'organisme et provoquer des défaillances d'organes. A côté des infections aiguës qui peuvent avoir des causes variées, les LPS peuvent également provenir des bactéries de la flore intestinale en petites quantités et être à l'origine d'une inflammation persistante « à bas bruit ». Cet état inflammatoire chronique et subclinique peut conduire à l'installation de maladies métaboliques, telles que le diabète de type II (DT2), l'obésité ou encore l'athérosclérose. Ces maladies font l'objet d'une croissance mondiale qui évolue de façon épidémique.

La protéine de transfert des phospholipides (PLTP), est une protéine plasmatique connue pour son implication dans le remodelage des lipoprotéines circulantes (chylomicrons, lipoprotéines de basse densité LDL et lipoprotéines de haute densité HDL). La PLTP est aussi capable de transférer les LPS aux lipoprotéines circulantes dans le compartiment vasculaire et joue ainsi un rôle clé leur détoxification, notamment au niveau hépatique. Cependant son effet sur les phénomènes de passage des LPS d'origine intestinale dans la circulation n'a pas été exploré.

L'objectif de ce projet est de préciser le rôle de la PLTP dans la translocation des LPS d'origine intestinale et ses conséquences en termes d'élimination des LPS, de réponse inflammatoire, et de mise en place des marqueurs des maladies métaboliques, notamment l'obésité liées à l'inflammation à bas bruit. Nous utiliserons un modèle expérimental de gavage de LPS chez des souris sous régime standard ou riche en graisses (HF) favorisant la prise de poids. La réponse inflammatoire, la quantité de LPS libres et associés aux lipoprotéines ainsi que la cinétique de translocation seront déterminés et comparés chez des souris de type sauvage (présentant une PLTP active) et chez des souris génétiquement modifiées déficientes en PLTP (PLTPKO)

Notre démarche expérimentale répondra aux exigences de la règle des 3R.

- Remplacement : Le protocole vise à élucider un mécanisme complexe mettant en jeu l'interaction de plusieurs tissus (intestin, foie), et dans le compartiment sanguin ce qui exclut l'utilisation de modèles *in vitro* ou de modèles animaux inférieurs dont le métabolisme lipidique et le système immunitaire sont trop éloignés de celui des mammifères. Nous utiliserons dans ce projet le plus petit modèle de mammifère, la souris, en tirant parti de l'existence d'un modèle transgénique n'exprimant plus la PLTP.

- Réduction : Les effectifs ont été optimisés sur la base des coefficients de variabilité reportés dans la littérature et les différences attendues entre les différents groupes pour les paramètres clés-de l'étude (concentrations de LPS à injecter, cinétiques ajustées).

- Raffinement : Afin de réduire la souffrance des animaux, les procédures chirurgicales seront toutes réalisées sous anesthésie. Des points limites seront déterminés. Le milieu d'hébergement des animaux sera enrichi. Toutes ces procédures seront réalisées par des expérimentateurs formés au bien-être animal.

Ces études nécessiteront au total l'utilisation de 280 souris.

18169 Le diabète de type 2 (DT2) est une des maladies majeures reconnue comme une priorité urgente et un enjeu majeur de santé publique. La mortalité et la morbidité associées à cette maladie entraînent des coûts exorbitants de santé qui ont été estimés à 500 milliards de dollars dans le monde. A ce jour, malgré un arsenal thérapeutique important, le traitement est loin d'être optimal et présente des effets secondaires non négligeables. Il apparaît urgent d'identifier de nouvelles pistes thérapeutiques pour optimiser le traitement de ces patients. Une nouvelle voie s'est ouverte depuis que des études ont montré que les effets bénéfiques de la Metformine, médicament très largement prescrit dans le traitement du DT2, résultent au moins pour partie de sa capacité à modifier les populations de bactéries présentes dans l'intestin. Ces récentes découvertes suggèrent que la modulation des bactéries intestinales pourrait permettre de contrôler et améliorer la maladie sans générer d'effet secondaire néfaste. Cependant, une analyse de la littérature a montré que le traitement des troubles de la régulation du taux de sucre dans le sang par des approches utilisant des bactéries était en réalité peu efficace. Il est donc nécessaire d'identifier de nouvelles bactéries pouvant être utilisées dans le traitement du DT2, en complément ou en synergie avec les médicaments de référence. Au cours d'études de criblage chez la souris, une souche de bactérie appelée *Bactéroides Faecichinchillae* (BAFA), a récemment révélé un potentiel antidiabétique intéressant.

L'objectif du projet est d'étudier les effets antidiabétiques de cette bactérie sous sa forme vivante (FA) ou inactivée (BAINA) dans un modèle de souris mâles rendues obèses et diabétiques par une diète riche en lipides et en sucre (HFS) pendant 12 semaines. La bactérie, vivante ou inactivée, sera administrée par voie orale pendant les 4 dernières semaines de régime afin d'étudier sa capacité à restaurer une bonne régulation des taux de sucre sanguin des animaux. La régulation

des concentrations de sucre dans le sang sera évaluée chez les animaux en mesurant à des temps précis la concentration de glucose dans le sang suite à une injection de glucose. Deux groupes contrôles traités avec une solution placebo seront constitués : un groupe nourri avec un régime standard et un groupe nourri avec le régime HFS. A l'issue du traitement, des prélèvements de sang et de tissus permettront l'analyse de multiples paramètres biologiques.

L'étude de la régulation des concentrations de sucre dans le sang requiert l'utilisation du modèle animal car il s'agit d'un phénomène physiologique impliquant un dialogue entre différents tissus comme les muscles, le foie et les bactéries intestinales. Les questions inhérentes à ce projet ne permettent donc pas la substitution du modèle animal à un autre modèle. Cependant, en accord avec la règle des 3R, des engagements pour réduire et raffiner au mieux le modèle dans ce projet seront suivis. Les souris seront surveillées tous les deux jours (tous les jours en période de gavages) afin d'identifier et de limiter tout risque de souffrance ou de mal-être. Des points limites ont été notifiés et s'ils sont atteints permettront de mettre fin à la procédure pour le ou les animaux concernés. Ce protocole expérimental ne constitue pas de double emploi. A notre connaissance, la question scientifique posée est originale et n'a encore jamais été étudiée. Ainsi, l'élaboration de ce protocole évite toute redondance avec des expériences précédentes. Un total de 80 souris mâles maximum est prévu dans ce projet sur une période de 3 ans. Ce nombre maximum d'animaux a été estimé nécessaire pour réaliser l'ensemble des analyses, satisfaire les études statistiques et tirer des conclusions permettant de répondre à la question scientifique.

18170 La fibrose est une complication souvent retrouvée dans les maladies pulmonaires chroniques. La plus commune est la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI). C'est une maladie chronique progressive et irréversible d'origine inconnue et de mauvais pronostic avec une espérance de vie de 2 à 5 ans suivant le diagnostic. En France, on compte 3000 à 5000 nouveaux cas par an, elle touche principalement les hommes de plus de 50 ans. Les facteurs de cette pathologie pulmonaire sont mal connus mais on sait que le tabagisme en est un. Les symptômes principaux sont un essoufflement anormal et une toux sèche. La FPI se caractérise par une accumulation progressive de tissu fibrotique conduisant à une destruction irréversible de l'architecture du poumon. La seule solution curative aujourd'hui est la transplantation avec cependant des traitements permettant une possibilité de ralentir la progression de la maladie.

Le vieillissement cellulaire ou la sénescence cellulaire est un mécanisme clé dans la physiopathologie des maladies liées à l'âge. Les dommages à l'ADN engendrent ce type de cellule qui se caractérisent par un arrêt de la prolifération cellulaire ce qui diminue la capacité de réparation du poumon et elles libèrent de nombreux facteurs toxiques appelés « secrétome associé à la sénescence » ou SASP. Nous avons précédemment montré que limiter la sénescence cellulaire et le SASP représente un objectif thérapeutique majeur dans la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), actuellement dépourvue de traitement curatif. Nous avons démontré que le récepteur 1 de la phospholipase A2 (PLA2R1) induisait la sénescence cellulaire. Un aspect intéressant au plan thérapeutique est que PLA2R1 active une voie de signalisation (la voie JAK2) qu'on peut inhiber pharmacologiquement grâce à des médicaments comme le ruxolitinib, qui sont donnés en clinique dans d'autres indications avec une très bonne tolérance. Le travail déjà réalisé a été conduit en partie sur des poumons et cellules de patients BPCO et témoins opérés pour chirurgie d'exérèse. Nous avons montré que PLA2R1 joue un rôle majeur dans l'induction de la sénescence cellulaire liée à la BPCO, et que le ruxolitinib s'oppose à la sénescence. Nous avons montré in vivo que des souris surexprimant PLA2R1 développent un emphysème et également une fibrose pulmonaire que l'on peut inhiber par le traitement au ruxolitinib. Ce traitement avait pour effet de diminuer plusieurs marqueurs moléculaires de fibrose pulmonaire induite dans ce modèle de souris. Nous nous intéressons maintenant au rôle de la voie JAK/STAT dans différentes pathologies pulmonaires et cela indépendamment du récepteur PLA2R1. Nous cherchons à comprendre le rôle de cette voie dans le développement de la fibrose pulmonaire et comprendre son rôle dans l'induction de la sénescence cellulaire.

Au vu des résultats préliminaires obtenus, l'hypothèse est que l'inhibition pharmacologique de la voie JAK/STAT par le ruxolitinib pourrait représenter une stratégie thérapeutique pour limiter les

altérations pulmonaires. Nous souhaitons ici, évaluer l'efficacité d'un traitement curatif et préventif par le ruxolitinib, dans un modèle murin de fibrose pulmonaire.

Le but de cette étude est de comprendre le rôle de la sénescence cellulaire dans le développement de la fibrose pulmonaire et de valider l'inhibition de JAK1/JAK2, indépendamment de PLA2R1, en tant que stratégie thérapeutique dans cette pathologie pulmonaire.

Deux types de souris seront utilisés : des souris non transgéniques, et des souris génétiquement modifiées nommées p16-luc. Chez les souris p16-luc, les cellules sénescents sont bioluminescentes, ce qui permet de les observer et de les quantifier par imagerie chez des souris vivantes. Dans notre étude, l'utilisation de la souris est indispensable car il s'agit d'une pathologie complexe faisant intervenir plusieurs types de cellules à la fois. Elle ne peut donc pas être conduite sur des cellules en culture. En réduisant au minimum le nombre de souris tout en garantissant l'obtention de résultats robustes scientifiquement et statistiquement, nous utiliserons 240 souris.

Les techniques utilisées et le mode d'hébergement des souris ont été raffinés afin de maintenir le bien-être des souris tout au long de l'étude.

18171 La principale indication de la stérilisation chez la lapine, outre le contrôle de la reproduction, est la prévention d'une tumeur utérine maligne qui touche particulièrement la lapine

: l'adénocarcinome (ADK) utérin.

En effet les lapines non stérilisées présentent un risque de 50% de développer un adénocarcinome après l'âge de 3 ans, et 80% après l'âge de 5 ans.

Ainsi, chez la lapine la stérilisation chirurgicale par ovariohystérectomie, c'est à dire l'ablation de l'utérus et des ovaires, est préconisée pour prévenir ce risque de développement d'adénocarcinome utérin, l'ovariectomie, c'est à dire le simple retrait des ovaires, n'étant pas toujours suffisante pour empêcher le développement de cette tumeur puisqu'après la maturité sexuelle (5 mois environ pour les Néo-zélandais blancs) l'imprégnation hormonale de l'utérus a lieu et peut conduire au développement d'un adénocarcinome utérin. En effet au moins deux cas de développement d'ADK utérin sont rapportés après une ovariectomie.

En parallèle la stérilisation sous coelioscopie, une technique chirurgicale moins invasive que la laparotomie, c'est à dire l'ouverture de l'abdomen, s'est développée chez la chienne et la chatte. Elle a montré son efficacité chez l'homme et chez les carnivores domestiques par (i) une récupération post-opératoire plus rapide, (ii) une douleur post-opératoire moindre comparativement à une chirurgie conventionnelle (iii) une inflammation post-opératoire moindre, (iv) une diminution de la fréquence des adhérences post-opératoires et (v) un temps opératoire plus court lorsque la technique est maîtrisée et le chirurgien expérimenté.

Toutefois seule une technique d'ovarohystérectomie assistée sous coelioscopie est décrite chez la lapine. Aucune ovariohystérectomie entièrement sous coelioscopie n'a été décrite. Cette technique n'est pas encore maîtrisée chez la lapine et présente certaines difficultés liées à l'anatomie de la lapine

: une cavité abdominale plus petite que chez le chien et le chat, un appareil digestif volumineux (surtout le cæcum mais aussi le côlon), les bourses ovariennes et ligament large de l'utérus chargés de tissu adipeux.

Ce projet a donc pour objectif de mettre au point une nouvelle technique d'ovarohystérectomie sous coelioscopie chez la lapine.

Ce projet respecte la règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer). En effet ce projet n'a jamais été réalisé auparavant et ne constitue donc pas une répétition inutile. Il se montre pertinent puisque l'anatomie de la lapine diffère réellement de celles du chien et du chat

: cavité abdominale plus petite, cæcum volumineux, tendance à la formation d'adhérence dans l'abdomen, bourse ovarienne et ligament large de l'utérus chargés de tissu adipeux, utérus duplex. Ainsi une extrapolation de la technique et des données acquises concernant l'ovarohystérectomie chez le chat et le chien est difficilement interprétable.

De plus dans le cadre de la description de durée opératoire, incidents, accidents et complications (par exemple: ligatures instables pour cause de charge graisseuse, accessibilité difficile des organes), suivi et récupération post-opératoire liés à une technique chirurgicale, il n'existe pas d'alternatives in vitro ou ex vivo. Ainsi le remplacement du modèle in vivo par un autre modèle n'est pas possible. Nous avons choisi de répéter cette procédure sur 6 animaux, ce qui est le nombre minimal pour détecter des événements indésirables fréquents. L'anesthésie et l'analgésie seront pratiquées selon les techniques mises en oeuvre en clinique dans cette espèce mais nous n'attendons pas de manifestations douloureuses particulières liées à l'ovariohystérectomie.

18172 Les infections intestinales induites par *Clostridioides difficile*, une bactérie pathogène, représentent un problème majeur de santé publique, pouvant entraîner la mort, en particulier chez des patients âgés, immunodéprimés ou atteints de déséquilibre du microbiote intestinal suite à une antibiothérapie. *Clostridioides difficile* est une bactérie anaérobie sporulée à gram positive qui produit des toxines plus ou moins virulentes selon les souches de *Clostridioides difficile*, pouvant se fixer sur la muqueuse intestinale et provoquer une diarrhée (parfois sanglante), de l'inflammation et de la nécrose intestinales. De plus, les spores de *Clostridioides difficile* survivent longtemps dans l'environnement, augmentant ainsi la propagation du risque infectieux. La viabilité de *Clostridioides difficile* peut néanmoins être influencée par l'écosystème bactérien intestinal et ses métabolites, des agents antimicrobiens et la réponse immunitaire de l'hôte. Aujourd'hui, il n'existe pas de traitement efficace à 100% et le taux élevé de récurrences remet en question les approches thérapeutiques actuelles. Le traitement antibiotique de référence au métronidazole rencontre de moins en moins de succès avec une résistance croissante de *Clostridioides difficile*. Des anticorps monoclonaux sont en cours de développement et la colonisation du tube digestif par administration orale de souches bactériennes non pathogènes ou la transplantation de microbiote fécal sain a récemment montré des résultats encourageants chez des patients atteints d'infections récurrentes.

Les objectifs du projet sont d'utiliser des souris possédant un microbiote intestinal contrôlé afin d'établir un modèle préclinique reproductible d'étude de « flores de barrière » résistantes à l'infection intestinale par *Clostridioides difficile*, puis d'évaluer à l'aide de ce modèle l'effet protecteur de souches bactériennes, dites « flores de barrière », qui ont montré une activité inhibitrice de la croissance de *Clostridioides difficile* en culture in vitro.

Les avantages escomptés sont une protection de la barrière intestinale contre la colonisation de *Clostridioides difficile* et une inhibition de l'infection. Le modèle d'infection expérimentale à *Clostridioides difficile* peut provoquer des dommages modérés à sévères sur le bien-être ou l'état général des souris.

L'utilisation d'un modèle préclinique est nécessaire afin d'évaluer l'activité fonctionnelle de ces isolats bactériens dans un système intégrant l'écosystème intestinal et la réponse immunitaire de l'hôte.

Le projet a été conçu pour respecter la règle des 3R : raffiner, réduire, remplacer. En effet, afin de réduire au mieux le nombre total d'animaux, des lots de 5 souris seront utilisés pour établir le modèle et réaliser une analyse statistique non paramétrique suffisante à ce stade. Le raffinement des conditions d'hébergement consistera en l'ajout de nids en coton, d'igloo et de bâtonnets en bois, et un suivi clinique quotidien des animaux sera effectué prenant en compte l'apparence générale, la posture, l'activité, la respiration, l'aspect des selles et le poids des souris permettant de déterminer des points limites précoces et d'éviter toute forme de souffrance des animaux. Ensuite, des lots de 8 souris seront utilisés pour évaluer chaque souche bactérienne candidate « flore de barrière » afin de permettre une analyse statistique paramétrique. Enfin, selon le nombre de souches *Clostridioides difficile* (1 à 5) et de flores de barrière (5 à 25) étudiées, un maximum de 700 souris sera utilisé sur 5 ans.

18173 *Staphylococcus aureus* est une bactérie pathogène particulièrement fréquente dans les infections acquises en ville (« communautaires ») et les infections acquises à l'hôpital (« nosocomiales »). Ce pathogène, en plus d'être doté d'un grand nombre de facteurs de virulence et de toxines est associé à une résistance élevée aux antibiotiques.

Dans ce contexte, des alternatives innovantes (anticorps) sont actuellement en développement et visent à neutraliser la ou les toxines pathogènes produites par *S. aureus* afin d'en diminuer la virulence. Considérant que la souris n'est pas sensible à l'action de certaines toxines, le choix s'est porté sur une autre espèce animale, le lapin, qui constitue un modèle de choix pour l'évaluation de l'efficacité de thérapeutiques dans les infections à *S. aureus*.

Le but de cette étude est donc d'évaluer l'efficacité d'un anticorps (SYN100) en association avec un antibiotique, le linézolide (LZD), dans un modèle de pneumonie à *Staphylococcus aureus* chez le lapin. Une précédente étude a déjà permis de déterminer la dose d'anticorps optimal pour l'observation d'une possible synergie avec un antibiotique. La durée de l'étude sera de 6 mois et concernera au maximum 52 animaux.

Dans le cadre de cette étude, une attention particulière a été apportée au respect de la règle des 3R.

Réduction : Le nombre d'animaux nécessaire pour répondre aux hypothèses et permettre une analyse statistique robuste a été réduit à 3 par groupe (répété 2 à 3 fois selon la phase d'étude) grâce à l'expérience acquise lors d'études similaires.

Raffinement : Les animaux seront hébergés dans un environnement adapté et enrichi. L'infection bactérienne sera réalisée sous anesthésie générale et les traitements seront administrés par voie intra-veineuse à l'oreille en une seule fois pour l'anticorps et par voie sous cutanée pour l'antibiotique (tout comme chez l'homme, ces types d'injections ne nécessitent pas d'anesthésie ou d'analgésie particulière). Des critères d'arrêt de l'étude, supportés par une grille de score clinique, ont été définis afin d'assurer le bien-être des animaux.

Remplacement : Dans le contexte de l'étude, le remplacement du modèle in-vivo pour la constitution d'une pneumonie expérimentale par un autre système n'était pas envisageable notamment pour des aspects de diffusion tissulaire et systémique.

18174 La mammite, inflammation de la glande mammaire, résulte principalement d'une infection bactérienne. Elle représente l'une des raisons les plus fréquentes de recours à l'antibiothérapie chez la vache laitière. Dans le but d'améliorer les résistances naturelles des vaches aux infections de la mamelle et de diminuer les phases morbides qui en résultent, il devient essentiel de développer de nouvelles stratégies pour lutter contre ces infections. Cela permettra ainsi de diminuer l'utilisation des antibiotiques et de fournir aux consommateurs des produits plus sûrs et plus naturels. Plusieurs études ont déjà rapporté les effets bénéfiques des β -glucanes (BG) de levure sur la santé dont l'amélioration de la résistance individuelle aux infections de façon non spécifique, les capacités de régénération tissulaire ou encore l'immunité, principalement la sécrétion de médiateurs immunitaires et les fonctions phagocytaires. Le terme « éducation immunitaire » a d'ailleurs été suggéré chez l'homme pour définir l'état renforcé des réponses immunitaires innées induites lors d'une infection secondaire. Cet état immunitaire renforcé est généré lors d'une exposition ponctuelle de l'animal à des beta-glucanes de levure en amont de l'infection.

Ainsi, le présent projet vise à :

- (i) Mettre au point des outils ex vivo de caractérisation de l'éducation immunitaire chez la vache laitière
- (ii) D'apporter la preuve de concept d'une éducation immunitaire chez la vache laitière en transition recevant des parois de levures enrichies en BG.
- (iii) D'évaluer la durée de cette éducation immunitaire en début de lactation

Afin de répondre à nos objectifs, des bovins adultes ($n = 20$) seront supplémentés oralement en en beta-glucane de levure 3 à 4 semaines pré-partum. Des prélèvements de sang sont faits avant et après vêlage et utilisés pour l'isolement des cellules mononucléaires périphériques sanguines (PBMC) permettant ainsi la récolte des monocytes. Ces derniers pourront être infectés par d'un LPS (lipopolysaccharides) ou non afin de mimer un challenge infectieux.

Ce modèle infectieux permettra de respecter la règle des 3R:

- 1) Remplacer : la méthode ex-vivo nous permettra de mieux appréhender les infections mammaires car nous remplaçons les tests in vivo avec infection bactérienne qui induit généralement un état d'inconfort et de douleur chez l'animal,
- 2) Réduire : nous souhaitons réduire le nombre de prélèvements sanguins afin de mieux cerner la fenêtre de tir pour atteindre l'objectif d'un seul prélèvement pour nos tests ex-vivo
- 3) Raffiner : nous travaillons sur un protocole de 5 prélèvements sanguins sur une durée 70 jours. Ceci nous permet une contention légère des animaux avec un intervalle entre prélèvement qui réduit le stress à la contention.

18175 Les dysbioses suite à des colites sont fréquentes chez l'homme. Une meilleure compréhension du métabolisme et de la physiologie des entérobactéries pourrait permettre de proposer des approches pour traiter les dysbioses. Il est donc important de recueillir des informations sur le type de métabolisme bactérien dans l'intestin en condition normale mais également lors de colites qui entraînent une dysbiose impliquant une expansion de la population d'entérobactéries parmi lesquelles E. coli, utilisée comme modèle.

De plus, comprendre le rôle des différentes quinones d'E. coli (ubiquinone et ménaquinone) aux différents stades de la colonisation intestinale éclairera l'impact physiologique potentiel d'une inactivation sélective des voies de biosynthèse des quinones et pourrait permettre de révéler de nouvelles cibles pour le contrôle d'entérobactéries pathogènes impactant négativement la santé humaine.

La biosynthèse du coenzyme Q emploie deux voies de biosynthèse différentes selon que la bactérie E. coli est en contact ou non avec le dioxygène. Comme E. coli est connue pour faire partie de la flore intestinale et que l'intestin est un milieu pauvre en dioxygène, il faut tester si l'une ou l'autre des voies de biosynthèse du coenzyme Q est importante pour le développement d'E. coli dans l'intestin de souris. La souris est l'espèce la plus susceptible de fournir des résultats satisfaisants et comparables aux études publiées. La colonisation bactérienne de l'intestin ne peut être obtenue et analysable que dans un organisme entier.

Afin de répondre à cette question des expériences de compétition seront réalisées entre une souche d'E. coli sauvage et des souches inactivées pour des gènes d'intérêt (nommées «mutants» ci-après). Ces compétitions seront réalisées dans l'intestin des souris et la capacité de chaque souche à coloniser l'intestin sera suivie par dénombrement des bactéries dans les fèces de souris.

Avant les expériences de compétition entre les souches sauvages et mutantes, une première expérience contrôle sera réalisée pour vérifier que les souches sauvages utilisées sont capables de coloniser l'intestin de souris de façon stable sur 30 jours, comme décrit dans la littérature. Nous dénombrerons les bactéries dans les fèces fraîchement récoltées sur animaux vigile par simple préhension-contention.

Chaque souche sera testée sur un groupe d'animaux. Chaque groupe sera constitué d'un nombre minimal et suffisant afin de permettre un traitement statistique approprié des résultats le cas échéant. 2 souches sauvages et une dizaine de souches mutantes E. coli seront testées en utilisant 3 souches distinctes de souris (consanguines, non consanguine), des dilutions et des conditions de cultures bactériennes judicieuses. Au total, 113 souris seront nécessaires à la réalisation de ce projet. Certains groupe expérimentaux seront soumis à un traitement per os provoquant une colite limitée (perte de poids transitoire éventuelle limitée à 20%). Il n'y a pas d'effet délétère de l'alimentation et de la boisson fournie pour l'expérimentation. Dans ces expériences, la flore intestinale anaérobie ne sera pas affectée par le traitement antibiotique. Ce traitement n'entraînera pas de souffrance des animaux, ni d'effet délétère notoire et durable sur leur santé. Une angoisse de niveau léger est générée par le gavage. Ce stress sera limité par la manipulation habituelle et répétée des animaux. Les animaux pourront être maintenus en vie à l'issue de ce projet et être éventuellement réutilisés.

18176 La maîtrise du moment de l'ovulation permet d'optimiser l'insémination des poulinières et représente un intérêt économique important pour les éleveurs. Cependant à l'heure actuelle les éleveurs ne

possèdent qu'un faible nombre de molécules capables d'induire l'ovulation. De plus ces molécules ne donnent pas des résultats terrain complètement satisfaisants. Dans ce contexte, la recherche de nouvelles molécules plus performantes représente un intérêt majeur pour la filière équine. Les résultats d'études précédentes montrent que le C6 (analogue de la kisspeptine) serait un bon candidat pour la maîtrise de l'ovulation chez la jument. Nous avons déjà pu montrer que son injection chez la jument permet l'augmentation de la sécrétion d'hormones clé pour le déclenchement de l'ovulation. Avec ce nouveau protocole nous voulons donc tester la capacité de notre molécule à induire l'ovulation chez la jument. Nous utiliserons seize (16) ponettes Welsh qui seront réparties en deux lots de 8 animaux où un groupe sera traité avec du sérum physiologique et un autre sera traité avec du C6.

La réalisation de ce protocole se fera dans le respect des 3R.

Remplacer: Nous cherchons à tester l'effet inducteur de l'ovulation de notre molécule chez la jument, nous souhaitons donc nous placer chez cette espèce pour l'administration de notre molécule.

Réduire : Nous avons précédemment réalisé des procédures qui nous ont permis de définir une dose de C6 que nous estimons la plus appropriée pour obtenir un effet sur le taux d'ovulation. Nos précédents protocoles réalisés sur l'espèce équine nous ont permis de voir que des groupes de 8 animaux nous permettaient d'effectuer nos analyses statistiques.

Raffiner : Les animaux seront hébergés dans des conditions optimales (paille et foin de qualité, soins quotidiens) sur leur lieu d'élevage et ils seront également répartis en groupe ce qui permet le respect du comportement grégaire de l'espèce équine. La procédure de cathétérisme intra veineux est réalisée sous anesthésie locale et les prélèvements sont effectués par du personnel qualifié et spécifiquement formé.

Avenant : si l'expérience décrite précédemment est un succès une procédure d'induction de l'ovulation avec un protocole utilisé en clinique vétérinaire sera mis en place. 24 juments divisées en 4 lots de 8 animaux seront traitées soit avec du sérum physiologique, de la buspérone (inducteur commercialisé), du C6 ou du NGF (autre possible inducteur de l'ovulation que nous souhaitons tester sur le même protocole pour réduire le nombre d'animaux dans nos procédures)

18177 L'insomnie est l'un des principaux problèmes de santé publique qui touche environ 10 à 30% de la population mondiale.

Il a été démontré que la privation de sommeil a un grand impact sur la vie quotidienne des sujets sains, affectant la vigilance, l'attention, la concentration, les capacités cognitives, la mémoire, l'humeur et la douleur.

Les médicaments sédatifs-hypnotiques, y compris les benzodiazépines et les non-benzodiazépines, sont les traitements les plus courants de l'insomnie. Cependant, les préoccupations concernant les modes d'utilisation inappropriée, la dépendance et les effets indésirables ont conduit à la prudence dans la prescription de ces médicaments sédatifs-hypnotiques.

Les preuves pharmacologiques suggèrent que la cible moléculaire des plantes médicinales ayant une activité sédatif-hypnotique s'est principalement concentrée sur le site benzodiazépine des récepteurs GABA A.

(Les récepteurs GABA sont le principal neurotransmetteur inhibiteur dans le SNC)

Les récepteurs des neurotransmetteurs GABA, en particulier le sous-type de type A (récepteurs GABA A), ont reçu une attention considérable en tant que site d'action pour des médicaments agissant comme anxiolytiques, sédatifs, anticonvulsivants et relaxants musculaires.

La potentialisation du temps de sommeil au pentobarbital est un test préclinique in vivo sur des rongeurs couramment utilisé pour tester des composés ayant une activité hypnotique ou anti hypnotique potentielle.

Le but de la présente étude sera d'examiner si un composé induit un effet hypnotique dans le test de sommeil induit par le pentobarbital chez la souris.

Une étude standard comprend 50 animaux répartis en 5 groupes de 10 souris:

- 1 groupe contrôle (pentobarbital seul)
- 1 groupe qui reçoit la molécule de référence ici le "Muscimol" qui est un agoniste puissant des récepteurs GABA A. (pentobarbital + Muscimol)
- 1 groupe qui reçoit le produit testé à 3 doses. (pentobarbital + produit testé)

Des études peuvent comprendre un nombre plus élevés ou plus faible d'animaux (par exemple pour l'étude d'un nombre de doses supérieur ou inférieur).

Le nombre maximum de produits testés par an est de 10. Le nombre total maximum d'animaux utilisées sur 5 ans est de $2\ 500 = 50 \text{ animaux/étude} \times 10 \text{ études/an} \times 5 \text{ ans}$.

Respect de la règle des 3R :

- Réduire. Le nombre total d'animaux utilisés pour une étude est fonction du nombre de groupes et du nombre d'animaux par groupe nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement interprétables.

- Justification du nombre de groupes: 1) Le groupe témoin est nécessaire à chaque expérience compte tenu des variations de performances entre lots d'animaux; 2) Le groupe produit de référence est nécessaire pour valider l'expérience et pour comparer l'efficacité du produit testé à un produit de référence. Le produit de référence utilisé dans cette étude est le Muscimol qui est un agoniste puissant des récepteurs GABA A; 3) Il est généralement nécessaire de tester le produit à trois doses pour mesurer la relation dose-effet, mais un nombre de doses inférieur ou supérieur peut être justifié en fonction de l'état de connaissance du produit.

- Justification du nombre d'animaux par groupe. Compte tenu de la variabilité interindividuelle des variables mesurées dans ce test, ce nombre a été fixé à 10 animaux par groupe. L'utilisation d'un nombre inférieur d'animaux a une probabilité importante d'entraîner la non-validité de l'étude, conduisant à la refaire, et par conséquent à utiliser un nombre d'animaux plus élevé.

- Raffiner. Des animaux présentant des signes de souffrance sont euthanasiés. Outre la motivation éthique conduisant à cette euthanasie, celle-ci est requise pour des raisons expérimentales, la souffrance d'un animal biaisant les variables comportementales mesurées. L'utilisation de traitements pour pallier à cette souffrance est exclue, ces types de traitement étant susceptibles de modifier le comportement des animaux et l'action pharmacologique des produits étudiés.

Pour l'évaluation de la souffrance, de la détresse et de l'inconfort des animaux: 1) Les animaux sont d'abord attentivement observés sans être dérangés: l'observation des différentes postures permettent d'évaluer un comportement normal ou anormal. La réaction des animaux à un stimulus externe peut être également vérifiée (ex: bruit léger) avant de s'approcher directement de la cage pour manipuler les animaux. 2) Ensuite, les animaux sont manipulés pour l'examen clinique. Durant celui-ci, les signes et des mesures (dont celle du poids de l'animal) sont notés dans une grille de scoring (définie ci-dessous).

-Remplacer. Il n'existe pas à ce jour de modèle n'utilisant pas d'animaux ou nécessitant un nombre plus réduit d'animaux ou ayant un degré de sévérité inférieur permettant d'obtenir des informations équivalentes à celles obtenues par le présent modèle.

18178 L'évolution des modes de reproduction représente un enjeu de recherche crucial dans le contexte des changements globaux. Il s'agit de comprendre si la balance des coûts et des bénéfices associés aux stratégies reproductrices est adaptée aux nouvelles contraintes environnementales. Les reptiles sont des modèles particulièrement pertinents. Chez au moins cinq espèces de lézard deux modes de reproduction coexistent dans des populations distinctes (ovoviviparité et viviparité). En France, c'est le cas du lézard vivipare (*Zootoca vivipara*), dont les femelles des populations d'Aquitaine-Pyrénées pondent des oeufs (oviparité) alors que sur le reste de la distribution, les femelles mettent bas des nouveau-nés à terme (viviparité). Pour des latitudes équivalentes, la forme ovipare se retrouve dès le niveau de la mer (Aquitaine) à des températures particulièrement chaudes, lorsque la forme vivipare ne se trouve plus qu'au dessus de 1000 m d'altitude (Massif Central). Cette observation suggère des réponses différentes aux conditions climatiques.

Nous allons étudier la physiologie (consommation d'oxygène et pertes hydriques) chez le lézard vivipare (femelles reproductrices) en comparant les deux formes (ovipares et vivipares). Nous échantillonnerons quatre populations distinctes pour chaque mode reproducteur (8 populations au total). Sur une base de 20 femelles maximum par population, cela amène à un effectif maximal de 160 individus. Nous mesurerons le métabolisme de repos et les pertes hydriques totales à 3 températures (15, 25, 33°C). Ces mesures seront réalisées à différentes périodes (début, milieu et fin de reproduction). Il sera alors possible de comparer l'importance des budgets énergétiques et hydriques pendant la reproduction et comprendre l'impact des conditions environnementales sur la physiologie et la démographie de cette espèce. Au regard des résultats documentés, nous prédisons une augmentation importante des contraintes physiologiques en fin de gestation des femelles vivipares, ce qui expliquerait la raison pour laquelle cette forme est plus sensible aux conditions climatiques.

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

- Remplacement: les questions étudiées concernent spécifiquement le lézard vivipare qui est l'une des très rares espèces présentant une bimodalité de reproduction. Il n'est pas possible de remplacer les lézards par d'autres processus.
- Réduction: nous avons réduit au minimum les effectifs par groupes (20 individus) pour pouvoir détecter des effets interprétables statistiquement.
- Raffinement: les conditions de captivité seront optimisées avec un enrichissement du milieu (différents abris, substrat) répondant aux besoins de l'espèce

18179 La radiothérapie (RT) est une arme thérapeutique majeure pour la prise en charge des patients atteints de cancer et concerne plus de 50 % des patients. Cependant, malgré de nombreuses avancées, les techniques de radiothérapie restent limitées par leur capacité à délivrer une dose toxique suffisante au sein de la tumeur tout en épargnant les tissus environnants. Parmi les nombreux types d'agents radiosensibilisants étudiés, les nanoparticules (NPs) métalliques présentent de nombreux avantages. Ainsi, les NPs AGuIX® à base de gadolinium, ont déjà prouvé leur efficacité dans une dizaine de modèles *in vivo* et font actuellement l'objet de 2 essais cliniques. Ces nanoparticules présentent 2 avantages : (i) Leur petite taille (<3 nm) qui permet leur accumulation dans la tumeur et une élimination rénale et (ii) la présence de métal, tel que le gadolinium, qui entraîne une augmentation locale de l'effet de la RT.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'efficacité thérapeutique d'une nouvelle génération de NPs combinant les propriétés citées ci-dessus avec un effet anti-métastatique lié à une déplétion de métaux dans un modèle murin de cancer du sein métastatique.

Pour cela, l'étude sera menée selon 3 procédures utilisant au total 144 souris femelles qui auront reçu une injection de cellules tumorales de cancer du sein métastatique :

(i) La première procédure (18 souris) a pour objectif de s'assurer de la capacité de ce modèle à développer des métastases, de déterminer leur délai d'apparition et leur localisation. Pour cela, les souris seront mises à mort à 3 temps prédéfinis et le nombre de métastases sera évalué.

(ii) La seconde procédure (30 souris) a pour objectif d'étudier la biodistribution des NPs dans la tumeur afin d'optimiser le schéma thérapeutique. Pour cela, les souris recevront une ou plusieurs injections de NPs, puis seront mises à mort à des temps définis et la quantité de NPs intratumorale sera déterminée.

(iii) La troisième procédure (96 souris) a pour objectif d'évaluer l'efficacité radiosensibilisante et anti-métastatique des NPs. Pour cela, les souris recevront 4 injections de NPs et seront soumises à une radiothérapie photonique séquentielle sur une semaine.

Cette étude constitue un pré requis incontournable à une étude clinique de phase 1 chez l'homme. De ce fait, l'utilisation d'un modèle *in vivo* immunocompétent, seul capable de reproduire la complexité du développement tumoral et de la réponse immunitaire dans le contexte d'un organisme entier, avec toutes les interactions possibles, est indispensable pour se rapprocher au

plus près de la pathologie humaine. Il n'existe pas à l'heure actuelle de modèle informatique, ni de modèle in vitro, pouvant remplacer ce modèle animal (Remplacement).

Le nombre d'animaux a été calculé a minima par rapport à l'effectif nécessaire pour une exploitation statistique des résultats (Réduction) et a donc été fixé à 144 souris au total.

L'observation de signe de souffrance entraînera une administration d'antalgiques (doliprane pendant 24 h, puis Métacam pendant 24 h). Une absence d'amélioration après la prise d'antalgiques, une taille des tumeurs importante ou interférant avec la locomotion des animaux entraînera la mise à mort des animaux en conformité avec les recommandations éthiques (Raffinement). En cas de léger problème de locomotion, des croquettes et de l'eau gélifiée seront ajoutées dans la cage.

La procédure expérimentale relève d'une classe de gravité modérée.

18180 La pelade (ou alopecie auto-immune) est une maladie entraînant la perte des poils ou de cheveux. La cause de cette maladie est un mécanisme auto-immun qui conduit à une attaque du système pileux par le système immunitaire. L'analyse microscopique de la peau de la zone montre que le follicule pileux est entouré de lymphocytes, cellules de l'immunité. Cependant, le follicule pileux n'étant pas détruit, il est possible d'intervenir pour traiter les individus souffrant de cette pathologie.

Chez l'homme, le risque de développer durant sa vie une pelade est d'un peu moins de 2 % quel que soit le sexe. Si les formes modérées ne nécessitent pas de traitement, les formes sévères sont traitées par injection de corticoïdes dans la zone glabre et, quand ceux-ci ne suffisent plus, des traitements immunosuppresseurs généraux sont proposés. Cependant ces traitements restent peu efficaces et sont souvent associés à effets secondaires importants.

Nous avons récemment testé les effets de la stimulation électrique sous-cutanée pour le traitement du psoriasis qui est une maladie immunitaire inflammatoire affectant la peau. Nous avons ainsi pu montrer que la stimulation sous cutanée inhibe le développement de cette pathologie. Les effets bénéfiques de l'électrostimulation cutanée sur le psoriasis nous encouragent donc à explorer les effets de cette thérapie dans d'autres pathologies cutanées immuno-induites comme la pelade.

L'objectif de ce projet est donc d'évaluer l'effet de l'électrostimulation des territoires cutanés sur le développement de la pelade chez la souris.

Pour cela le projet consiste à :

- 1- induire une pelade chez des souris de façon synchrone par transfert de lymphocytes provenant de souris ayant développé une pelade spontanément dans notre colonie ;
- 2- implanter une électrode de stimulation sous-cutanée chez la souris lorsque les premiers symptômes de l'alopecie apparaîtront ;
- 3- et appliquer ou non des sessions d'électrostimulation.

Différents paramètres d'électrostimulation seront testés. La comparaison de l'étendue de la perte de poils entre les animaux ayant subi une électrostimulation (groupe expérimental) et ceux n'ayant pas subi cette électrostimulation (groupe contrôle) nous permettra de déterminer les paramètres optimaux pour inhiber le développement de la pelade.

Le nombre total de souris utilisées pour ce projet est de 606. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, les expérimentations seront arrêtées dès qu'un effet thérapeutique de 80% d'inhibition de la surface dépilée sera observé par rapport aux souris non électrostimulées. Des raffinements sont proposés notamment pour limiter la souffrance animale en mettant en place des protocoles adaptés d'anesthésie et d'analgésie complétés par un suivi postopératoire comprenant la mise en place des points limites précoces et adaptés. L'utilisation de l'animal est indispensable à la conduite de cette étude car elle repose sur le traitement d'animaux développant une maladie de façon spontanée.

18181 La transplantation d'organes est le traitement de référence pour augmenter l'espérance de vie de patients atteints de défaillance chronique terminale d'un organe vital (rein, poumon, cœur, foie). Les progrès réalisés au cours de la dernière décennie dans la prise en charge et les traitements immunosuppresseurs administrés aux patients transplantés se sont révélés efficaces pour prévenir

et traiter le rejet cellulaire aigu du greffon, qui risque de se développer au cours des semaines et mois qui suivent la transplantation. Le rejet chronique, en revanche, reste un problème médical majeur irrésolu, limitant la longévité du greffon, la qualité de vie et la durée de vie des patients transplantés. La recherche de nouvelles thérapies limitant le rejet chronique constitue donc un enjeu majeur dans la prise en charge des patients après transplantation d'organe.

Un des problèmes majeurs et récurrents survenant lors du rejet chronique du greffon est la vasculopathie de transplantation (VT), qui se caractérise par une obstruction des vaisseaux du greffon, ce qui conduit à un défaut d'approvisionnement en sang de celui-ci, menant à sa perte de fonction (rejet). La VT est résistante aux traitements immunosuppresseurs actuellement utilisés en clinique : ainsi, 90 % des patients ayant reçu une greffe rénale développeront une VT 10 ans après transplantation.

Ce projet vise à trouver de nouveaux traitements pour prévenir le développement de la VT. Des résultats préliminaires que nous avons obtenus ont montré d'une part un rôle des anticorps produits par les lymphocytes B dans le développement de la VT, et d'autre part ont identifié une infiltration de lymphocytes B de type inné au cours d'un rejet d'organes. Il nous reste à comprendre comment prévenir le rôle des lymphocytes B innés dans le développement de la VT, quels anticorps ils produisent et comment bloquer l'action de ces anticorps sur la paroi des artères du greffon.

Afin d'élucider ces points, ce projet utilisera deux modèles de VT développés par la souris greffée. Le premier modèle (transplantation aortique) consiste à greffer des aortes prélevées à des souris donneuses à des souris histoincompatibles (à l'image des donneurs et receveurs humains). Les souris développeront ainsi une VT à l'intérieur du greffon aortique au bout de 8 semaines après transplantation. Ce projet caractérisera le rôle des lymphocytes B dans le développement de la VT. Nous utiliserons également des inhibiteurs pharmacologiques des voies moléculaires activées par les anticorps dans la paroi artérielle pathologique afin de prévenir la VT. Les inhibiteurs les plus efficaces, et ayant donc une portée clinique à moyen/court terme, seront validés dans un modèle de VT plus technique, mais encore plus intégré que la transplantation aortique : le modèle de VT après transplantation rénale chez la souris. Les transplantations rénales constituent en effet 70% du volume total de transplantations en France, soulignant l'urgence d'élaborer de nouveaux traitements pour les greffés du rein.

Une attention toute particulière au bien-être des animaux sera portée par l'application stricte de la règle des 3R dont les objectifs sont de réduire au maximum le nombre d'animaux, de raffiner en supprimant ou soulageant l'inconfort, la détresse et l'angoisse subis par les animaux et de remplacer l'utilisation des animaux en travaillant sur des cellules ou des tissus. Dans le cadre du raffinement, une procédure de prise en charge de la douleur (utilisation d'anesthésiant et d'antalgiques) sera mise en place avant, pendant et après les opérations chirurgicales afin de limiter la douleur et le stress et permettant une récupération optimale des animaux (utilisation de tapis chauffants, observation quotidienne des animaux). Des points limites seront fixés et particulièrement observés au cours du projet permettant d'euthanasier les animaux dès leur apparition. Ces points limites se manifestent par des signes de douleur tels que la prostration, un rythme cardiaque irrégulier, un isolement vis-à-vis de congénères, une mauvaise alimentation au travers de la surveillance de la prise de boisson et denourriture. Enfin, les conditions d'hébergement incluront les mesures de raffinement adéquates afin de limiter le stress des animaux (enrichissement du milieu de vie, respect de la sociologie et de leur vie en groupe, surveillance quotidienne). Ce modèle d'étude animal ne peut par ailleurs pas être remplacé par un modèle in vitro car la validation finale de nouvelles molécules thérapeutiques nécessite d'utiliser un organisme dans son entier. En effet, l'approche sur cellules ne renseignerait pas sur l'ensemble des mécanismes impliqués. De plus les approches informatiques ne permettent pas à ce jour d'avoir accès à la fonction d'un organisme. L'ensemble des effets étudiés étant des effets physiologiques ou physiopathologiques, il n'y a pas d'autre alternative d'étude que l'utilisation de souris. Il est impossible de modéliser le rejet d'un organe greffé dans une boîte de Pétri, puisque ce processus implique une interaction entre tous les constituants de l'organisme (greffon, sang circulant, système immunitaire).

Le nombre d'animaux a été réduit au maximum en respectant les contraintes de publication, sans compromettre les objectifs du projet et pour permettre de bonnes analyses statistiques (test Mann-

Withney, test non-paramétrique permettant de comparer deux échantillons indépendants de petite taille) et les expérimentations ont été optimisées pour être regroupées chez le même animal dès que possible. Les études statistiques antérieures ont montré que des groupes de 20 animaux (10 donneurs + 10 receveurs) sont en moyenne requis pour obtenir une distribution normale des mesures. Nous estimons utiliser au total 800 animaux.

Le protocole mettant en place des procédures d'expérimentation animale évaluées comme sévères, une évaluation rétrospective sera mise en place à l'issue du protocole par la SBEA locale.

Les modèles de transplantation chez la souris seront mis au profit de notre compréhension des processus menant à la VT, ce qui nous permettra de trouver de nouvelles thérapies pour venir en aide aux patients greffés.

18182 Le psoriasis est une maladie auto-immune de la peau qui touche 1 à 3 % de la population mondiale. Chez l'homme, le psoriasis se caractérise par des lésions rouges et squameuses du cuir chevelu, des genoux et des coudes, associées à une atteinte des ongles. Dans les cas graves, l'atteinte cutanée peut être généralisée (érythrodermie) et il peut exister des atteintes des articulations. Cette dermatose évolue de façon chronique avec des poussées entrecoupées de périodes de rémissions de durée variable au cours desquelles les lésions sont minimales. Il n'existe pas de traitement curatif efficace à ce jour. Les traitements utilisés sont symptomatiques et permettent de réduire les signes cliniques.

Il est donc important d'avoir un modèle préclinique prédictif du psoriasis. Afin d'évaluer l'efficacité de nouvelles molécules thérapeutiques, il est indispensable de tester ces molécules dans ce modèle pour plusieurs raisons :

- Il n'existe pas de modèle *in vitro* de psoriasis pouvant remplacer complètement la peau en tant que tissu biologique vivant. Il existe cependant des modèles *in vitro* qui permettent d'effectuer un premier criblage d'efficacité de molécules, mais cette efficacité doit ensuite être confirmée chez l'animal.
- Ces modèles *in vitro* ne permettent pas de tester des produits thérapeutiques ou des dispositifs médicaux appliqués directement sur la peau en application externe (voie dermique / topique).
- L'efficacité ne pouvant être complètement testée *in vitro*, des premières preuves d'efficacité *in vivo* doivent être apportées avant de passer au stade clinique de développement de ces molécules (tests cliniques chez l'homme).

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

Il est prévu d'utiliser 1200 souris (6 lots de 40 souris par an) sur une période de 5 ans pour permettre l'évaluation de l'efficacité de molécules pharmaceutiques ayant une indication anti-psoriasis.

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

- Remplacement des animaux d'expérience : L'utilisation des animaux en tant que modèle animal de psoriasis ne sera utilisée qu'en dernier recours après des tests préalables de criblage et d'efficacité *in vitro*.
- Réduction des animaux: Le design de l'étude étant un plan d'expérience contrôlé en mesures répétées, le nombre d'animaux est réduit à 8 animaux par groupe. De plus, le projet comprend une procédure incluant une évaluation en imagerie non invasive (tomographie optique de cohérence) du psoriasis afin d'appliquer un suivi longitudinal de la pathologie. Grâce à cette technique d'imagerie, un même lot d'animaux peut être évalué à plusieurs reprises (suivi longitudinal) et évite l'utilisation de plusieurs lots d'animaux évalués en procédure terminale à différents temps. A terme cette procédure permettra de réduire le nombre d'animaux.
- Raffinement : Evaluation de points finaux tous les jours (poids, état d'hydratation, comportement de l'animal, état des lésions induites), enrichissement du milieu dans les cages (igloo, coton et bûchette de bois) et utilisation de techniques d'imagerie innovantes.

Afin de minimiser le potentiel de souffrance et/ou de détresse chez les animaux, les points limites établis en concertation avec le Comité de Suivi du Bien-Etre Animal (SBEA) de notre établissement, sont les suivants :

- Défaut d'alimentation et /ou de boisson sur une période de 24 à 48h se traduisant par un amaigrissement et une déshydratation;
- Perte de poids >20% du poids normal maintenue sur 72h;
- Hypothermie persistante, décelée par un animal froid au toucher et réticent à bouger;
- Difficulté respiratoire, avec augmentation du rythme respiratoire
- Plaie nécrosée, purulente ou exsudative
- Complication sur le site d'application de la molécule topique (présence de plaie, douleur lors de l'application. . .)

Si un de ces points limites est atteint, les animaux seront euthanasiés.

18183 Dans le cadre des activités de recherche et de développement de nouveaux candidats-médicaments humains, un certain nombre d'études in vitro et ex vivo nécessite la mise à disposition de matrices biologiques d'origine animale (sang, urine, tissus, organes...). Ces études complémentaires des approches in vivo, limitant le recours à l'animal, sont essentielles pour comprendre les processus pathologiques, identifier des cibles d'intérêt et sélectionner les meilleurs candidats médicaments.

Ce projet couvre la réalisation de prélèvements chez différentes espèces animales afin de fournir les matrices biologiques aux équipes de recherche. Ces prélèvements servent principalement à la mise en culture cellulaire, aux études sur tissus isolés ou encore à la validation des méthodes de dosages analytiques réalisés sur les échantillons générés dans les études de toxicologie et pharmacocinétique. Afin de réduire le nombre global d'animaux utilisés, les prélèvements seront réalisés en priorité sur des animaux provenant d'autres projets (réutilisation).

Une banque de matrices biologiques peut être congelée et mutualisée pour les équipes afin d'avoir à disposition des tissus lors de demandes ultérieures et limiter ainsi le nombre d'animaux utilisés (réduction). Les prélèvements non terminaux sont majoritairement des prélèvements sanguins réalisés conformément aux bonnes pratiques en limitant les volumes et la fréquence des prélèvements. Des prélèvements peuvent être réalisés sous anesthésie et avec analgésie adaptée (raffinement) le cas échéant (ex. moelle osseuse), entraînant des contraintes légères à modérées pour l'animal.

Enfin, exceptionnellement, les prélèvements sont réalisés sous anesthésie sans réveil de l'animal. Le nombre d'animaux utilisés sur 5 ans sera au maximum de : 500 souris, 500 rats, 100 cobayes, 200 lapins, 150 chiens, 50 miniporcs et 200 primates non-humains.

18184 L'inflammation joue un rôle important dans le développement de cancers colorectaux et progressivement différentes voies impliquées dans le contrôle de cette inflammation émerge. L'étude des mécanismes permettant aux cellules intestinales de s'adapter au stress inflammatoire a permis de mettre en évidence l'éventuelle implication d'une nouvelle protéine. L'étude de son expression sur des échantillons humains montre que cette protéine est exprimée dans les lésions pré-malignes et les cancers colorectaux. Les objectifs de ce projet sont d'évaluer à l'aide d'une lignée génétiquement modifiée l'implication de cette protéine dans le développement de cancers colorectaux, développés sur un contexte inflammatoire ou non. Le choix d'utiliser la souris repose sur le fait que seules des expériences chez l'animal permettent à ce jour de récapituler la complexité de l'intestin avec ces différentes composantes (muqueuse intestinale, système immunitaire et flore intestinale) et sur les similitudes entre la souris et l'homme. Pour chacun de ces aspects étudiés, des expériences pilotes menées avec un nombre minimal de souris a permis (ou permettra selon) d'affiner cette étude en définissant les points limites adaptés et le nombre d'animaux minimum à intégrer dans les cohortes pour avoir une réponse scientifique statistiquement significative, et de limiter au maximum la souffrance de ces animaux. Les souris seront dans un premier temps suivies pour comprendre comment la perte de cette protéine en soi influe sur l'intégrité de la muqueuse intestinale et le développement de maladies métaboliques associées. Les souris seront ensuite soumises à des traitements mimant des conditions d'inflammation aiguë ou chronique pour suivre

comment la perte de cette protéine influe sur l'intégrité de la muqueuse intestinale, la réponse inflammatoire et le développement de lésions. Les études se feront après autopsie par des analyses biochimiques, pathologiques et moléculaires. L'étude sera enfin élargie à un modèle murin de carcinomes colorectaux pour confirmer que l'absence de cette protéine augmente l'incidence et la localisation des tumeurs, collecter ces tumeurs pour ensuite analyser les mécanismes associés. Les conditions d'hébergement et le suivi des animaux seront optimisés pour assurer leur bien-être et réduire au maximum leur souffrance.

Nombre d'animaux inclus : 184

18185 Selon des chiffres de l'INSERM, la douleur est à l'origine de 2 consultations médicales sur 3 et 30% des adultes vivent avec des douleurs chroniques. La douleur a de nombreuses conséquences sur la vie des personnes affectées : dégradation de la récupération après une blessure ou une maladie lorsqu'elle est mal maîtrisée, risques de développement de douleurs chroniques, association avec des troubles anxieux ou dépressifs, altérations de la qualité de vie, etc. L'impact socio-économique de la douleur est majeur mais les options thérapeutiques pour la prise en charge de la douleur restent limitées. Les opioïdes utilisés pour les douleurs sévères sont associés à des effets secondaires importants et les antidépresseurs et antiépileptiques utilisés pour le traitement de la douleur sont efficaces chez 1 patient sur 2 seulement. Il est donc impératif d'élargir l'arsenal thérapeutique. Disposer de modèles animaux reproduisant fidèlement les différents types de douleurs existant chez l'homme est un point critique dans le développement de nouvelles molécules thérapeutiques. L'objectif de ce projet est de développer 3 modèles de douleurs chez la souris pour permettre de tester des candidats médicaments. Ces 3 modèles permettent de représenter des origines de douleurs différentes chez l'homme, pour lesquelles les traitements actuellement disponibles sont insuffisants : douleurs causées par les traitements chimio-thérapeutiques, douleurs d'origine inflammatoire ou causée par opérations/chirurgies. Nos activités s'inscrivent dans le respect de la règle des « 3R » pour l'expérimentation animale. Les possibilités de remplacement par substitution complète de l'expérimentation animale sont encore limitées dans les dernières phases de l'étude de l'efficacité des composés dans le domaine de l'étude de la douleur, mais elles sont utilisées en amont dans le développement des candidats médicaments et sont implémentées dans notre activité dès qu'elles sont scientifiquement validées. Notre activité permet de raffiner les modèles in vivo en se rapprochant au mieux des situations cliniques (induction de pathologies, mesures des composantes multiples de la douleur). Un soin particulier est apporté à la réduction de la souffrance et du stress des animaux au strict nécessaire et l'amélioration de leur bien-être (enrichissement et paramètres environnementaux contrôlés tout au long de l'étude). Enfin, pour chaque étude, le nombre d'animaux utilisés est réduit à un minimum acceptable pour l'obtention d'informations robustes et statistiquement pertinentes. Le nombre d'animaux utilisés pour cela est estimé à 1120 souris sur 3 années.

18186 L'accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique est la 1^{ère} cause de morbidité des pays industrialisés: 120 000 personnes en sont victimes chaque année en France. La thrombolyse pharmacologique et l'élimination mécanique des caillots sont les seuls traitements actuellement utilisés pour l'AVC. Ils ne sont efficaces que dans les premières heures à partir de la survenue de l'AVC ce qui limite leur utilisation. Il est donc essentiel de développer de nouveaux traitements.

Une stratégie de traitement complémentaire consiste à améliorer la fonction cérébro vasculaire afin d'optimiser la perfusion du tissu cérébral à risque de lésion irréversible. L'occlusion du vaisseau cérébral va entraîner la mort par nécrose des tissus cérébraux en aval, formant le cœur de l'infarctus. Autour de ce cœur subsiste une zone dite de pénombre dans laquelle les cellules du tissu cérébral sont en souffrance mais ne sont pas encore mortes. Le volume final de lésion cérébrale correspondra au recrutement progressif du cœur de l'infarctus sur la zone de pénombre. Une des stratégies thérapeutiques consiste à maintenir en vie les cellules de la zone de pénombre. La perfusion de la pénombre dépend fortement d'une vasodilatation efficace, qui augmente le flux sanguin vers le tissu cérébral à risque. La rupture locale de la Barrière Hémato-Encéphalique (BHE) entraîne une perméabilité vasculaire et la formation d'un oedème ; ces deux phénomènes sont

impliqués dans l'aggravation des lésions cérébrales et leur évitement pourrait diminuer le volume de lésion. Sphingosine-1-phosphate (S1P) est un lipide qui régule le flux sanguin et l'intégrité vasculaire par activation des récepteurs couplés aux protéines G; S1P est donc potentiellement impliquée dans la pathogénèse de l'AVC, mais ses rôles sont à ce jour peu étudiés.

L'objectif du projet est 1) la caractérisation de l'importance fonctionnelle de S1P en fonction de ses différentes sources cellulaires et de ses différents récepteurs dans l'AVC ischémique et 2) l'exploration du potentiel de la modulation pharmacologique des récepteurs S1P pour réduire les lésions cérébrales lors d'un AVC ischémique.

Afin d'évaluer l'anatomie vasculaire chez les souris, nous réaliserons plusieurs modèles d'AVC ischémiques.

Ce programme de recherche est développé dans le respect des règles éthiques des 3R.

Remplacement : Seuls des modèles in vivo nous permettent d'étudier des processus physiologiques et pathologiques impliqués dans l'ischémie cérébrale chez la souris. En effet celle-ci met en jeu des mécanismes à l'échelle de l'organisme entier et nécessite donc l'utilisation d'animaux vivants puisque l'étude des conséquences métaboliques de cette chirurgie ainsi que sa caractérisation, avec ou sans traitement, ne peut s'envisager que dans un organisme entier.

Réduction : Nous avons réduit le nombre de souris utilisées au minimum nécessaire et suffisant pour valider scientifiquement notre étude du point de vue de l'analyse statistique. Le choix s'est porté sur la souris qui est un modèle reconnu et efficace pour l'accès à des animaux génétiquement modifiés. Ces animaux nous permettront d'appréhender le rôle spécifique d'un type cellulaire, d'un facteur ou encore d'une voie de signalisation des GPCR dans la réponse à l'ischémie cérébrale.

Raffinement : Afin de prévenir la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux qui pourrait être associée aux procédures, Les actes chirurgicaux seront réalisés sous anesthésie générale et les animaux recevront un traitement antalgique en pré- et post-opératoires pendant 48h. Un suivi clinique et une surveillance des animaux seront réalisés par un personnel qualifié avec la mise en place de points limites. Tout animal présentant des signes de souffrance sera pris en charge et/ou euthanasié selon les procédures en vigueur.

Ce projet, qui devrait aider à concevoir de nouvelles thérapies pour les AVC, nécessite au maximum 3706 souris (3426 dans le projet d'origine) pour l'ensemble des procédures expérimentales sur une période de 5 ans.

AMENDEMENT : L'objectif de cet amendement est de tester l'effet de l'hyperglycémie, un facteur de risque important d'AVC chez l'homme, sur le potentiel des agonistes du récepteur S1P-1 à fournir une protection en cas d'AVC ischémique.

Cet amendement nous permet de mieux répondre à notre à nos objectifs (point 1&2).

18187 En populations naturelles, les individus sont soumis à des variations des conditions environnementales qui peuvent être d'origine naturelle ou anthropique. Parmi ces dernières, la présence de polluants de natures diverses, liée aux activités industrielles, agricoles et/ou à l'urbanisation, peut fortement impacter le fonctionnement des organismes et des populations. Les actions de restauration des milieux au travers de mesures de dépollution restent pourtant souvent d'une efficacité limitée en raison du manque de quantification des concentrations de multiples polluants à une échelle spatiale fine ainsi que de leur impact biologique réel sur l'écosystème concerné. Le projet a pour objectif de fournir une cartographie détaillée de différents types de polluants (métaux lourds, polluants organiques persistants) et de caractériser leur impact de façon conjointe (« effets cocktail » potentiels) sur une population d'un petit passereau considéré comme un bioindicateur du milieu des rivières courantes de basse et moyenne montagne, le cincle plongeur. Les rivières sont des milieux particulièrement sensibles à la pollution du fait de la concentration des polluants dans l'environnement alentour via le ruissellement. Sur la zone d'étude, des échantillons biologiques (plumes, sang, sécrétions) sont prélevés sur les oiseaux de façon faiblement invasive et compatible avec le suivi à long terme de la population. Ils permettent de mesurer (1) d'une part les concentrations de différents types de polluants très présents dans cette zone fortement exploitée par l'homme et anthropisée depuis des siècles (métaux lourds et polluants

organiques), et (2) d'autre part des paramètres physiologiques, mais aussi comportementaux et d'histoire de vie (reproduction, survie) des individus. L'étude des liens entre ces mesures des concentrations de polluants auxquels les individus sont effectivement exposés (et donc présents dans leur organisme) et du fonctionnement physiologique (marqueurs des processus immunitaires, hormonaux, métaboliques. . .) permettra de mieux comprendre l'impact biologique réel des polluants au niveau individuel, et les implications au niveau de la population. Cette cartographie et ces résultats seront donc mis à disposition des acteurs locaux de la société civile, permettant de cibler les zones les plus impactées afin d'optimiser les actions de restauration de la biodiversité des écosystèmes rivulaires dans la zone d'étude.

Concernant les 3R:

1) Remplacer: L'objectif étant de comprendre les effets des polluants sur des animaux en situation naturelle à long terme, l'utilisation d'expériences in vitro ou in silico n'est pas envisageable et seuls les prélèvements et mesures sur oiseaux vivants en population naturelle est possible.

2) Réduire: Le nombre d'oiseaux impliqués dans le projet correspond à la taille de la population reproductrice suivie (environ 450 adultes par an) et aux jeunes d'une étude pilote sur les hormones thyroïdiennes, soit 2280 oiseaux manipulés au maximum durant tout le projet) ; ceci permettra d'utiliser les modèles statistiques complexes appropriés pour quantifier l'effet des polluants sur les différents paramètres biologiques tout en tenant compte de nombreux facteurs individuels (sexe, âge, histoire des oiseaux) et environnementaux (date, rivière, altitude. . .) susceptibles d'affecter l'action des polluants.

3) Raffiner: Les procédures utilisées lors de la capture et manipulation des oiseaux et leur impact sur le devenir des oiseaux et le fonctionnement de la population seront évalués dans le cadre du suivi à long terme de la population en vue d'ajuster et améliorer les procédures si besoin est.

18188 Au cours de la SPA, le facteur génétique principal qui multiplie par 100 le risque de développer cette maladie est le HLA-B27. Cette association a été démontrée il y a plus de 30 ans, cependant, et malgré de nombreuses recherches, nous ne savons toujours pas à l'heure actuelle la raison pour laquelle le HLA-B27 confère cette prédisposition. Il existe plusieurs modèles de la maladie chez la souris mais qui majoritairement ne reproduisent qu'une partie de la pathologie humaine. Un seul modèle animal permet l'étude de la plupart des phénomènes cliniques observés chez les patients, le modèle du rat transgénique HLA-B27. Ce modèle est considéré comme le modèle le plus pertinent de la pathologie. Dans ce modèle surviennent spontanément toutes les manifestations de la spondylarthrite ankylosante (inflammation intestinale chronique qui se manifeste par une diarrhée, atteintes articulaires de type arthrites aiguës, chroniques ou récidivantes, prédominant aux pattes arrière dont la survenue est aléatoire ; certains animaux développent également une inflammation de l'oeil (uvéite) et des testicules (orchite). Notre objectif principal est la compréhension du rôle pathogène du HLA-B27 vis à vis de la maladie en utilisant ce modèle animal. La dissection des mécanismes impliqués dans l'association HLA-B27/SPA revêt une importance toute particulière car la spondylarthrite est une maladie fréquente, touchant 0,45% de la population adulte en France, soit environ 200. 000 personnes. De plus, peu de traitements sont efficaces à l'heure actuelle. Des études de notre laboratoire utilisant le modèle de rats transgéniques qui expriment le gène HLA-B27 (soit sur le fond génétique FISHER soit sur le fond LEWIS) et qui développent la spondylarthrite ont révélé le rôle crucial des cellules dendritiques et des lymphocytes TCD4+ dans le déclenchement de la maladie. Cependant les mécanismes précis impliqués dans ce phénomène ne sont pas encore élucidés. Un objectif majeur de notre projet est d'étudier plus précisément les conséquences de l'expression du gène HLA-B27 dans ces deux types cellulaires. Une meilleure compréhension du rôle pathogène du HLA-B27 vis à vis de la maladie peut conduire à la proposition de nouvelles stratégies thérapeutiques. Les expériences consisteront à comparer les rats malades (transgéniques) à des rats contrôles (non-transgéniques ou portant un transgène contrôle non associé à la maladie : le HLA-B7). Pour réduire le nombre d'animaux utilisés dans ce projet, les organes (rate et ganglions principalement mais aussi intestin, caecum, colon, yeux.) et pattes de chaque rat seront prélevés après sacrifice par asphyxie au CO2 pour ensuite être utilisés par les différents expérimentateurs à des fins différentes. Dès que possible, afin de réduire le

nombre d'animaux utilisés, nous utiliserons aussi des lignées de culture primaire établies dans notre laboratoire pour disséquer des mécanismes cellulaires in vitro. Etant donné que les deux caractéristiques majeures de la SPA chez le rat HLA-B27 sont l'apparition d'une diarrhée aiguë (colite) vers 6 semaines d'âge et d'une inflammation au niveau des articulations (arthrites) vers 10-12 semaines d'âge, nous pourrions, selon le projet, nous limiter à observer seulement une amélioration ou une aggravation du symptôme le plus précoce (à savoir la diarrhée) et ensuite sacrifier les animaux afin de limiter leur souffrance. Pour les expériences ex-vivo, nous comptons utiliser en moyenne 6 animaux par expérience (2 rats HLA-B27, 2 rats contrôles non transgéniques et 2 rats contrôles HLA-B7, allèle non associé à la maladie), ce qui représente 240 rats par an. Des données récentes de notre laboratoire ont révélé le rôle crucial de la molécule ICOS dans la régulation des cytokines pro-inflammatoires par les lymphocytes T chez les rats HLA-B27. Grâce à une collaboration, nous prévoyons d'établir une lignée de rat HLA-B27 avec la mutation du gène ICOS générée (rat HLA-B27-ICOS-KO). Si une protection vis-à-vis du développement de la SPA est observée chez ces animaux, et dans le but de proposer une nouvelle stratégie thérapeutique, un traitement avec un anticorps anti-ICOS sera envisagé. Pour ces expériences nous aurons 4 groupes (rats transgéniques et rats contrôles traités par anti-ICOS ou le véhicule : PBS), avec 8 animaux par groupe, ce qui représente 32 animaux par essai (1200 rats au total). D'autres projets en cours dans le laboratoire pourront conduire à d'autres essais cliniques, utilisant un nombre similaire d'animaux.

18189 Dans le cadre du traitement du trouble du rythme cardiaque (arythmie) qui impacte la capacité de pompage du cœur et implique une fatigue, des étourdissements, et des évanouissements chez les patients, une société spécialisée dans le développement d'équipements médicaux a mis au point un stimulateur cardiaque implantable sans sonde.

Il s'agit d'une capsule miniaturisée directement implantée au niveau du cœur (sur la paroi ventriculaire). Il s'agit d'une avancée technologique et médicale majeure qui va permettre de s'affranchir des complications induites par les sondes dans le cadre du traitement des maladies cardiaques chez l'Homme.

En effet, la stimulation cardiaque traditionnelle fait appel à l'implantation de sondes (fils électriques) chez le patient qui permettent la délivrance d'impulsions électriques cardiaques par le stimulateur auquel elles sont connectées. Suite à leur implantation chez le patient, ces sondes vont progressivement être incluses par l'organisme dans les parois veineuses et myocardique ce qui rend leur extraction très difficile et risquée. Avec le temps, la probabilité de dysfonction et/ou d'infection de ce matériel étranger augmente, alors que leur difficulté d'extraction augmente également. Cette problématique des sondes de stimulation représente une réelle limite, notamment pour les patients les plus jeunes, candidats à une stimulation à vie qui permettra de traiter leur maladie cardiaque. Par ailleurs, le boîtier de stimulation conventionnel, placé en position sous cutané présente lui aussi une probabilité d'infection qui augmente avec le temps.

La capsule de stimulation développée permet d'éliminer cette morbidité induite par les sondes. Sa mise en place est totalement différente de la mise en place d'un stimulateur conventionnel. En particulier, elle est réalisée à l'aide d'un cathéter dédié. Le bon positionnement et l'accroche du système doivent être impérativement contrôlés durant l'implantation puisque la capsule est ensuite abandonnée, sans possibilité de repositionnement.

Les essais humains ont pu montrer que cette nouvelle technique d'implantation était accompagnée d'un sur-risque d'effraction péricardique par rapport à la technique conventionnelle. Une formation dédiée et encadrée reste donc indispensable pour les cardiologues désireux d'implanter ces nouveaux stimulateurs.

Dans le cadre de cette demande, la règle des 3R sera mise en place de manière rigoureuse :

- Remplacement : il n'est à ce jour pas possible de réaliser ces formations sur d'autre système, car il est primordial d'avoir une similitude de l'implantation chez le patient, en prenant en compte l'organisme et la physiologie dans son ensemble. De part ces caractéristiques anatomiques et son

métabolisme proches de ceux de l'homme, l'espèce porc a été identifiée comme le meilleur modèle pour ce projet d'enseignement.

- Réduction : les sessions d'enseignement auront lieu régulièrement sur le site, avec une partie théorique. Une estimation du nombre d'animaux qui pourra être inclus au maximum est donc proposée en fonction du nombre de sessions de formation qui pourraient être réalisées. Une utilisation de 100 animaux maximum est donc estimée sur la durée de la demande (5 ans).

- Raffinement : la prise en charge du bien-être des animaux se fera durant toute leur prise en charge. Au niveau de leur hébergement (suivi quotidien par le personnel compétent, locaux agréés, enrichissement adapté à l'espèce : groupe sociaux, jeux, nourriture et eau à volonté...), et lors de la réalisation de la procédure, le projet sera réalisé sous anesthésie générale avec une prise en charge optimale de l'animal lors de la session.

18190 Dans un contexte où la demande en produits sanguins contrôlés, indemnes de risques infectieux, immunitaires et inflammatoires, est constante, la production de plaquettes sanguines produites en culture représente un enjeu important pour la transfusion. Grâce aux connaissances accumulées sur les mécanismes moléculaires et cellulaires qui gouvernent la biogénèse des plaquettes sanguines, nous sommes aujourd'hui en mesure de produire des plaquettes morphologiquement et fonctionnellement semblables à des plaquettes natives mais les rendements de plaquettes par leurs précurseurs médullaires, les mégacaryocytes (MK) sont encore faibles. Pour améliorer ce système, la stratégie envisagée est l'utilisation de vésicules extracellulaires (VE) dérivées du plasma. Les VE sont des vésicules reconnues comme des vecteurs de matériel biologique capables de le transférer dans des cellules. En effet, si elles ont longtemps été considérées comme des convoyeurs de déchets utilisés par la cellule pour se débarrasser de molécules nocives ou inutiles, elles sont aujourd'hui reconnues comme des vecteurs de matériel biologique importants. Leur contenu est riche en éléments biologiquement actifs principalement composés de protéines, lipides et acides nucléiques non codants, des éléments qui jouent un rôle majeur dans la régulation de nombreux processus cellulaires dont la prolifération, la différenciation, la survie et la reprogrammation des cellules. Pour améliorer le processus nous proposons donc de tester l'influence de VE issues du plasma de souris sur la production des plaquettes *in vitro* et *in vivo*. Les expériences consisteront en des prélèvements sanguins pour permettre la quantification et la purification des VE à partir du plasma. Nous testerons *in vitro* ces VE sur le processus de différenciation de progéniteurs hématopoïétiques en mégacaryocytes d'une part. D'autre part nous les transfuserons à des souris afin d'observer leur effet sur la production de la plaquette sanguine *in vivo*.

Nous serons attentifs à la règle des 3R.

Réduire : les nombres d'animaux utilisés lors des expériences seront minimalisés avec la contrainte d'obtenir des données statistiquement significatives.

Remplacer : dans ce contexte d'étude *in vitro*, nous ne pouvons obtenir ni de plasma humain ni celui d'autres modèles animaux. En effet, pour maximiser nos chances de réussite dans ce projet, nous nous concentrerons sur des VE issues de plasma provenant de modèles thrombocytopéniques c'est-à-dire de modèles présentant une numération plaquettaire au moins 3 fois plus élevée que la moyenne. Dans cette étude exploratoire, du plasma humain dérivé de patients thrombocytopéniques ne serait pas obtenu en quantité suffisante et il n'existe pas d'autres modèles animaux avec une numération plaquettaire élevée. Pour tester la transfusion d'EV et analyser son influence sur la biogénèse des plaquettes, nous n'avons d'autres choix que de valider cette hypothèse dans un système murin.

Raffiner : Pour chaque procédure, les animaux sont anesthésiés. Les conditions d'environnement sont optimisées par l'enrichissement des cages avec des carrés de cellulose, bâtonnets de coton, frisures de papier, ce qui leur permet de compartimenter leur environnement selon leurs besoins. Les animaux entre 2 et 6 par cage, ont un accès permanent à l'eau de boisson et à la nourriture. Une prise en charge péri-opératoire à l'aide d'une fiche de suivi pour évaluer l'état des animaux et veiller à leur bien être tout au long de l'expérimentation. Des critères d'interruption en fonction de

l'aspect clinique des animaux (grille des score) seront mis en place afin de limiter le stress et la souffrance des animaux. L'étude se fera sur 680 souris.

18191 Décrypter les premiers stades de la maladie d'Alzheimer (MA) est devenue un enjeu prioritaire dans la recherche d'une thérapie contre cette pathologie afin de contrer le plus tôt possible la perte neuronale et le déclin cognitif. Ces dernières années, la progression des modèles animaux a permis de se rapprocher de plus en plus de la pathologie humaine. Notamment, l'utilisation de la technique de remplacement de gènes (knock-in : KI), qui permet d'intégrer des gènes humains à la place de ceux de l'animal, permet la mise en place d'interactions protéiques spécifiquement humaine. Cette technique permet également d'éviter les effets secondaires de la surexpression de protéines comme c'est le cas dans la plupart des modèles murins de la MA, qui sur-expriment des versions humaines mutées des gènes APP ou tau, et ce, en parallèle de l'expression des versions murines. L'étude du modèle murin doublement humanisé pour APP et tau, APPNL-F/MAPT (dKI), a ainsi permis d'étudier les performances de mémoire dans des stades précoces de la MA avant l'apparition de marqueurs moléculaires de la maladie comme les plaques A β . Ces études ont permis de montrer que ces souris dKI présentent un déficit dans des tâches d'association place-objet à partir de 4 mois, soit environ 4 mois avant l'apparition des premières plaques amyloïdes. De manière intéressante, il a également été montré que ces souris présentent un déficit dans une tâche de reconnaissance d'objet à 24h, reflétant un déficit de mémoire épisodique à long terme, à partir de 2 mois, uniquement chez la femelle. Ce dimorphisme sexuel est en accord avec une précédente étude montrant que la communication entre l'hippocampe (HC) et le cortex préfrontal (CPF), impliquée dans de multiples aspects de la mémoire épisodique et permettant principalement le stockage dans la mémoire à long terme, est plus vulnérable chez les femmes que chez les hommes au début de la MA. Ce déficit chez la souris femelle observé à deux mois reflèterait donc une différence d'interaction HC-CPF dans les stades précoces de la MA entre les deux sexes. Le but de ce projet est donc d'étudier les marqueurs électrophysiologiques d'activité et de connectivité de l'HC et du CPF par électroencéphalographie (EEG) lors de la performance d'une tâche de mémoire épisodique à long terme (RO24h) chez la femelle et le mâle dKI de 2 à 6 mois, et ce de manière longitudinale. Le sommeil sera également enregistré puisque certaines phases de sommeil ont un rôle important dans la consolidation de la mémoire, notamment en réactivant des liaisons entre l'HC et le CPF. Récemment, il a également été montré que l'application d'un protocole de stimulation sensorielle, visuelle et /ou auditive, à une fréquence de 40 Hz, pendant une certaine période de temps, permettrait en entraînant les réseaux corticaux à une fréquence gamma, de réduire la neurodégénérescence et d'améliorer les performances de mémoire chez certains modèles murins de la MA. La seconde partie de ce projet consistera à évaluer l'efficacité de ces stimulations sensorielles chez les souris dKI mâle et femelle, et d'en étudier les effets sur les performances de mémoire, et la dynamique des oscillations cérébrales. Ce protocole de stimulation pourrait offrir un réel espoir dans la recherche de thérapies contre la MA, en proposant une solution non-invasive. Un effort tout particulier est apporté pour suivre la règle des 3R. Remplacement: Dans la mesure où nos travaux portent sur l'étude des fonctions mnésiques couplées à des enregistrements cérébraux, il n'est pas possible de recourir à un autre type de modèle d'étude qu'à celui de l'animal entier éveillé, soumis à des tests comportementaux. Réduction: le nombre d'animaux nécessaire a été diminué le plus possible (ce projet prévu sur 5 ans utilisera 160 souris) en tenant compte du nombre minimal d'animaux nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Raffinement: Le choix des approches a été guidé pour ses pertinences par rapport à l'hypothèse à tester et le choix de l'espèce par son adaptation naturelle à réaliser le test avec un minimum de stress ainsi que sa pertinence par rapport à la question posée. L'état de santé des animaux sera monitoré tout au long des expériences et des points d'arrêts anticipés (points limites) seront définis (grille de notation).

18192 Les reins assurent l'homéostasie de l'organisme, en épurant le sang de ses déchets et en régulant le niveau d'eau et d'électrolytes du corps. Ils peuvent être fréquemment affectés par différentes maladies aboutissant à une fuite massive de protéines du sang dans les urines (protéinurie), et à une dysfonction chronique de l'organe (insuffisance rénale chronique) mettant en jeu le pronostic

vital en l'absence de traitement. La protéinurie elle-même entraîne des complications majeures telles qu'une rétention d'eau, des thromboses veineuses, ou encore un déficit immunitaire. La protéinurie peut aussi elle-même aggraver l'insuffisance rénale.

Les mécanismes d'apparition de cette protéinurie sont encore imparfaitement connus.

La protéine vasorine semble liée à la perte de la fonction rénale, car son absence totale entraîne une protéinurie massive, une insuffisance rénale rapide, et une destruction des cellules indispensables au fonctionnement du rein: les podocytes. En revanche, une perte partielle de la vasorine n'entraîne pas de pathologie chez la souris. Dans ce contexte, nous souhaitons déterminer si la déficience partielle en vasorine peut entraîner une susceptibilité accrue à certaines maladies rénales fréquentes associées à une déplétion podocytaire, comme la néphropathie hypertensive, la hyalinose segmentaire et focale (HSF), ou le diabète.

Seule l'expérimentation animale permet actuellement d'étudier les mécanismes physiopathologiques des maladies rénales, en reproduisant fidèlement l'ensemble des interactions cellulaires existant au sein du rein dans un organisme vivant.

La souris est un modèle de choix car son architecture et sa physiologie rénales sont proches de celles connues chez l'homme.

Nous tirerons parti de la transgénèse, en étudiant deux lignées de souris mutantes pour cette protéine: une lignée qui n'exprime que partiellement la Vasorine dans les podocytes (PodoCre-Vasn), et une lignée exprimant la protéine rapportrice fluorescente Venus, dont la modulation d'expression reflète la modulation de la Vasorine.

Nous utiliserons deux modèles murins d'HSF, l'un grâce à l'implantation en sous-cutané d'une pastille DOCA-salt (deoxycorticostérone acetate) couplée à une uni-néphrectomie, et l'autre grâce à l'injection de la molécule doxorubicine. Ce dernier modèle ne sera cependant effectué que sur des souris différentes des mutantes citées précédemment, car ces dernières sont connues pour y être résistantes. De plus, nous souhaitons effectuer un modèle de diabète, entraînant également un stress pour les podocytes et des lésions du rein, grâce à l'injection de la molécule streptozotocine.

Durant ces expériences, la fonction rénale sera suivie grâce à des collectes d'urines régulières jusqu'au sacrifice des animaux, lors duquel le sang sera prélevé. De plus, nous prendrons la pression artérielle à la queue de nos animaux, pour voir l'évolution de l'hypertension attendue. Dans le cas du modèle diabète, nous mesurerons également la glycémie de nos souris, grâce à une goutte de sang prélevée à la queue. Enfin, des échographies vasculaires seront réalisées dans les modèles DOCA et de diabète afin d'affiner nos observations grâce aux données que peut générer cet outil (débit sanguin, taille des compartiments du cœur, etc).

Les actes chirurgicaux nécessaires à l'implantation du DOCA pour établir le modèle d'hypertension seront réalisés sous anesthésie générale. Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum. Afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, les procédures se dérouleront avec une surveillance régulière et des antalgiques sont prévus en cas de nécessité. Enfin, des points-limites ont été établis, permettant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire. L'environnement des animaux sera enrichi par du coton de nidation, des bâtonnets à ronger.

Ce projet s'inscrit sur une durée de 5 ans. Le nombre de souris utilisées sera de maximum 280.

A terme, les résultats de ce projet permettront de comprendre plus précisément le rôle de la vasorine dans différentes conditions pathologiques, en révélant son rôle potentiel dans la résistance à la mise en place des symptômes rénaux. Ils pourraient notamment aboutir au développement de stratégies thérapeutiques axées sur le renforcement ou la restauration de sa fonction chez les patients atteints de maladies rénales chroniques les plus fréquentes.

18193 L'ataxie de Friedreich est une maladie humaine d'origine génétique entraînant des troubles cardiaques et neurologiques majeurs. Il a été démontré que c'est une mutation d'un gène doant pour la protéine Frataxine qui est responsable de cette maladie.

Afin de mettre en place des thérapies pour cette pathologie, des modèles murins ont été développés.

L'utilisation de souris se justifie ici d'une part par l'existence de modèles reproduisant la pathologie humaine et d'autre part par l'impossibilité de mener ces études in vitro.

Plusieurs traitements sont en cours de développement par l'un de nos partenaires et plusieurs étapes sont nécessaires pour en déterminer l'efficacité et l'optimiser.

De premiers résultats validant cette approche ont été obtenus et déjà publiés. Néanmoins, ce projet vise à transformer cette preuve de concept en thérapie disponible pour traiter les patients.

Pour cela, plusieurs étapes sont nécessaires afin d'optimiser les thérapies, d'améliorer leur efficacité.

Le projet s'articulera sur deux étapes:

A) valider la propagation de deux candidats médicaments dans l'organisme des souris non malades

B) traiter les animaux développant une maladie : le traitement sera administré après l'apparition des premiers symptômes

Le modèle animal utilisé sera porteur de cette mutation du gène au niveau cardiaque, afin de permettre d'étudier les effets thérapeutiques de cette maladie. Ce modèle animal a déjà été utilisé et validé dans de nombreuses études et s'avère la meilleure option actuellement disponible pour mettre en évidence des effets thérapeutiques de candidats médicaments.

REDUCTION :

Pour ces deux étapes, il sera nécessaire d'utiliser un nombre suffisant d'animaux pour obtenir des conclusions solides, tout en le réduisant autant que possible selon les données dont nous disposons.

Ainsi si un candidat thérapeutique ne présente pas de résultats satisfaisants, il sera retiré du protocole et les animaux ne seront pas impliqués dans le projet.

En considérant les deux axes, et en utilisant les 2 candidats thérapeutiques, nous obtenons un maximum d'animaux utilisés dans ce projet de 140.

REMPLACEMENT :

Il n'est pas par ailleurs possible d'utiliser d'autre modèle que le modèle animal pour caractériser l'efficacité thérapeutique de ce composé. En effet, toutes les études préalables possibles ont été effectuées in vitro, afin de mettre en évidence les meilleurs candidats médicaments. Néanmoins, nous devons désormais valider leur efficacité sur un modèle permettant de reproduire autant que possible les interactions complexes présentes dans un organisme complexe de mammifère.

Il n'existe pas actuellement de possibilité d'obtenir des données sur des modèles alternatifs.

RAFFINEMENT:

Dans le modèle animal utilisé, les animaux présentent une mortalité accentuée liée à la maladie dès l'âge de 9 semaines. Le groupe contrôle sera ainsi prélevé à cet âge, et les animaux traités recevront un suivi spécifique et quotidien pour conserver ce groupe dans des conditions éthiques, tout en permettant leur analyse afin de disposer de données fiables dans l'évolution des symptômes. Un suivi de la fonction cardiaque sera effectué avant le traitement, puis toutes les deux semaines, par échographie couplé à un suivi de poids hebdomadaire jusqu'à l'âge de 15 semaines correspondant à la fin de l'étude. La pesée hebdomadaire permettra de vérifier l'état de santé général, et cela sera complété avec une observation des animaux hors de leur cage deux fois par semaine pour s'assurer de leur mobilité, de leur bon toilettage et de l'absence de souffrance. Par ailleurs, si une faiblesse des animaux est notée, sans atteinte des points limites, une nourriture en gel sera placée dans les cages pour faciliter l'accès à la nourriture.

18194 Les études précliniques permettent d'acquérir les premières connaissances sur le comportement d'un candidat médicament, indispensable avant les essais chez l'Homme. Le développement préclinique fait en particulier appel à l'expérimentation animale, qui est une étape indispensable à la connaissance d'un futur médicament avant de l'administrer à l'Homme. En effet, il n'est pas

envisageable d'administrer un nouveau composé à l'Homme sain ou malade compte tenu des risques non connus susceptibles d'apparaître. Au cours du développement préclinique, un grand nombre d'études sont effectuées afin de qualifier le candidat médicament sur le plan de la pharmacologie, de la pharmacocinétique ou encore de la toxicologie. Ces études sont constitutives d'une partie du dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché (AMM) du futur médicament.

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

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

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

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

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

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

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

Les rats ou les souris seront suivis tout au long de la procédure pour pouvoir identifier les signes éventuels de souffrance : les changements physiques (pelage, peau, yeux...), la mobilité, l'alimentation, l'agressivité, la consistance des fèces. Si les signes persistent pendant plusieurs heures au cours de la procédure, l'animal sera mis à mort après concertation avec le référent du comité bien-être des animaux. Notons que les composés seront administrés à des concentrations dont on sait qu'ils n'induisent pas de douleur ou de détresse.

- « Remplacer » les modèles animaux :

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

18195 Le changement climatique a de nombreux impacts sur la qualité de l'eau dans laquelle vivent les poissons d'élevage. Or les poissons sont des animaux très sensibles à la qualité de l'eau.

Notamment, la dégradation du taux d'oxygène et l'augmentation de la température sont amenées à s'accroître avec le changement climatique avec, en particulier, des augmentations soudaines et fortes. Des solutions techniques existent pour gérer les paramètres de qualité d'eau, cependant elles sont coûteuses et énergivores et elles ne sont donc pas déployées dans toutes les piscicultures. Ainsi, l'obtention par sélection de poissons robustes, plus tolérants face à une qualité d'eau non optimale, est une option intéressante car ces poissons pourraient être diffusés dans toutes les piscicultures, y compris celles qui ne disposent pas des moyens techniques pour lutter contre les variations de milieu. Cela permettrait donc aux entreprises d'être moins dépendantes des conditions de milieu et d'être plus résilientes face au changement climatique et de contribuer à un meilleur bien-être des animaux.

Les expériences décrites ici visent plus précisément à fournir des résultats permettant de concevoir une sélection efficace et pertinente pour la résistance à la température et à l'hypoxie (faible teneur en oxygène) ; notamment l'étude de la variabilité génétique et la compréhension des mécanismes d'adaptation de la truite arc-en-ciel à des stress de température et d'hypoxie afin d'identifier des mesures qui permettraient de sélectionner de manière plus précoce et plus éthique. Plus précisément, ce projet se concentre sur 1/ la variabilité génétique de la résistance à un stress aigu de température et d'hypoxie ; 2/ la relation entre la résistance à ces deux stress ; 3/ la stabilité du classement des poissons à des stress aigus de température et d'hypoxie en fonction de leur taille ; et 4/ vise également à étudier les caractéristiques physiologiques de poissons résistants ou sensibles à la température/hypoxie.

Le matériel biologique sera constitué de 6 lignées isogéniques de truite arc-en-ciel. Dans une lignée, tous les individus sont génétiquement identiques. Ces lignées ont déjà été caractérisées pour leur réponse à la température et à l'hypoxie au stade juvénile (10-20 g). L'objectif de ce projet est de les caractériser sur d'autres animaux au stade portion (200-300 g). Ceci nous permettra de savoir comment évolue la résistance à la température et à l'hypoxie avec l'âge et si les lignées résistantes à des stades précoces le sont aussi (ou non) à des stades plus tardifs et si on peut (ou non) sélectionner précocement. L'obtention de données sur une deuxième année enrichira ainsi l'analyse et l'interprétation des résultats déjà obtenus sur des poissons juvéniles.

Ce projet requiert six procédures soumises à autorisation :

-Résistance à un stress aigu de température et résistance à un stress aigu d'hypoxie. Ces deux procédures seront réalisées sur les 6 lignées et permettront de connaître la variabilité génétique au stade portion et de tester les relations entre les deux types de stress ainsi qu'entre réponse précoce (stade juvénile, projet autorisé en 2020) et réponse tardive (stade portion).

-Stress modérés de température. Cette procédure permettra d'évaluer les paramètres sanguins des 6 lignées.

-Analyse morphométrique. Cette procédure permettra de recueillir des informations sur la morphologie des poissons susceptibles de fournir des éléments d'explication aux différences de performances observées entre lignées.

-Respirométrie. Cette procédure de mesure des capacités respiratoires des poissons permettra d'évaluer les performances métaboliques des lignées.

-Mesure des paramètres cardiovasculaires et ventilatoires au cours d'un stress thermique modéré.

Ces 3 dernières procédures permettront des analyses plus fines sur 4 lignées choisies pour leur différence de résistance à la température, afin de comprendre ce qui différencie un poisson résistant à la température ou à l'hypoxie d'un poisson sensible.

Notre projet s'inscrit dans une démarche compatible avec la règle des 3R.

Remplacer : Les procédures proposées ne pourraient être mises en œuvre que sur poissons vivants car aucun modèle de laboratoire fiable n'existe pour caractériser les capacités d'adaptation de la truite en réponse à un stress de température ou d'hypoxie.

Réduire: Nous avons recours à un matériel biologique original, les lignées isogéniques de truite (animaux génétiquement identiques au sein de chaque lignée), ce qui nous permet de réduire le

nombre de poissons analysés tout en gardant une puissance statistique forte pour détecter des différences significatives.

Raffiner: avant et pendant les procédures, une surveillance du comportement des animaux est effectuée pour réduire au minimum la douleur, la souffrance et l'angoisse subies. Pour les tests aigus de température et d'hypoxie (procédures sévères), les poissons sont observés en continu et dès que l'un d'entre eux perd l'équilibre plus de 5 secondes, il est pêché et mis à mort. Pour les tests modérés de température, les poissons sont également suivis en continu et les poissons au comportement anormal (léthargie, perte d'équilibre) seront pêchés et mis à mort. Durant l'analyse des performances cardio-respiratoires, nous manipulerons les animaux avec soin et veillerons à ce qu'ils soient anesthésiés pour toute procédure ne requérant pas l'étude sur animal actif. Une surveillance très régulière sera mise en place durant toutes les expériences, auxquelles nous mettrons fin dès l'apparition du moindre signe de détresse (agitation prolongée dans les chambres de respirométrie, perte d'équilibre; perturbations des paramètres cardio-ventilatoires).

Nous prévoyons d'utiliser au total 2392 poissons sur une durée de 1 an :

-1720 poissons (100 poissons (50 par test) pour adapter les tests de température et d'hypoxie au stade portion ; 45 poissons * 3 réplicats * 6 lignées * 2 tests – température ou hypoxie) pour les tests aigus de température et d'hypoxie (procédures 1 et 2)

-432 poissons (8 poissons * 3 réplicats * 6 lignées * 3 temps de prélèvement) pour les stress modérés de température (procédure 3)

-240 poissons (20 poissons * 3 réplicats * 4 lignées) pour l'analyse morphométrique (procédure 4) dont 48 d'entre eux (4 poissons * 3 réplicats * 4 lignées) seront ensuite utilisés pour la respirométrie (procédure 5) et 48 autres pour la mesure des paramètres cardiovasculaires et ventilatoires au cours d'un stress thermique modéré (procédure 6).

18196 Les animaux et les humains adaptent leur comportement en fonction des informations sensorielles qu'ils perçoivent. Les rongeurs, eux, se fient aux informations tactiles de leurs vibrisses pour prendre des décisions de navigation. Les mécanismes qui déterminent la façon dont les humains et animaux prennent des décisions telles que tourner à gauche ou à droite ne sont pas encore clairs. Les informations sensorielles sont transférées des cortex sensoriels à un centre de prise de décision, les ganglions de la base. Le striatum est la région des ganglions de la base qui reçoit les informations sensorielles en provenance du cortex, de sorte que les neurones striataux de l'hémisphère gauche répondent principalement aux stimulations tactiles du côté droit du corps par exemple. Des neurones dans le striatum, dits de la voie directe, facilitent le mouvement et d'autres de la voie indirecte répriment eux le mouvement. Nous voulons dans ce projet comparer les connexions du cortex sensoriel vers ces neurones du striatum pour mieux comprendre l'importance de leurs connexions pour le contrôle du mouvement.

Ce projet utilisera un total de 426 souris, mâles ou femelles. 406 seront génétiquement modifiées, exprimant un marqueur des neurones de la voie directe. 10 autres souris sont génétiquement modifiées pour exprimer un marqueur de l'activité des neurones. 10 sont des souris de laboratoire non-génétiquement modifiées. Les souris présentent une organisation des réseaux corticaux et striataux similaire à celle décrite chez l'homme. Les étudier nous permet de mieux comprendre nos comportements moteurs mais aussi les pathologies motrices comme les maladies de Parkinson et de Huntington. L'utilisation de souris dans nos recherches permet d'identifier des neurones d'intérêt et donne une puissance supplémentaire à l'interprétation des résultats.

Remplacement: L'organisation des réseaux neuronaux est fonction du développement de chaque structure, des autres structures avec qui ils communiquent, ainsi que de l'expérience personnelle des individus. Elle ne peut donc pas être reproduite ni étudiée dans des modèles de cultures cellulaires in vitro.

Raffinement: Les mesures comportementales sont celles de comportements spontanés et se feront sans contrainte exercée sur l'animal. Nous veillons au bien être animal en apportant de l'enrichissement dans les conditions d'hébergement et en permettant les interactions sociales. La nourriture et l'eau sont donnés sans restriction, ad libitum. L'aspect des animaux et leur

comportement sont examinés quotidiennement. Le prélèvement de tissu cérébral se fait sous anesthésie, en phase finale de nos expérimentations. Des analgésiques sont donnés pour empêcher la douleur.

Réduction: Les données électrophysiologiques et anatomiques seront acquises sur du tissu cérébral prélevé sur ces mêmes souris testées pour leur comportement.

18197 Les coccidioses représentent le premier fléau parasitaire de l'aviculture conduisant à d'importantes pertes économiques de plus de 1,5 milliards d'euros dans le monde et par an. Ces maladies infectieuses sont provoquées par la multiplication de parasites protozoaires du genre *Eimeria*. Une fois ingérés, ces parasites envahissent les cellules intestinales et se multiplient massivement avant d'être excrétés sous forme d'oocystes.

Les pertes de production observées dans les élevages avicoles sont principalement dues à une morbidité qui se traduit par une malabsorption, une faible croissance et une mauvaise efficacité alimentaire chez le poulet de chair.

La prophylaxie repose principalement sur l'administration de coccidiostatiques dans l'aliment des animaux pendant toute la durée de l'élevage. Cependant, l'apparition de résistances souligne l'urgence de trouver des moyens de lutte alternatifs : nouvelles formulations vaccinales ou nouvelles approches thérapeutiques.

Des études sont menées au sein de l'équipe afin de mieux comprendre le cycle biologique des parasites et les mécanismes moléculaires et immunitaires impliqués dans leur interaction avec leur hôte. Ces études s'intéressent spécifiquement aux ADN, ARN et protéines exprimées par les parasites ou leur cellule hôte. Les parasites doivent être obtenus en quantité suffisante par multiplication *in vivo* sur poulet selon des protocoles établis dans le respect de la règle des 3R :

Réduire : Le nombre d'animaux utilisés varie entre 2 et 50 par protocole. Il dépend de la prolificité de la souche et du nombre de parasites requis. Pour les souches utilisées au laboratoire, il est possible de déterminer le nombre de parasites produits par animal en fonction de la dose inoculée. Les expériences sont organisées pour optimiser l'utilisation des parasites et utiliser le moins d'animaux possible.

Raffiner : Le degré de pathogénicité est dépendant de l'espèce et de la souche inoculée. Chaque inoculum fait l'objet d'une attention particulière pour administrer des doses définies et adaptées en fonction de l'espèce présente et ainsi éviter toute pathogénicité. Même si la dose est calculée de manière à ne pas induire de pathogénicité, nous restons cependant vigilants à l'état de santé des animaux : après inoculation de l'agent infectieux, deux visites quotidiennes sont réalisées dans la salle expérimentale afin de surveiller l'éventuelle apparition des premiers symptômes liés à la maladie. Pour le raffinement des conditions d'hébergement, des petites plateformes triangulaires ont été placées pour permettre aux poulets de se percher à l'intérieur de chaque isolateur.

Remplacer : Les parasites du genre *Eimeria* sont spécifiques d'espèces hôtes. Dans le cadre de nos études, le poulet est l'espèce animale de choix. Jusqu'à présent, aucune stratégie suffisamment efficace ne permet de les multiplier dans des systèmes cellulaires *in vitro*.

Ce projet sur 5 ans permettra de maintenir les différentes souches parasitaires disponibles au sein de l'équipe, le nombre d'animaux est estimé à 700 par an, soit 3500 sur la durée du projet.

18198 Nous sommes de plus en plus nombreux sur Terre. La maîtrise du nombre de naissance, et par conséquent la contraception, est un enjeu majeur du XXI^e siècle pour chaque pays. Les techniques de contraception ont peu évoluées ces dernières décennies. Alors que la contraception féminine dispose d'un large choix quant à ses modalités (dispositif intra-utérin avec ou sans action hormonale, contraception hormonale par voie orale, implant hormonal sous-cutané, ligature des trompes), la seule contraception masculine définitive efficace disponible est à l'heure actuelle la vasectomie chirurgicale. Celle-ci est aujourd'hui réalisée de manière invasive, avec une petite incision inguinale qui reste nécessaire afin d'accéder aux canaux déférents. Une section de ces canaux est ensuite réalisée par un chirurgien. La contraception est considérée comme définitive

après un délai de latence de 3 mois lié au cycle de vie des spermatozoïdes dans les voies séminales.

Des équipes travaillent actuellement sur un procédé nouveau, basé sur un blocage mécanique par agent occlusif injecté dans les canaux déférents. Reste que ces nouveaux agents développés n'ont été pour l'heure testés que de manière invasive, nécessitant une mise à vue des déférents après incision inguinale pour une injection localisée et optimale.

L'objectif du projet est d'évaluer la faisabilité d'une nouvelle technique mini-invasive de contraception masculine par injection d'un agent occlusif (embolisation) dans les canaux déférents par voie percutanée sous contrôle échographique.

Cette étude sera menée sur 3 Babouins adultes pour des raisons de similarités anatomiques avec l'homme et de taille des canaux déférents. Toutes les procédures seront réalisées sous anesthésie générale. Un spermogramme basal sera réalisé sur l'éjaculat obtenu par électroéjaculation. Le radiologue réalisera sous contrôle échographique une occlusion des canaux déférents grâce à un agent d'embolisation liquide validé : l'Onyx. Des électroéjaculations seront réalisées 7 jours, 1 mois et 3 mois post-embolisation afin de quantifier le nombre de spermatozoïdes dans l'éjaculat, celles-ci seront couplées à des contrôles échographiques permettant d'identifier les complications possibles (inflammation, infiltration, abcès...). A la fin des 3 mois de protocole, une petite incision inguinale sera réalisée afin d'explanter les segments de canaux déférents sclérosés pour analyse histologique, cette procédure sera la même que celle réalisée habituellement pour la stérilisation des babouins mâles. L'animal sera maintenu en vie en fin à la fin du projet expérimental.

Ce projet est conçu pour respecter au mieux la règle des 3R:

Remplacement: L'étude de la faisabilité de cette technique d'embolisation par repérage échographique est difficile, voire impossible à simuler avec précision, elle est essentielle avant le passage à l'Homme. De plus, l'efficacité de celle-ci ne peut être étudiée que sur modèle animal. L'utilisation de primates non humains est incontournable en termes d'anatomie et de physiologie, la taille des canaux déférents nous a conduit à choisir le babouin.

Réduction. Cette étude étant une preuve de concept, l'utilisation de 3 babouins mâles adultes semble appropriée.

Raffinement: Plusieurs approches sont mises en place dans notre établissement concernant le raffinement. Tous les animaux seront hébergés en groupes sociaux stables avec accès en continu à des volières enrichies structurellement et avec un accès à des installations extérieurs. Tous les animaux font partie d'un programme d'enrichissement alimentaire et cognitif approuvé par la Structure du Bien-être Animal. Lors des périodes d'isolement nécessaires aux soins des animaux les animaux seront inclus dans un programme d'enrichissement augmenté et adapté à ces conditions. La gestion de la douleur pendant et après les procédures douloureuses est toujours prise en compte par l'équipe de vétérinaires. Chaque procédure sera réalisée sous anesthésie générale par un vétérinaire. L'état de santé générale de tous les individus est suivi quotidiennement par l'équipe des soigneurs animaliers, l'équipe vétérinaire et le responsable du Bien-être animal.

18199 Le pansement idéal n'existe pas. Cependant il doit présenter quelques caractéristiques, parmi lesquelles : 1/ maintenir la plaie en milieu humide et chaud, 2/ être modifié selon les stades de cicatrisation, 3/ être perméable aux échanges gazeux mais non aux bactéries, 4/ absorber l'excès d'exsudat produit par la plaie, 5/ ne pas coller à la plaie mais adhérer à la peau saine sans se décoller ou s'abîmer rapidement, le tout en étant facilement applicable et confortable, 6/ ne pas être toxique et être hypoallergénique, 7/ protéger des chocs, 8/ être transparent afin de pouvoir visualiser la plaie sans retirer le pansement, 9/ être le moins coûteux possible et réduire le temps de traitement.

Il existe sur le marché différents types de pansement hémostatique, qui ont soit des propriétés de cicatrisations soit des capacités de réhydrations des plaies sèches.

Le pansement à base d'alginate de calcium répond à l'ensemble des critères mais son utilisation est réservée à la prise en charge de plaies cutanée mais très peu sur des organes internes lors de chirurgie. Pour maîtriser les saignements, les chirurgiens ont recours à différentes techniques

conventionnelles. Lorsque ces techniques sont insuffisantes, notamment lors d'hémorragies capillaires dites « en nappe », des hémostatiques chirurgicaux résorbables sont utilisés comme traitement adjuvant. Ces hémostatiques résorbables ne peuvent pas être retirés du site opératoire car leur retrait arracherait le caillot sanguin néoformé. Or, ils peuvent être sources d'événements indésirables (ex : intolérance du patient à un corps étrangers) et provoquer une gêne opératoire pour le chirurgien.

L'objectif de cette étude est de vérifier l'efficacité hémostatique tissulaire d'application locale d'un produit à base d'alginate, non résorbable et de tester la possibilité de son retrait du site opératoire sans risque de reprise des saignements. La preuve de concept de ce nouveau type de pansement hémostatique permettra de mettre au point un nouveau dispositif médical pour la gestion des saignements intra-cavitaire au cours d'interventions par cœlioscopie (« pansement interne ») ou lors de chirurgie ouverte. Mais surtout, le chirurgien pourra ainsi contrôler l'hémorragie en plaçant ce type de pansement et en le retirant. L'intérêt de pouvoir retirer le pansement est de ne pas laisser trop de matériel étranger dans le corps du patient réduisant les réactions de rejet par le corps, les risques infections et de ne pas gêner la poursuite du geste chirurgical. En effet, si un pansement hémostatique reste en place sur l'organe ce dernier peut réduire le champ visuel et l'approche de la chirurgie est modifiée.

Pour ce faire, il sera réalisé entre 15 à 18 lésions calibrées sur le foie et la rate chez le cochon. Le modèle porcin présente des caractéristiques anatomiques et physiologiques comparables à l'homme. Ce qui fait de ce modèle est excellent support pour simuler un incident de chirurgie.

Application des 3Rs

Remplacement : Le recours à l'animal est indispensable afin d'étudier le comportement, la performance et le fonctionnement des pansements hémostatiques tissulaire d'application locale en développement dans des conditions physiologiques approchantes de celles imposées par le corps humain.

Réduction : Nous faisons une demande pour 6 cochons. Un seul animal sera utilisé dans un premier temps de manière à tester les modalités d'application et les modalités de création des plaies sur les lobes hépatiques et spléniques. Les 5 autres animaux seront ensuite soumis à un protocole similaire (ou éventuellement modifié sur la base des résultats préliminaires) pour confirmation des résultats.

Raffinement : Durant toute la chirurgie, l'animal est maintenu sous anesthésie profonde (stade 3). La profondeur de l'anesthésie sera contrôlée durant toute la chirurgie par les réflexes cornéens, palpébrales. De plus, les constantes physiologiques (cardiaque, respiratoire et température corporelle) seront enregistrées durant toute la procédure chirurgicale. Pour éviter toute douleur, durant toute la phase de chirurgie, un anti-douleur est administré par voie intra-veineuse en continu. Les réflexes à la douleur sont régulièrement vérifiés et la dose d'anti-douleur sera ajustée.

En post-mortem, il sera réalisé des prélèvements de pièces anatomiques qui sont utilisées dans des enseignements d'initiation aux gestes de base de la chirurgie. Cette façon de procéder permet de réduire le nombre d'animaux et de raffiner les techniques d'apprentissage.

18200 Le cancer du rein est une pathologie dont l'incidence augmente. La découverte est le plus souvent fortuite et à un stade localisé dans 70% des cas. Après exérèse chirurgicale des tumeurs, 20 à 30 % des cancers localisés évoluent sous une forme métastatique avec un pronostic très défavorable.

Dans ce contexte, nous nous intéressons aux microvésicules (MV) libérées par les cellules de la tumeur. Les MV sont dérivées des membranes cellulaires et sont sécrétées dans le milieu extracellulaire par tous types de cellules. Plusieurs études ont mis en évidence qu'elles participent à la communication intercellulaire et jouent un rôle important dans la progression des cancers. Ainsi plusieurs molécules comme des miARN ou des protéines ont été identifiées et caractérisées comme pro-tumorigènes dans les microvésicules issues de cellules cancéreuses.

L'objectif de ce projet est d'évaluer la tumorigénicité des microvésicules sur des xéno-greffes de carcinome rénal à cellules claires chez des souris nude balb/c.

Une telle étude nous permettra de caractériser d'avantage l'impact de ces microvésicules sur la croissance tumorale et envisager une étude préclinique visant à bloquer l'action des microvésicules tumorigènes via une thérapie ciblée.

Notre démarche expérimentale tient ainsi en compte la règle des 3R :

Remplacement : l'utilisation des animaux est indispensable pour la réalisation de notre projet de recherche. Après plusieurs études préliminaires in vitro sur ce sujet, nous voulons confirmer nos hypothèses dans un modèle plus complexe. Seul un modèle in vivo murin permet de soumettre les cellules cancéreuses d'un patient à ses propres microvésicules dans des conditions physiopathologiques proches de la réalité clinique.

Réduction : les modèles seront réalisés sur un nombre nécessaire et suffisant d'animaux (56 souris). Ce nombre a été défini afin d'exploiter des résultats statistiquement fiables.

Raffinement : les souris seront hébergées dans des conditions adaptées à l'espèce avec un enrichissement du milieu. Le protocole expérimental comprend un suivi quotidien des animaux, des indicateurs comportementaux et physiques prédéfinis (état général, prostration, poil hérissé, suivi pondéral de l'animal) seront évalués quotidiennement, et constitueront les points limites de l'expérience (mise à mort de l'animal). Pour éviter toute souffrance de l'animal au cours du protocole expérimental des analgésiques seront donnés. Ce projet s'inscrit ainsi dans une gestion éthique de l'expérimentation animale et est donc en accord avec les réglementations européennes et françaises de bonnes pratiques de laboratoire.

18201 Afin de produire des souris génétiquement modifiées du bon génotype/phénotype qui seront ensuite utilisées dans des projets de recherche, nous devons réaliser des génotypages/phénotypages lors de la phase de production des animaux. Certaines informations ne peuvent pas être apportées par un génotypage à partir d'un prélèvement d'ADN et ainsi un phénotypage peut être réalisé efficacement à partir d'un prélèvement de sang, notamment pour vérifier de la bonne expression, le niveau de l'expression de la molécule d'intérêt ou vérifier une immunodéficience.

REMPACER : Les modèles murins concernés par ce type de génotypage permettent notamment d'étudier les réponses immunitaires de manière intégrée. Ces questions ne peuvent pas être abordées à l'heure actuelle par des méthodes alternatives in vitro ou in silico, et demandent ainsi de faire appel à des modèles animaux, murins dans le cas présent. Par ailleurs, il existe de grandes similitudes entre le système immunitaire murin et humain, et le panel important de modèles murins à disposition représente un important atout pour identifier les paramètres essentiels dans ces processus.

REDUIRE : L'évaluation du génotypage/phénotypage par analyse au niveau protéique nous permet de réaliser une gestion rapide et efficace des colonies et des groupes expérimentaux, en accord avec l'application de la règle des 3R.

RAFFINER : Toutes les dispositions sont mises en œuvre pour le raffinement des conditions d'élevage, en accord avec la structure de bien être animal de la zone protégée (SBEA). Le bien être des animaux est évalué quotidiennement et leur environnement est enrichi en cotons ou cabanes. La procédure décrite dans cette demande de saisine est clairement définie, décrite dans la littérature et validée par le comité de pilotage de la zone protégée. Toutes les personnes impliquées sont formées et sensibilisées à l'évaluation de la souffrance animale, pour détecter et réduire la douleur. Le nombre d'animaux sur l'ensemble de la durée du projet (5ans) s'élève à 2850 souris et le détail par lignée est explicité dans la description de la procédure.

18202 Le vieillissement de l'organisme résulte d'une perte progressive de la capacité à régénérer les tissus. Deux mécanismes essentiels participent à cette altération fonctionnelle, l'accumulation de cellules sénescents présentant une fonction délétère pour le microenvironnement tissulaire ainsi qu'une réduction du nombre de cellules souches adultes à la fonction altérée. Chez l'homme, il existe des mutations dans certains gènes provoquant des syndromes de vieillissement prématurés, modélisés chez la souris et récapitulant les différentes étapes du vieillissement physiologique de façon accélérée, qui nous serviront de modèle.

Un certain nombre d'études indiquent que la circulation systémique, en lien direct avec l'ensemble des tissus de l'organisme pourrait avoir une influence considérable sur le maintien ou l'altération des fonctions tissulaires par l'intermédiaire de facteurs circulants restant à identifier. De façon intéressante, connecter le système circulatoire d'une souris jeune à une souris âgée, permet de restaurer des fonctions altérées par l'âge comme la régénération musculaire, l'hypertrophie cardiaque liée à l'âge, ou la perte de mémoire spatiale ou olfactive. Cependant, à ce jour, aucune expérimentation de ce type n'a été entreprise sur un modèle murin présentant un vieillissement accéléré et fera donc l'objet de notre étude.

En conséquence, nous proposons un projet dont l'objectif principal est de préciser la nature et l'effet de ces facteurs circulants en utilisant un ensemble de modèles murins pertinents et disponibles, ainsi qu'une approche expérimentale de parabiose particulièrement bien documentée.

Un modèle de vieillissement prématuré et d'autres juvéniles ou présentant une capacité de régénération augmentée, nous permettra de déterminer in vivo les effets sur la sénescence et la régénération tissulaire d'un changement de

l'environnement circulatoire associé. Nous pensons que ce projet inédit contribuera non seulement à mieux comprendre les variations biologiques liées au vieillissement, mais aussi à élaborer des stratégies thérapeutiques innovantes visant à améliorer la physiologie tissulaire altérée avec l'âge et conduisant à l'établissement de pathologies chroniques.

Pour cette étude nous prévoyons d'utiliser 261 souris génétiquement modifiées. Le suivi des animaux sera réalisé selon les règles en vigueur de la directive 2010/63 (surveillance quotidienne, soins et suivi, compétence et responsabilité du personnel, prise en charge de la douleur...). Les dispositions prises pour l'application de la règle des 3R sont les suivantes : - « Réduire » le nombre d'animaux en expérimentation.

Les animaux feront l'objet d'un suivi quotidien afin de prendre les mesures évitant toute souffrance éventuelle. Un délai d'acclimatation sera respecté dans les procédures nécessitant un isolement des animaux. L'ajout d'éléments d'enrichissement dans les cages sera systématiquement effectué, des rouleaux de papier toilette, une litière adéquate, du coton, et bâtons en bois afin d'empêcher la malocclusion et favoriser leur comportement naturel, alimentation adaptée, respect du cycle jour/nuit, une température (18-23°C) et une humidité d'environ 40-60%.

Ces souris présentent un phénotype de vieillissement accéléré (espérance de vie moyenne 40 semaines pour les hétérozygotes). L'examen journalier des souris sera effectué pour détecter et renseigner dans des fiches de suivi individuelles les premiers signes comportementaux de la douleur ou d'éventuelles anomalies (isolement, absence de mobilité, perte d'appétit, hérissure des poils, dos voûté...). L'état de santé des animaux sera évalué par le test de réflexe du retournement et de la capacité d'agrippement qui constitueront un point limite entraînant la mise à mort de l'animal. Si une perte de poids supérieure à 20% du poids maximal est observée, les souris seront mises à mort et enlevées des lots expérimentaux. Dès les premiers signes de difficultés de déplacement ou de nutrition, de la nourriture humidifiée sera ajoutée dans les cages. Pour avancer, ce type d'analyse nécessite l'utilisation d'animaux puisqu'à l'heure actuelle, aucun modèle in vitro n'est capable de représenter la complexité de l'ensemble des mécanismes physiologiques et systémiques. Aussi, dans le cadre de ce projet, une étude sur l'organisme entier est nécessaire.

18203 Les complications cardiovasculaires représentent l'une des premières causes de morbidité et de mortalité chez les patients âgés. Elles conduisent, entre autres, à des pathologies ischémiques, c'est-à-dire des interruptions de la circulation sanguine causant la mort des cellules environnantes. Des exemples courants sont l'ischémie du membre inférieur (interruption de la circulation sanguine dans les jambes) ou l'accident vasculaire cérébral (ou AVC, induisant des dommages au cerveau). Dans ces pathologies, un défaut de formation des nouveaux vaisseaux (qui pourraient aider à la réparation du tissu endommagé) est constaté. Pour étudier ces pathologies, il existe un modèle animal de vieillissement vasculaire provoqué par un désordre métabolique. Un traitement protecteur du réseau artériel vis-à-vis de l'installation de ce vieillissement des vaisseaux a également été mis au point. L'effet protecteur de l'inhibition d'une protéine spécifique présente dans les cellules des

vaisseaux a ainsi été démontré dans un modèle d'ischémie du membre inférieur. L'objectif de cette nouvelle étude est d'explorer, chez des souris âgées de 6 mois (170 souris au total), l'effet protecteur de l'inhibition de cette même protéine dans une autre pathologie, l'AVC ischémique. Le traitement protecteur sera administré à des souris par injection dans la circulation sanguine de nanoparticules porteuses d'inhibiteurs ciblant cette protéine d'intérêt. Les souris seront suivies de façon longitudinale tout au long de l'étude et ce dès le début du vieillissement métabolique et artériel induit par un régime riche en protéines et en lipides et pauvre en glucides. Après 3 mois de ce régime couplé au traitement, nous mimerons l'AVC ischémique en utilisant un modèle in vivo d'ischémie cérébrale. La récupération de cet AVC sera suivie en imagerie par résonance magnétique (IRM) 48h après la chirurgie, pour évaluer les effets directs de l'AVC sur le cerveau et ses vaisseaux, puis une et trois semaines après l'AVC pour évaluer la formation de nouveaux vaisseaux. A la fin du suivi en IRM, les animaux seront euthanasiés et le cerveau extrait pour des analyses immunohistochimiques.

Ce projet d'une durée de 5 ans sera réalisé en conformité avec la règle des 3R. Le projet a pour but d'étudier l'ischémie cérébrale dans un contexte de vieillissement vasculaire, ce qui met en jeu des mécanismes à l'échelle de l'organisme entier. Il nécessite donc l'utilisation d'animaux vivants. Nous avons réduit le nombre de souris utilisées au minimum nécessaire et suffisant pour valider scientifiquement notre étude du point de vue de l'analyse statistique. Ce nombre est basé sur des résultats précédents ainsi que la connaissance du taux d'échec de la chirurgie induisant l'AVC. De plus un suivi longitudinal en IRM permet de réduire le nombre d'animaux utilisés pour répondre à notre objectif. Les animaux seront mis sous régime et traités dans un autre établissement utilisateur, qui s'occupera également de la chirurgie induisant l'AVC. Les animaux seront transportés le lendemain de la chirurgie dans notre établissement pour une IRM évaluant les effets immédiats de l'AVC. Ce transport est nécessaire car le régime, les traitements et la chirurgie sont propres à l'autre établissement, tandis que notre établissement possède les machines IRM nécessaires à l'étude de l'angiogenèse du cerveau. Afin de prévenir toute douleur qui pourrait être associée au modèle, les animaux recevront un traitement antalgique, démarré dans l'autre établissement utilisateur et continué jusqu'au jour de la première IRM. Un suivi clinique et une surveillance des animaux seront réalisés à l'aide d'une grille de score avec la mise en place de points limites. Tout animal présentant des signes de souffrance sera pris en charge et/ou euthanasié selon le score. Concernant l'imagerie, le réveil de l'animal sera réalisé sous supervision. L'imagerie par résonance magnétique est réalisée sous anesthésie à l'isoflurane et n'occasionne aucune douleur ou angoisse chez les animaux.

Ce travail permettra de montrer l'effet protecteur de l'inhibition de cette protéine au niveau des vaisseaux cérébraux et de la proposer comme cible thérapeutique pour les patients à risque d'AVC.

18204 Environ 15% des cas d'infertilité masculine ont une origine immunologique, de l'inflammation chronique à la réaction auto-immune qui détruit les spermatozoïdes. Notre objectif est d'acquérir une meilleure connaissance du système immunitaire et de son organisation au sein des organes sexuels mâles, et plus particulièrement au niveau posttesticulaire. En effet, suite à leur production dans le testicule, les spermatozoïdes acquièrent leur pouvoir fécondant au cours d'une phase de maturation post-testiculaire. Du point de vue immunologique, il y a un véritable challenge : contrôler efficacement les pathogènes entrants tout en évitant un emballement de la réponse immunitaire pouvant mener à une réponse auto-immune et donc à une infertilité. Ce deuxième axe fait l'objet d'un projet de recherche au sein de l'équipe. Actuellement, aucune publication ne décrit le ganglion drainant de l'épididyme murin alors même qu'il est le lieu d'initiation des réponses immunitaires. Dans un projet précédemment déposé et accepté, nous avons débuté l'identification de ce ganglion drainant et nos résultats suggéraient l'existence de plus d'un ganglion drainant pour notre organe cible. Nous souhaitons donc poursuivre et achever leur identification afin de poursuivre efficacement notre étude de l'organisation du système immunitaire qui se met en place dans des situations qui mènent à l'infertilité chez l'homme, notamment en contexte infectieux. Cet objectif sera rempli par injection d'un antigène fluorescent dans l'épididyme et suivi de la fluorescence dans différents ganglions à différents temps post-injection. Ce projet s'applique à combler l'exigence de la règle

des 3R. En effet, le nombre d'animaux est réduit car nous aurons recours à 70 souris mâles BALB/c sauvages afin d'atteindre notre objectif, qui est purement descriptif. Notre étude portant sur l'immunité des organes reproducteurs mâles, nous utiliserons des souris mâles sexuellement matures, âgées de trois à six mois. Le deuxième R s'attache au raffinement des conditions de vie des animaux ou la souffrance créée par l'opération, réalisée sous anesthésie générale, est modérée selon les critères officiels (arrêté du 1er février 2013 relatif à l'évaluation éthique et à l'autorisation des projets impliquant l'utilisation d'animaux dans des procédures expérimentales). Cependant, les animaux seront supplémentés en anti-douleurs à la fin de l'opération et surveillés jusqu'à leur réveil et à leur mise à mort qui est prévue dans l'heure qui suit la fin de l'opération. Finalement, le troisième R, qui vise à remplacer l'expérimentation sur animaux ne peut malheureusement pas s'appliquer dans notre étude. En effet, le recours au modèle animal est ici incontournable étant donné que nous devons suivre la migration de la molécule fluorescente au cours du temps. Notre choix du modèle murin repose sur le fait que la souris est une référence en immunologie. De plus, l'objectif à long terme est d'étudier la réponse immunitaire mise en place dans l'épididyme murin et de nombreux mécanismes, cellules immunitaires et cytokines sont communs à l'homme et à la souris. Cette première étape est indispensable au bon déroulement du projet qui amènera à une meilleure compréhension de l'environnement immunitaire de l'épididyme, des mécanismes mis en jeu dans les réponses aux pathogènes du tractus uro-génital et pourrait à terme permettre une prise en charge adaptée de l'infertilité masculine.

18205 La maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT) correspond à un groupe hétérogène de neuropathies périphériques héréditaires. Bien que classée parmi les maladies rares, la maladie CMT est reconnue comme la pathologie neuromusculaire héréditaire la plus fréquente. Sa prévalence, qui varie en fonction de la localisation géographique, est estimée en France à 1 personne sur 2500 (soit environ 30 000 patients concernés). La maladie CMT résulte d'une grande variété de mutations (plus de 1000 rapportées à ce jour) affectant plus de 80 gènes différents. Ces gènes codent des protéines exprimées dans différents compartiments des nerfs périphériques : myéline compacte et non compacte, cellule de Schwann, axone. Le défaut d'expression ou la surexpression de ces protéines perturbe l'intégrité et le fonctionnement des nerfs périphériques, principalement au niveau des membres supérieurs et inférieurs. Ces atteintes nerveuses entraînent une diminution de la force musculaire, une atrophie des muscles des extrémités à l'origine de déformations des pieds, des troubles de la marche et de l'équilibre, une fatigue ainsi que des pertes de sensibilité. La forme la plus fréquente de la maladie est le sous-type 1A (CMT1A) qui représente à lui seul de 40 à 50% des cas. La mutation à l'origine de la forme CMT1A est une duplication du gène PMP22. Ce gène code une protéine de la myéline des nerfs périphériques, la protéine PMP22, dont la surexpression conduit progressivement à un défaut de myélinisation à l'origine de la maladie. À ce jour, il n'existe aucun traitement permettant d'inverser ou de freiner ce processus pathologique. Les travaux de recherche que nous avons réalisés au cours des dernières années nous ont permis d'identifier un composé qui pourrait constituer un outil thérapeutique efficace. L'objectif de cette étude est de confirmer le potentiel thérapeutique de ce composé dans des modèles animaux reproduisant la physiopathologie de la maladie CMT1A, avant d'envisager un essai clinique chez l'Homme.

L'étude de la maladie CMT1A est rendue difficile par un accès limité aux neurones de patients. Par ailleurs, les modèles cellulaires ne permettent pas de mimer les atteintes neurologiques des patients. Le recours à des modèles animaux est donc indispensable aux études visant à mieux comprendre la physiopathologie de la maladie CMT1A et à développer des stratégies thérapeutiques efficaces. Les modèles animaux retenus sont le rat transgénique CMT1A et la souris transgénique C22, qui constituent respectivement les modèles les plus fidèles de la maladie CMT1A humaine.

Le protocole expérimental répond aux exigences de la règle des 3R :

- Remplacer : Les expériences destinées à la compréhension du mécanisme d'action du candidat médicament et de son éventuelle toxicité cellulaire seront réalisées à partir de modèles alternatifs (de type culture cellulaire). Néanmoins, les modèles *in vitro* ne permettent pas de modéliser la complexité de la réponse d'un organisme entier suite à l'administration d'une substance

potentiellement thérapeutique. Le modèle du rat transgénique CMT1A et de la souris C22 sont à ce jour les meilleurs modèles expérimentaux de la maladie CMT1A. Il n'existe par conséquent pas de solution alternative à l'utilisation de ces animaux.

- Réduire : Un calcul de puissance statistique a été réalisé pour les procédures expérimentales qui s'y prêtent (hors procédures « pilotes »). Un maximum de 153 rats et de 153 souris sera utilisé au cours de ce projet.

- Raffiner : Les animaux sont élevés dans des conditions d'hébergement qui respectent leur bien-être (contrôle de la température et de l'hygrométrie de l'environnement, respect de la densité d'animaux par cage, présence systématique d'enrichissement, surveillance quotidienne de l'état général des animaux...). Par ailleurs, l'ensemble des procédures expérimentales sera réalisé de manière à éviter le stress et la souffrance des animaux.

18206 Objectif scientifique du projet :

Nous avons montré que la protéine Y est surexprimée dans de nombreux cancers et qu'elle est sécrétée à la membrane des cellules cancéreuses uniquement dans ces conditions, ce qui lui confère une grande spécificité.

Nous avons développé un anticorps monoclonal ciblant la Protéine Y. Cet anticorps est actuellement testé pour une phase 1 chez l'homme. Des études in vitro et in vivo ont mis en avant la capacité de cet anticorps à bloquer Protéine Y et à induire la mort cellulaire des cellules tumorales. Nous avons développé une stratégie basée sur la radio-immunothérapie, qui consiste en l'utilisation d'anticorps comme des transporteurs de molécules radioactives vers une cible spécifique (en l'occurrence une tumeur). Cela permet ainsi d'imager ou d'irradier spécifiquement la zone exprimant la cible de l'anticorps utilisé suivant le radio-isotope utilisé. Ce domaine a fait l'objet de nombreuses études pré cliniques et cliniques amenant notamment la mise sur le marché de 2 anticorps radiomarqués pour le traitement des lymphomes non Hodgkiniens, le Bexxar® et le Zevalin®.

Objectif du projet et retombées attendues dans le domaine :

Notre projet a deux objectifs :

- Le premier est de développer un nouveau radio pharmaceutique permettant l'imagerie in vivo de l'expression de la Protéine Y au niveau tumoral. Le composé radioactif injecté qui se concentrera uniquement dans les tumeurs exprimant fortement la protéine Y, permettra sa détection par imagerie dans des modèles précliniques murins. Cette étude devrait nous permettre à terme de sélectionner des patients éligibles au nouveau traitement anti-protéine Y par imagerie.

- Le second objectif de notre projet est de développer un agent de radiothérapie métabolique en le couplant avec un isotope pertinent pour la thérapie afin de détruire les tumeurs de l'intérieur. Notre but est que la radio-activité se concentre dans les tumeurs exprimant beaucoup de protéine Y, que notre nouvelle molécule la détecte et se concentre à son tour dans le tissu tumoral. La radio-activité à forte dose locale devrait ainsi bloquer la division cellulaire et induire la mort des cellules cancéreuses.

Afin de répondre à ces objectifs différents modèles de souris seront utilisés dans cette étude: a savoir des souris avec xénogreffes et un modèle de souris transgénique qui développe des tumeurs spontanées.

Balance dommages/bénéfices :

L'utilisation de la souris est une nécessité pour ce projet car l'utilisation d'un organisme entier est indispensable afin d'analyser la dispersion spatiale des traceurs d'imagerie. En effet, des études de la biodistribution de notre nouvelle molécule thérapeutique seront réalisées au sein des différents organes ainsi qu'une étude de sa potentielle toxicité sur les organes sains. Ces expériences ne sont donc pas réalisables sur des modèles in vitro. Brièvement, les animaux seront « imagés » afin de voir si le traceur s'accumule dans les tumeurs, favorisant leur identification de manière non invasive. En cas d'accumulation dans les tumeurs, un second radio-isotope sera couplé à l'anti-protéine Y,

afin d'amener de manière ciblée une dose de radioactivité nécessaire pour tuer les cellules cancéreuses.

Pour ce faire, les animaux subiront pour ce projet des greffes de cellules tumorales, des injections en intraveineuses des différentes molécules thérapeutiques ainsi que des procédures d'imagerie.

Conformité avec la règle des 3R :

Le développement d'un nouveau traceur d'imagerie est en soit un effort de raffinement afin de ne pas procéder à la mise à mort des animaux. Les effectifs définis ont été déterminés à l'aide de comportement connu de ces différents modèles expérimentaux et tiennent compte des exigences statistiques nécessaires à l'exploitation des résultats. Les points limites ont été précisément définis et une surveillance adaptée des animaux tout au long des expériences permettra un contrôle de toute douleur animale. L'ensemble des procédures d'acquisition d'images sera réalisé sous anesthésie générale des animaux.

Nombre total d'animaux inclut dans ce projet : 2848 animaux au maximum.

18207 Certaines espèces de micro-organismes rencontrées dans les zones côtières sont capables de produire des métabolites secondaires toxiques. Ces toxines peuvent être véhiculées le long de la chaîne alimentaire marine y compris des produits consommés par l'homme. Récemment, la présence d'agents toxiques, ne faisant pas partie des toxines connues, produites par les phytoplanctons a été mise en évidence au Nord de la Tunisie, mais est probablement présente à une échelle plus large. Des études ont montré que la toxicité est associée à la présence de champignons microscopiques marins producteurs d'une toxine, la C17-Sphinganine Analogue MycoToxine (C17-SAMT). Des premières études ont montré une capacité de la C17-SAMT à induire des dommages à l'ADN in vitro, aussi il est important d'analyser d'éventuelles modifications du génome (génétoxicité) in vivo afin de confirmer ces effets, ainsi le recours à l'expérimentation sur animal est nécessaire. Après détermination de la dose maximale tolérable pour la C17-SAMT chez la souris, l'objectif de l'étude est de réaliser différents tests de génétoxicité après administration orale de la C17-SAMT chez la souris. Une pré-étude de toxicité aiguë permettra de déterminer la dose maximale tolérable et sera réalisée sur 10 animaux afin de déterminer les niveaux de doses pour l'étude principale. Dans l'étude principale, les animaux recevront par gavage 3 administrations en 48h de C17-SAMT. Les animaux seront ensuite mis à mort pour récupérer des organes afin de réaliser les tests de génétoxicité. Le nombre d'animaux, 40 au total, est réduit à son strict minimum. Un point limite a été défini et les animaux seront mise à mort dès que ce point limite sera atteint. Cette étude requiert l'utilisation d'animaux, car il n'existe pas à l'heure actuelle de méthodes alternatives suffisamment prédictives de la génétoxicité in vivo.

18208 Dans les processus inflammatoires de type « orage cytokinique », tels que ce qui est observé chez les patients COVID-19, peu ou pas de médicament efficace n'est aujourd'hui disponible.

Notre équipe a développé une molécule de synthèse, que nous appellerons Mx; cette molécule réduit l'inflammation dans des modèles représentatifs de septicémies et de ces « orages cytokiniques » que l'on retrouve dans plusieurs pathologies. A des doses efficaces, cette nouvelle classe de molécules n'induit aucune toxicité dans des cellules humaines en culture et chez la souris.

Ainsi, nous souhaitons valider l'activité biologique de notre molécule la plus puissante dans un modèle murin d'infection virale pulmonaire. Nous allons étudier l'efficacité de la molécule Mx notamment sur la survie et le rétablissement des souris après infection par le virus de la grippe. Nous analyserons également la composition des cellules immunitaires dans le poumon et le profil des protéines dites cytokines (jouant un rôle dans l'inflammation) des souris traitées ou non par la molécule Mx, après infection.

L'effet bénéfique escompté est une augmentation significative de la survie et la récupération des souris permettant d'envisager une nouvelle approche thérapeutique dans les complications sévères des maladies telles que l'infection au coronavirus SARS-CoV-2.

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

Remplacement : nous avons dans un premier temps réalisé des expériences in vitro qui nous ont permis d'étudier le mécanisme d'action de la molécule mais seul un modèle vivant tel que la souris, récapitulant la complexité du vivant permettra de vérifier l'efficacité thérapeutique des molécules d'intérêt et leur effet sur la réponse antivirale, l'inflammation et sa régulation.

Réduction : Pour ces expériences nous avons besoin de 42 souris. Ce nombre est le minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement significatifs.

Raffinement : Les animaux seront surveillés quotidiennement afin de s'assurer de leur bien-être. Des points limites sont définis de façon à arrêter l'expérimentation dès l'apparition d'une souffrance des animaux.

18209 Notre projet de recherche fondamentale vise à comprendre les toutes premières étapes du développement des embryons de Mammifères depuis la fécondation jusqu'à l'implantation dans l'utérus et la mise en place des premiers lignages embryonnaires. Au cours des premières étapes de développement, les cellules qui composent cet embryon vont progressivement se modifier et se séparer en deux types de cellules : d'une part des cellules différenciées, qui formeront plus tard le placenta, et d'autre part des cellules dites pluripotentes qui sont capables de se différencier en toutes les cellules de l'individu à naître et donc qui formeront le fœtus. Nous étudions dans le modèle de la souris comment se mettent en place ces deux types de cellules. Plus précisément, notre projet a pour objectif d'approfondir notre connaissance des mécanismes épigénétiques à l'œuvre au cours de ces étapes très précoces du développement. L'épigénétique est l'étude des mécanismes qui modifient l'expression des gènes de façon réversible, adaptative et transmissible, sans modification de la séquence de l'ADN. Elle se traduit par des ajouts de groupements méthyl sur la cytosine de l'ADN et par des modifications de protéines appelées histones autour desquelles s'enroule la fibre d'ADN. Nous nous intéressons donc au rôle de l'environnement dans cette régulation et à son impact éventuel à plus ou moins long terme sur le développement de l'embryon. Ces travaux devront, entre autres, permettre d'évaluer l'impact des procédures de procréation médicalement assisté (PMA), chez l'Homme, sur la qualité des embryons et les conséquences possibles lors de la vie adulte.

Nous étudierons plus particulièrement la dynamique de ces marques épigénétiques au cours des premières étapes du développement (du stade une-cellule jusqu'à l'implantation). Nous utiliserons des inhibiteurs des protéines qui apposent ou enlèvent ces marques afin de perturber (augmenter ou diminuer) leur quantité au cours du développement pré-implantatoire. Il s'agira ensuite de déterminer l'impact de ces perturbations sur le développement des embryons in vitro et sur l'organisation de la chromatine et l'expression du génome. Ces inhibiteurs seront ajoutés au milieu de culture des embryons.

Ce projet portant sur le développement embryonnaire, il nous est impossible de remplacer l'animal par un modèle cellulaire ou par une simulation informatique. Les animaux utilisés dans le cadre de ce projet sont nés en captivité et ont été élevés à des fins expérimentales par des élevages agréés et reconnus dans l'expertise d'élevage de rongeurs. Ils sont ensuite hébergés par l'établissement utilisateur agréé dans des conditions protégées EOPS (Exempt d'Organismes Pathogènes Spécifiques), et avec un enrichissement du milieu (possibilité de construire des nids, d'utiliser des petits objets en bois pour grimper).

Pour ce projet de 5 ans, nous utiliserons 1250 souris femelles élevées en condition EOPS. Ce nombre a été déterminé lors de la conception du protocole expérimental, comme nécessaire et suffisant à l'obtention de résultats statistiquement exploitables.

Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, nous procéderons à un protocole de stimulation ovarienne qui permet de collecter deux fois plus d'embryons par femelle. La procédure consiste en deux injections d'hormone à 48h d'intervalle préalablement à l'accouplement. La piqûre est considérée comme ne générant qu'une douleur légère et un faible stress. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience afin d'intervenir de manière appropriée et immédiate au moindre signe de mal-être tel que prostration, poil hérissé, pelage sale.

Les souris sont ensuite accouplées et la présence d'un bouchon vaginal permet de s'assurer que la fécondation a bien eu lieu. Les embryons sont ensuite collectés par dissection de l'appareil génital à différents temps (de 1 jour à 5 jours après la fécondation), après euthanasie de la femelle.

Enfin, nous essayons aussi de réduire le nombre d'embryons utilisés en réalisant une veille technologique et en modifiant en conséquence les techniques de biologie moléculaire utilisées dans nos projets. Les avancées technologiques récentes nous permettent ainsi de mieux valoriser la faible quantité de matériel (protéines ou acides nucléiques) présent dans les embryons constitués de 1 à 64 cellules et d'utiliser 10 fois moins d'embryons par rapport au début des années 2000.

18210 Le diabète est une maladie qui touche environ 350 millions de personnes dans le monde. Il existe principalement deux types de diabète : le diabète de type 1 et celui de type 2. Le diabète de type 2 est plus fréquent, touchant plus d'un million et demi de personnes en France et ne cesse d'augmenter. Il représente ainsi environ 85 % de l'ensemble des diabètes. Cette maladie métabolique est caractérisée par un excès chronique de sucre dans le sang (hyperglycémie) et s'accompagne souvent d'un surpoids. D'après nos études récentes chez l'homme, des anomalies apparaissent sur certaines populations de cellules du système immunitaire chez les patients diabétiques.

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

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

Ce projet prévu pour 3 ans nécessitera au total 872 souris. Toutes les procédures expérimentales ont été élaborées de manière à respecter le principe des 3R, tout en obtenant des résultats avec des analyses statistiques satisfaisantes.

Pour chacune de ces procédures, le bien-être des animaux est surveillé, de l'enrichissement est ajouté dans leurs cages.

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

18211 Avec plus de 40 000 nouveaux cas et 17. 000 victimes par an, le cancer colorectal (CCR) est la plus fréquente des tumeurs malignes et la deuxième cause de décès par cancer en France. Si la survie relative à 5 ans est de 57 %, le pronostic est étroitement lié au stade auquel le cancer est diagnostiqué. Notamment, elle n'est que de 5 % en cas de cancers métastatiques malgré l'amélioration de la chirurgie, des chimiothérapies et des thérapies ciblées. A ce jour, la chirurgie et des cocktails de chimiothérapies (5-fluorouracile et irinotécan essentiellement) visant uniquement les cellules tumorales en prolifération demeurent la pierre angulaire du traitement des CCR métastatiques. Cependant, l'efficacité de ces traitements est fortement entravée par l'apparition fréquente de la résistance aux médicaments et la récurrence tumorale. La compréhension des mécanismes biologiques impliqués dans la récurrence tumorale a connu un essor important avec la découverte de l'existence des cellules souches cancéreuses (CSC) dans de nombreux cancers, incluant le cancer du côlon. Des données récentes montrent que ces CSC résisteraient aux thérapies conventionnelles et seraient à l'origine de l'apparition de métastases et de la récurrence tumorale.

Dans ce contexte, nous avons récemment identifié une protéine potentiellement impliquée dans la chimiorésistance des CSC. Dans le cadre de ce projet de recherche, nous voulons donc évaluer l'impact de nouvelles molécules ciblant spécifiquement cette voie de signalisation sur le potentiel d'échappement aux chimiothérapies et d'initiation tumorale des cellules souches cancéreuses coliques. Pour mener à bien notre projet, Nous réaliserons des xénogreffes de cellules tumorales humaines en sous-cutanée dans des souris immunodéprimées (250 animaux) afin de déterminer les effets de ces molécules sur la chimiorésistance, la récurrence post-traitement et le potentiel d'initiation tumorale des cellules tumorales coliques.

Afin de respecter les principes des 3Rs (Réduire, Raffiner et Remplacer), nous avons :

i) réduit au minimum le nombre d'animaux requis pour ces expériences originales en fonctions de nos études précédentes. Nous utiliserons des kits et des protocoles permettant de préparer suspension cellulaire

, ADN, ARN et protéines à partir du même échantillon afin de réduire encore le nombre d'animaux.

ii) Mis en place une grille d'évaluation de la douleur et des points limites adaptés à l'injections de cellules tumorales en sous-cutanée et l'injections de chimiothérapies afin de minimiser la douleur subie par les animaux et d'identifier les critères d'interruption. Les souris sont élevées selon les recommandations de la directive européenne 2010/63/EU dans des grandes cages et enrichies par un matériel de nidification. Dans nos conditions d'élevage, le phénotype de la lignée utilisée (souris *nod scid*) est considéré comme non dommageable. Enfin, nous n'effectuerons pas d'expérimentation invasive induisant douleur et stress sur les animaux vivants. Les animaux seront surveillés quotidiennement pour détecter précocement l'apparition éventuelle de douleur ou stress. Ils seront euthanasiés si nous observons l'un des signes définis dans notre grille d'évaluation de la douleur et des points limites.

iii) optimisé les procédures expérimentales afin de réduire l'inconfort subi par les animaux tout en optimisant les informations obtenues, via notamment la mise en place de procédures de remplacement par des modèles *in vitro* afin de confirmer et de renforcer les résultats obtenus. Cependant, les modèles de cultures cellulaires *in vitro* ne peuvent pas se substituer efficacement aux analyses *in vitro* car elles ne prennent pas en compte le rôle du métabolisme et du microenvironnement dans le processus de chimiorésistance et de récurrence. Ces expériences ne peuvent donc pas être réalisées autrement que sur la souris immunodéprimée,

sans que cela se traduise par l'obtention de résultats moins fiables.

18212 Notre plateforme *in vivo* réalise une palette de prestations très large, allant de la mise à disposition des modèles de maladies métaboliques, telles que le diabète, l'obésité, les maladies inflammatoires du foie comme la NASH (de l'anglais Non alcoholic steatosis hepatitis) à la réalisation d'études sur la nutraceutique (suppléments alimentaires, prébiotiques et probiotiques) selon les besoins du demandeur. Dans ce contexte, la plateforme est amenée à développer des modèles spécifiques pour répondre aux questions scientifiques posées par ses utilisateurs. De ce fait, il est nécessaire de développer un modèle capable de détecter et suivre de manière individuelle différents paramètres, tels que les paramètres métaboliques, comportementaux et physiologiques. Des techniques et équipements très sensibles capables de mesurer la prise alimentaire, la dépense énergétique journalière de chaque animal (individuellement) seront utilisés. Ces mesures peuvent durer de 1 à 12 semaines. Concernant les expérimentations individuelles de longue durée (à partir de 4 semaines), chaque cage aura un enrichissement plus important, comme du nestlet pour garder la chaleur ou mimer un nid, l'igloo pour filtrer la lumière et apporter un abri, l'aspen brick et le tunnel pour l'interaction, la distraction et l'activité. Les souris étant des animaux sociaux, elles doivent être mises en cage par groupe. Cependant, pour les études avec des analyses métaboliques et/ou du microbiote, un isolement est nécessaire afin que la pertinence des analyses soient fiable. La directive de l'Union européenne (UE) qui régit les soins et l'utilisation des animaux dans la recherche et les essais exige des États membres qu'ils veillent à ce que "toutes restrictions concernant la mesure dans laquelle un animal ne peut satisfaire ses besoins physiologiques et éthologiques sont réduites au minimum". Néanmoins, les contacts sociaux

obtenus par l'hébergement des différents animaux dans des cages adjacentes participant à l'enrichissement. Sachant l'importance que le composant social a pour la science et pour le bien-être animal, les procédures d'enrichissement de l'environnement et de l'expérimentation ont été approuvées par notre équipe SBEA et le vétérinaire référent. L'établissement de signes cliniques journaliers (comportementaux, tels que l'agressivité et l'apathie ; physiologique, tel que la perte de poids supérieur à 20% du poids d'origine) classés par sévérité, ainsi que la définition et application des points limites permettent de veiller au bien-être des animaux. Selon l'analyse du marché auquel nos potentiels clients peuvent nous demander ce type de prestation, nous avons calculé un maximum de 400 souris durant les 5 ans.

18213 Le traitement des hémopathies malignes par transplantation de cellules souches hématopoïétiques allogéniques peut induire des complications graves telle que la réaction du greffon contre l'hôte (GvHD). Plusieurs voies seraient susceptibles de prévenir la GvHD, dont la composition du microbiote intestinal, l'activité des lymphocytes T régulateurs (Treg) et la voie purinergique permettant, via CD39 et CD73, la dégradation de l'ATP pro-inflammatoire en adénosine immuno-suppressive.

Nous avons identifié une nouvelle population CD3+/CD4+/CD8αLOW/CCR6+/CXCR6+ de Treg humains, appelé DP8α, dont le TCR est spécifique de *Faecalibacterium prausnitzii*, une bactérie commensale du microbiote intestinal. De plus, ces Treg exercent leur fonction suppressive via l'activité purinergique médiée par CD39 et CD73. Nous avons donc investigué le rôle potentiel de ces Treg dans la prévention de la GvHD chez 63 patients atteints d'hémopathies malignes ayant reçu une greffe de cellules souches hématopoïétiques allogéniques. De façon intéressante, la survenue de GvHD aigüe (n=21) était fortement associée ($p < 0,001$) avec un défaut d'expression de CD73 spécifiquement sur les Treg DP8α. Ces résultats suggèrent qu'une altération de la fonction suppressive des Treg DP8α, médiée par CD73, pourrait contribuer à la physiopathologie de la GvHD aigüe.

Afin de tester le rôle de ces Treg *in vivo*, nous allons utiliser un modèle murin (souris NSG) pré-clinique dans lequel la xéno-GvHD sera induite par injection de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) humain contenant ou non des Treg DP8α à 3 différents ratios (3:1 ; 1:1 et 1:3) afin de déterminer si ces derniers peuvent limiter l'apparition de la GvHD.

Au total, ce projet nécessitera 300 souris.

L'utilisation d'animaux pour l'évaluation de l'impact des Treg DP8α sur la xéno-GvHD nous permettra de conforter nos observations cliniques et de valider *in vivo* les observations déjà obtenues dans un système beaucoup plus simple *in vitro*.

Remplacement : Les paramètres étudiés dans ce travail ne peuvent être aujourd'hui remplacés par des procédures *in vitro*. Réduction : Le nombre de souris a été réduit au minimum afin de garder une analyse statistique fiable et ce nombre a été optimisé en fonction des expériences précédentes. Raffinement : Pour leur confort, les animaux seront hébergés dans des cages adaptées (groupe de 5 max), avec enrichissement (frisottis et/ou dôme) et accès libre à l'eau et à la nourriture. De façon à diminuer le stress, la souffrance et la douleur, un certain nombre de procédures seront réalisées sous anesthésie générale et un traitement analgésique leur sera donné de façon adaptée en fonction de la procédure réalisée. Le bien-être des animaux est surveillé tout au long de l'étude avec une évaluation quotidienne des signes généraux.

18214 Le Syndrome de Down (SD) aussi appelé Trisomie 21 (T21), est dû à la présence d'un chromosome 21 surnuméraire. Ce syndrome touche 1 nouveau-né pour 600-800 naissances et représente environ un tiers des déficiences intellectuelles chez les enfants d'âge scolaire. C'est la forme la plus fréquente de retard mental, qui est également associée à un large panel de dysmorphies ou malformations. Parmi les gènes candidats à l'apparition de ces symptômes, un gène présent sur le chromosome 21 humain et donc en 3 copies chez les sujets porteurs de la T21, est aujourd'hui une des cibles privilégiées pour le développement de traitements thérapeutiques. Les études de ce gène chez la souris ont démontré son implication dans le développement crânio-facial et le développement et la maturation du cerveau. En effet, les souris ayant une copie supplémentaire de

ce gène présentent des anomalies crânio-faciales ainsi qu'une altération des capacités d'apprentissage et un déficit de la mémoire similaires à celles observée dans la T21.

Arriver à déplacer de quelques dizaines de points le quotient intellectuel des patients atteints de la T21 leur permettrait d'avoir une vie plus autonome et socialement intégrée et constituerait un progrès très important pour la qualité de vie des patients et de leur entourage. L'objectif de la recherche sur la T21 est donc de mettre au point un traitement améliorant les fonctions intellectuelles des patients.

Des collaborateurs proposent des composés ayant la propriété d'améliorer les capacités cognitives qui sont altérées dans cette pathologie en ciblant l'activité de notre protéine d'intérêt. Durant ce projet, nous souhaitons déterminer le composé parmi 2 candidats (composés 1 et 2) qui se révélera le plus efficace en termes de restauration des fonctions intellectuelles. Ces composés seront synthétisés et testés pour l'ADME pharmacologique (administration, distribution, métabolisation et excrétion) par nos collaborateurs. Ces composés seront ensuite administrés par notre équipe à des souris modèles de T21 et à des souris sauvages dans le but de s'assurer qu'ils n'ont pas d'effet toxique. Les souris traitées feront l'objet de différents tests comportementaux afin de détecter une amélioration de leurs performances cognitives. Par la suite, le composé induisant la meilleure amélioration des performances intellectuelles des souris trisomiques, sera testé sur un modèle de rat de la trisomie 21. De plus, il faut noter que le premier composé (EMD10) a déjà fait l'objet d'une étude précédente (traitement sur 19 jours à 3mg/kg) durant laquelle nous avons pu observer une amélioration des fonctions cognitives des souris trisomiques sans aucun effet toxique observé. Cependant, dans ce projet nous souhaitons continuer l'analyse de ce premier traitement et l'optimiser avant de passer au prochain composé.

REMPACEMENT :

L'utilisation de la souris et du rat dans cette étude est justifiée par le fait que les anomalies à observer (altération des capacités d'apprentissage et déficit de la mémoire) nécessitent un modèle vivant et suffisamment proche de l'homme pour pouvoir être transposées à l'espèce humaine. De plus, sachant qu'il existe des différences inter-espèces il est intéressant de comparer les résultats entre les 2 organismes afin de généraliser les résultats si ces derniers sont similaires.

RAFFINEMENT :

Les animaux bénéficieront d'un suivi quotidien à partir du début de leur traitement jusqu'à la fin de l'expérience. Et dans le cas où les animaux présenteraient des signes de souffrance, de mal-être, ou de douleur, ils seront exclus des analyses et soignés ou euthanasiés selon leur état.

REDUCTION :

Pour ces tests, des rongeurs mâles et femelles seront utilisés à partir de 12 semaines, âge équivalent au jeune adulte. Nous utiliserons et testerons les deux composés sur les deux sexes afin de vérifier qu'il n'y a pas de différence entre mâle et femelle. De plus, le traitement sera aussi effectué sur des animaux sauvages dans le but de vérifier qu'il n'y ait pas d'effet toxique.

Le test statistique utilisé sera le test de Student pour des groupes non appariés avec comparaison de moyennes des différents groupes à une constante spécifiée, ici 50% correspondant à une performance au hasard. 16 animaux par groupe sont nécessaires pour avoir une puissance statistique suffisante.

L'étude de se déroulera en 3 parties détaillées ci-dessous:

1) Optimisation du premier traitement à l'EDM10

L'EMD10 (composé pharmacologique déjà testé sur 19 jours) sera analysé sur différents jours de traitements : 5, 8 et 12 jours de traitement puis à 2 différentes doses de traitement plus faible que pour la dernière étude (le nombre de jours de traitement sera fixé en fonction des résultats obtenus et les différentes doses ne sont pour le moment par encore fixées). Il y aura donc un total de 5 conditions différentes testées : 5, 8 et 12 jours de traitement, puis X jours de traitements avec 2 doses différentes.

Pour chacune des différentes conditions nous aurons besoin de 4 groupes d'étude :

- Souris contrôles sauvages non traitées
- Souris contrôles sauvages traitées avec l'EMD10
- Souris contrôles trisomiques non traitées
- Souris trisomiques traitées avec l'EMD10

Ici, nous aurons donc un maximum de 640 souris dont 320 mâles et 320 femelles (16 individus par groupe et par sexe, sachant que l'on a $n = 4 \text{ groupes} \times 16 \text{ individus} \times 2 \text{ sexes} \times 5 \text{ conditions} = 640$ souris).

2) Etude du second composé pharmacologique

Il nous faudra 4 autres groupes (les mêmes que précédemment) pour tester le deuxième composé au temps et à la dose optimale du premier, qui seront fixés en fonction des résultats obtenus pour le traitement à l'EMD10.

Dans cette seconde partie nous aurons donc besoin de 128 souris dont 64 mâles et 64 femelles (maximum de 16 individus par groupe et par sexe, sachant que l'on a $n = 4 \text{ groupes} \times 16 \text{ individus} \times 2 \text{ sexes} = 128$ souris).

Ensuite, nous sélectionnerons le traitement le plus efficace pour le tester sur un autre modèle de souris de la trisomie 21. Ici il nous faudra 128 souris dont 64 mâles et 64 femelles (maximum de 16 individus par groupe et par sexe, sachant que l'on a $n = 4 \text{ groupes} \times 16 \text{ individus} \times 2 \text{ sexes} = 128$ souris).

3) Etude du meilleur composé pharmacologique sur deux autres modèles de la trisomie 21 chez le rat

Le traitement le plus efficace sera testé sur deux modèles de rat de la trisomie 21. Pour chacun des modèles nous aurons besoin de 4 groupes d'études (les mêmes que cité dans le premier point de l'étude).

Ici, il nous faudra 256 rats dont 128 mâles et 128 femelles (maximum de 16 individus par groupe et par sexe, sachant que l'on a $n = 4 \text{ groupes} \times 16 \text{ individus} \times 2 \text{ sexes} \times 2 \text{ modèles} = 256$ rats).

Cette étude nécessite 1152 animaux (896 souris et 256 rats).

18215 Le prurit urémique est défini comme une sensation de démangeaisons au niveau de la peau associée à l'insuffisance rénale chronique (IRC). De nombreux patients sous hémodialyse souffrent de ce prurit caractérisé par une peau sèche, fissurée et douloureuse ce qui réduit fortement leur qualité de vie. Les fissures de l'épiderme exposent à l'air extérieur les terminaisons nerveuses superficielles, ce qui modifie leur sensibilité et leur conductivité. L'urée est un composé éliminé de l'organisme par les reins dans les urines. Chez les patients en IRC, le mauvais fonctionnement de leur rein entraîne une diminution de l'élimination de l'urée et donc son accumulation dans le sang. L'urée peut se décomposer et former une molécule active qui va réagir avec les protéines de l'organisme et altérer leur structure et leur fonction. Il a été démontré précédemment que ces protéines modifiées s'accumulent au cours du temps dans différents tissus dont la peau.

L'hypothèse sur laquelle repose ce travail est que la modification des protéines de l'épiderme induite par les dérivés de l'urée peut participer et favoriser la sécheresse cutanée et les démangeaisons observés chez ces patients. Le but de ce projet est de déterminer si les protéines de l'épiderme peuvent être modifiées par l'urée et ainsi jouer un rôle dans les manifestations cutanées décrites ci-dessus, puis de tester un traitement cutané permettant de limiter ce phénomène.

Pour cela, le protocole envisagé permettra d'évaluer l'effet (compétiteur) potentiel d'un traitement transcutané sous forme d'une crème riche enrichie avec un inhibiteur de cette réaction dans des modèles de rats pour lesquels ce phénomène aura été amplifiée (soit par administration des dérivés de l'urée dans l'eau de boisson, soit en induisant une IRC par ablation quasi-totale des reins). La crème sera appliquée sur la peau du dos préalablement tondu et sur animaux vigiles. À long terme, ce traitement pourrait être utilisé pour améliorer le quotidien des patients en IRC touchés par ces démangeaisons.

Ce projet a été conçu en accord avec les exigences de la règle des 3R, avec notamment :

•Remplacer : Les modèles in vitro d'épiderme ne présentent pas les terminaisons nerveuses ainsi que les différentes couches de l'épiderme qui jouent un rôle important dans le développement des signes cliniques étudiés. Il est donc nécessaire d'utiliser un modèle animal permettant de reproduire au plus proche les symptômes décrits.

•Réduire : Le nombre de rattes à utiliser sur 1 an sera de 50. Il a été calculé de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux tout en permettant une interprétation fiable des résultats basée sur des analyses statistiques adaptées.

•Raffiner : 2 rattes seront hébergées par cage, avec de l'enrichissement, pour limiter le stress. Elles seront isolées dès que la crème sera appliquée sur leur dos. Un suivi au quotidien sera réalisé afin de garantir leur bien-être et pour détecter les éventuels signes de douleur ou de stress surtout chez les rattes ayant subi la néphrectomie subtotale. Des points-limites adaptés et précisément définis seront appliqués afin d'éviter toute souffrance et modification de leur comportement, auquel cas l'animal sera mis à mort. La tonte des poils du dos se fera sur animaux vigiles à l'aide d'une tondeuse. La chirurgie sera réalisée sous anesthésie générale, les animaux reposant sur un matelas chauffant. Les animaux recevront un analgésique en sous cutané en post-opératoire afin de soulager la douleur.

18216 Le mode de vie en groupe d'individus est utilisé par la plupart des Mammifères, incluant notamment les humains et les rongeurs, pour favoriser la survie de l'espèce. La réussite de la vie en groupe repose sur une variété de comportements sociaux complexes (interaction sociale, comportements affiliatifs, socio-sexuels, . . .). Néanmoins, il existe de nombreux troubles du comportement social. Les substrats moléculaires sous-jacents à ces troubles restent méconnus à ce jour.

L'objectif de cette étude est de mettre en évidence chez la souris, seul modèle animal permettant d'utiliser cette technologie, à l'heure actuelle, les substrats moléculaires de l'interaction sociale en comparant des animaux sauvages avec des animaux ayant des déficits d'interaction sociale.

Ces expériences vont significativement contribuer à l'augmentation des connaissances scientifiques de ces troubles, mais également à la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles permettant d'améliorer le bien-être chez les animaux d'élevage et de soulager ces troubles chez l'homme.

Le nombre total d'animaux dans ces expériences sera d'un maximum de 8010 souris. Le projet s'inscrit dans le respect de la règle des 3R :

Remplacement : il n'y a aucune méthode de remplacement pour l'étude des comportements sociaux.

Réduction : Un nombre suffisant de mâles et femelles sont utilisés dans chaque groupe expérimental. Cependant, si aucune différence n'est observée entre mâles et femelles dans les premières expériences, indiquant qu'il n'y a pas d'effet genre, les effectifs seront alors réduits de 50%.

Raffinement : La durée des procédures pour chaque animal est la plus brève possible afin de minimiser son inconfort et son stress. De plus, ces expériences ont pour but de déterminer des nouvelles cibles pour améliorer le comportement social, et donc un des éléments de bien-être des animaux. En effet, le repliement social est la première dégradation mineure du bien-être des animaux sociaux (incluant les animaux d'élevage et la souris). Le but de cette étude est l'identification de nouvelles cibles de l'interaction sociale et en agissant pharmacologiquement sur ces cibles, la sociabilité de ces animaux sera rétablie.

18217 L'autisme est une maladie du développement diagnostiquée en présence de deux types de symptômes : (1) une perturbation du comportement social et (2) des comportements répétitifs.

On ne connaît actuellement pas la cause de la maladie et il n'existe pas de traitement médicamenteux satisfaisant pour soulager les malades et leurs familles. Le projet que nous développons a pour objectif 1) de mieux comprendre l'origine de la maladie et 2) de proposer de nouveaux traitements.

Nous travaillons chez la souris, qui est un animal social : nous utilisons notamment des souris qui présentent des mutations génétiques ressemblant à celles des patients autistes. Nous testons chez ces animaux différents traitements afin de vérifier s'ils pourraient être proposés comme nouveaux médicaments pour soigner l'autisme.

Le projet de recherche que nous développons tient compte du bien-être animal en respectant le principe des 3R à savoir raffiner, réduire et remplacer.

Nous raffinerons nos expériences en prenant un soin particulier pour limiter les situations de souffrance ou d'inconfort des animaux tout au long du protocole expérimental. Par exemple, nous hébergeons nos animaux dans un environnement enrichi (maisonnette en carton, matériel de nidification) afin d'augmenter le bien-être des animaux. De plus, nous avons défini des points limites pour l'ensemble de nos expériences pour limiter les situations de souffrance ou d'inconfort des animaux.

Afin de réduire le nombre d'animaux nécessaire pour réaliser nos expériences, nous nous attachons d'une part à utiliser les animaux des deux sexes (mâle et femelle) et d'autre part à tester chaque animal dans plusieurs paradigmes comportementaux afin de recueillir le plus d'informations possible pour chaque cohorte expérimentale. Enfin, l'utilisation d'outils statistiques puissants nous permet de réduire le nombre d'animaux nécessaire à la réalisation des expériences.

Toutefois, nous ne pouvons pas nous passer du modèle animal car l'autisme est une pathologie complexe qui ne peut être modélisée qu'au niveau de l'animal entier, exprimant toute la variété de son répertoire comportemental.

La mise en œuvre du projet de recherche nécessitera l'utilisation de 424 souris sur 3 ans.

18218 La détection des cellules tumorales précoce reste un défi et est crucial pour l'amélioration de l'efficacité du traitement du cancer. In vivo l'imagerie par bioluminescence (BLI) est une technique optique non invasive très sensible, largement utilisée pour la surveillance des tumeurs chez les petits animaux. Une caméra à haute sensibilité permet de détecter les photons luminescents à l'intérieur d'un petit animal et fournir des images pour localiser les cellules tumorales en temps réel. Les effets du traitement peuvent être détectés en localisant précocement les tumeurs de petites tailles et les micrométastases, de mesurer la charge tumorale et d'évaluer in vivo le moment exact où un traitement devient efficace. L'imagerie par bioluminescence, offre la possibilité d'un suivi en temps réel des processus biologiques, directement au sein d'un organisme vivant (possibilité de visualiser et quantifier les réactions de bioluminescence).

Dans cette étude, nous souhaitons mettre en place cette technique d'imagerie chez la souris pour étudier l'effet des nouveaux traitements anticancéreux dans de prochaines études.

Remplacement: Ce projet vise à valider une étude réalisée sur un modèle informatique. Pour cela, nous n'avons pas d'autre option que d'utiliser le modèle animal qui apporte les réponses les plus proches de l'humain. Nous ne disposons actuellement pas d'autre option.

Le modèle de souris permet d'étudier de manière complète les effets des traitements anticancéreux In vivo et de comparer cet effet par bioluminescence, très proche de tel qu'il est affecté chez l'homme.

Réduction: Pour la mise en place du test, nous utilisons 20 souris dans lesquels nous allons injecter des cellules tumorales. Ces cellules ont la capacité d'être suivies par Bioluminescence. Nous avons pu établir à l'aide d'études de puissance que 20 animaux expérimentaux

étaient nécessaires pour pouvoir obtenir les effectifs suffisants pour conclure. Cela inclut notamment les animaux qui reçoivent une greffe de cellules qui ne mènent pas à une tumeur.

Raffinement: toutes les dispositions seront prises pour limiter la souffrance des animaux et maximiser leur bien-être. Il s'agit principalement de mettre en place des points limites éthiques permettant de retirer les animaux du protocole avant qu'une souffrance ne soit présente. Nous disposons d'une bonne maîtrise des modèles tumoraux prévus que nous avons déjà utilisés durant plusieurs années dans le cadre du projet précédent.

Ainsi, pour les tumeurs pulmonaires, l'état de santé (état du pelage, posture, activité) et le poids des animaux constituent des indicateurs pertinents pour définir l'efficacité de ces traitements ainsi que l'éventuel impact sur le bien-être des animaux.

Pour le modèle sous-cutané, nous mesurerons aussi le volume des tumeurs 3 fois par semaine, ce qui constituera un point limite spécifique. Les animaux seront observés quotidiennement pour s'assurer que leur état de santé n'est pas détérioré, et ils seront pesés 3 fois par semaine. Ce paramètre permet en effet sur le modèle Souris de déterminer que les animaux se portent bien.

18219 Les désordres vestibulaires sont des pathologies liées en premier lieu à des atteintes du vestibule, organe de l'équilibration localisé dans l'oreille interne. Ces pathologies se caractérisent par des sensations de vertige, des déficits posturo-locomoteurs pouvant conduire à des chutes, des battements incontrôlés de l'œil, ainsi que des altérations cognitives (ex altération mémoire spatiale). Ils sont souvent accompagnés de nausées et de vomissements. Des déficits cognitifs plus ou moins prononcés accompagnent les désordres vestibulaires les plus sévères. Ces symptômes peuvent avoir des causes multiples, tels que des AVC, des infections ou des traumatismes de l'oreille, ou encore des atteintes ototoxiques. Ils peuvent aussi résulter tout simplement du vieillissement normal de l'oreille interne. La prévalence des désordres vestibulaires est importante puisqu'ils représentent 3 % de l'ensemble des pathologies chez les plus de 50 ans et près de 1 % des urgences hospitalières. La prise en charge thérapeutique des désordres vestibulaires associe approches pharmacologiques et traitement par physiothérapie. Les solutions pharmacologiques restent peu efficaces par manque de spécificité.

Le présent projet propose de tester chez le rongeur, le potentiel bénéfique d'un composé pharmacologique sur les déficits posturo-locomoteurs et les déficits cognitifs induits par atteinte vestibulaire uni et bilatérale. Des lésions vestibulaires de nature ototoxique seront générées chez le rat adulte mâle par administration transtympanique d'arsanilate (TTA). L'évaluation des déficits posturo-locomoteurs et des déficits cognitifs sera réalisée par adaptation des procédures préalablement détaillées.

Un total de 120 rats mâles adultes sera utilisé pour cette étude. Les données recueillies au cours de cette étude permettront de déterminer la potentielle orientation de la molécule testée vers la voie de développement d'un nouveau composé pharmaceutique pour le traitement des symptômes des désordres vestibulaires.

Afin de répondre à la règle des 3R : 1/ Réduction : Les différentes procédures seront réalisées sur les mêmes animaux, réduisant ainsi le nombre total de rats à utiliser pour cette étude. Le nombre de rats par groupe a été déterminé en se basant sur nos connaissances de la pathologie vestibulaire et cognitive afin d'obtenir des résultats statistiquement exploitables et fiables. 2/ Raffinement : Une période d'acclimatation d'une semaine sera appliquée avant le début des tests. La TTA sera réalisée sous anesthésie à l'isoflurane et la température des animaux sera contrôlée tout le long de la procédure. Les animaux seront injectés avec une solution physiologique avant le réveil visant à suppléer au déficit d'hydratation qui pourrait survenir dans les 24h après la lésion vestibulaire. En période post-opératoire, les animaux seront suivis de près et feront l'objet d'une surveillance quotidienne par le porteur du projet ainsi que les zootechniciens. Ils auront également accès à une nourriture riche en énergie et seront hébergés dans des cages enrichies. 3/ Remplacement : Aucun test *in silico* ne peut à l'heure actuelle se substituer aux tests sur modèles animaux de désordres vestibulaires.

18220 Les biocéramiques à base de calcium (CaP) (telles que l'hydroxyapatite (HA) et le phosphate tricalcique bêta (β -TCP)) sont utilisées depuis plus de 30 ans avec succès en chirurgie cranio-maxillo-faciale ou orthopédique car elles possèdent une composition chimique similaire à la phase minérale de l'os, les rendant biocompatibles et ostéoconductrices. Toutefois, lorsque utilisées pour combler de gros défauts osseux, elles ne sont pas aussi efficaces que les autogreffes osseuses en raison d'une pénétration tissulaire et vasculaire insuffisante. L'augmentation de leur efficacité clinique implique une amélioration de ces propriétés d'invasion qui peuvent être obtenues en modulant l'architecture de la céramique. Les techniques récentes de fabrication additive associées

à celles de conceptions assistées par ordinateur permettent dorénavant de produire des implants avec des formes externes personnalisées (épousant parfaitement le défaut osseux) ainsi qu'une macro-architecture interne optimisée et reproductible. En particulier, une porosité de forme gyroïde est intéressante car favorise un écoulement uniforme des flux au cœur de l'implant.

L'objectif de ce projet est d'évaluer le potentiel de céramiques de macrostructure en forme de gyroïde pour la réparation d'un défaut osseux de la calvaria chez le rat. Cette étude vise en particulier à comparer 3 architectures internes différentes (taille de pores et surface développée) afin de déterminer celle optimale, et d'améliorer notre compréhension du mécanisme d'action de l'effet bénéfique des biocéramiques sur la réparation osseuse. Pour ce faire, nous évaluerons la cinétique d'invasion du tissu osseux et celle de la pénétration vasculaire dans l'implant; nous évaluerons également les voies de signalisation clés induisant l'ostéoformation in vivo, à savoir l'inflammation, l'angiogénèse et l'ostéogénèse. L'ensemble du projet d'une durée de 4 ans nécessitera au maximum 65 rats de type WISTAR. Le modèle rat sera utilisé en raison de sa taille pour évaluer la formation osseuse dans un défaut osseux au niveau de la calvaria. Ce modèle de défaut osseux est moins douloureux pour l'animal que sur un site os long et plus facile à réaliser.

Remplacement : Aucun modèle de néoformation osseuse in vitro n'est disponible aujourd'hui. Le tissu osseux regroupe, en effet, plusieurs familles cellulaires ayant chacune son propre rôle dans le remodelage et l'homéostasie osseuse elle-même régulée par un système hormonal complexe.

Réduction : Afin de réduire le nombre d'animaux, 2 défauts osseux seront réalisés par animal (5.5 mm de diamètre). Le suivi de la formation osseuse sur le même animal se fera à l'aide d'un micro scanner in vivo.

Raffinement : Toutes les procédures expérimentales seront mises en œuvre par des personnes expérimentées et sont utilisées depuis des années au laboratoire. Les défauts réalisés dans la voûte crânienne se feront par une technique de chirurgie récente utilisant des ultrasons (piezochirurgie) qui préserve les tissus mous sous-jacents et limitant les complications hémorragiques. Une analgésie se fera en pré- et post-opératoire suivie d'une observation régulière de l'animal jusqu'à la fin de l'étude (de 3 à 56 jours post-implantation). Un certain nombre de points critiques seront surveillés permettant d'évaluer la présence éventuelle de souffrance ou douleur. Au cas où des douleurs ou souffrances persisteraient en dépit des traitements entrepris, la décision de mise à mort sera prise. Les animaux seront hébergés dans des conditions permettant un enrichissement social (2 par cage) et l'expression de comportement de fouissage et de rongement.

La validation de l'efficacité thérapeutique de ces matériaux nouvelles génération permettra d'envisager de les tester dans des modèles animaux pré-cliniques et à plus long terme à leur utilisation pour le comblement des grandes pertes de substance osseuse chez l'homme.

18221 Les maladies inflammatoires aujourd'hui regroupées sous le terme d'IMID (immune mediated inflammatory disease) ont une incidence en constante augmentation notamment dans les pays industrialisés. Elles peuvent être systémiques comme le lupus, la polyarthrite rhumatoïde et les vascularites ou elles peuvent être localisées à un seul organe comme le diabète, la sclérose en plaque, la maladie de Crohn, la rectocolite hémorragique, ou encore le psoriasis. Parmi ces maladies inflammatoires, certaines sont auto-inflammatoires et d'autres auto-immunes, elles ne mettent pas en jeu les mêmes cellules du système immunitaire mais dans tous les cas, cela conduit à une réponse inflammatoire exacerbée. Cette inflammation entraîne la formation de lésions, une réparation tissulaire inefficace voire la destruction de l'organe dans les formes les plus sévères.

Les traitements actuels essaient de limiter cette inflammation à l'aide de différentes molécules notamment chimiques donc non-spécifiques. Ces dernières années, de gros progrès ont été faits dans la compréhension de la réponse immunitaire et il est évident aujourd'hui que le système immunitaire, qui est le principal acteur dans les maladies inflammatoires, est une cible prometteuse. De tels traitements ont fait l'objet d'essais cliniques dans différentes pathologies de l'inflammation comme les molécules inhibitrices du TNF-alpha (une des principales cytokines sécrétées par le système immunitaire innée et responsable de l'inflammation). Seulement, l'effet de ces molécules

n'est pas spécifique à la pathologie mais à l'ensemble des réponses immunitaires et elles sont associées à de nombreux effets secondaires.

Les nouvelles stratégies d'immunothérapie cherchent à améliorer l'effet anti-inflammatoire des traitements en limitant les effets secondaires et pour cela les approches sont plus spécifiques de populations cellulaires ou des mécanismes immunitaires spécifiques de l'organe pathologique. Parmi les populations du système immunitaire, il existe des populations suppressives de la réponse inflammatoire. Augmenter leur fonction suppressive pourrait conduire à limiter l'inflammation engendrée par les populations effectrices. De nouveaux récepteurs à la surface de ces cellules ont été identifiés comme ayant un rôle dans la modulation de leur fonction inflammatoire.

Nous aimerions tester différentes molécules capables d'activer un de ces récepteurs et analyser les effets engendrés par cette activation dans différents modèles animaux de maladies inflammatoires.

Ce type d'étude nécessite une preuve d'efficacité *in vivo* dans des modèles précliniques, c'est pourquoi nous voulons tester ces thérapies chez la souris. Le nombre d'animaux utilisés sera de 2200 souris (réparties dans 6 modèles différents, selon 4 axes par modèles, et 5 groupes par axe) pour combiner un nombre réduit d'animaux avec une pertinence statistique qui permet les tests statistiques non paramétriques à moins de 30 individus par groupe comme le test Mann-Whitney pour une comparaison de deux groupes entre eux ou le test de Wilcoxon pour une analyse sur plus de deux groupes comparatifs. Le suivi des animaux sera quotidien et la gestion de la douleur maîtrisée le plus adéquatement possible afin d'apporter les soins nécessaires le plus rapidement aux animaux. En effet, si l'inconfort ou la procédure expérimentale le nécessitent, les animaux pourront recevoir une analgésie appropriée (légère en cas de morsure par exemple ou plus importante quand les symptômes de colite sont importants et douloureux). Pour limiter le stress et l'inconfort, les animaux sont maintenus dans des cages ventilées dans un cycle jour/nuit de 12h/12h avec un accès à l'eau et à la nourriture à volonté ainsi qu'un nombre maximum de 5 animaux/cage et des brindilles de papier pour s'enfouir et se cacher ainsi qu'anesthésiés pour toute procédure impliquant un geste technique plus important et stressant qu'une injection intrapéritonéale. Ce nombre d'animaux pourra cependant être réduit selon que les groupes contrôles sont homogènes et ne nécessiteraient donc pas une reproduction de l'expérimentation 3 fois mais 2 fois seulement. Ce nombre est donc une estimation haute du nombre d'animaux pouvant être utilisé.

18222 La saisine a pour objectif l'évaluation du potentiel thérapeutique des anticorps monoclonaux dans un modèle xénogénique de greffe contre l'hôte (GvHD) sur des souris NSG (NOD scid gamma mouse). Ce modèle sera induit par l'injection des cellules mononuclées de sang périphérique xénoréactives (PBMCs). Ces anticorps monoclonaux ciblent un récepteur membranaire exprimé sur les leucocytes humains. Il a été démontré que ce récepteur est un marqueur des lymphocytes T activés et aussi associé aux pathologies inflammatoires. Actuellement des anticorps ciblant ce récepteur sont utilisés en clinique pour la thérapie active sur le système immunitaire humain notamment en thérapie anti-cancéreuse. Des nouveaux anticorps monoclonaux ont été générés et validés *in vitro* qui ont permis de sélectionner 2 candidats potentiels mais des tests *in vivo* sont nécessaires. Pour pouvoir envisager des essais cliniques nous devons tester ces anticorps dans des modèles *in vivo* de souris humanisée dans les contextes d'une GVHD.

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

- Remplacer : des études fonctionnelles ont été réalisées *in vitro* à partir de cellules humaines, les résultats sont prometteurs mais sont limités par l'absence du contexte physiologique et de la complexité du système immunitaire et ne peuvent remplacer les études *in vivo*. Il est donc nécessaire de tester l'efficacité immuno-régulatrice de la molécule dans un modèle *in vivo* proche de l'Homme. Une alternative solide à l'utilisation de primates en recherche préclinique est le modèle de souris dites «humanisées ».

- Réduire : Le nombre d'animaux par groupe est réduit à 20, nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Les souris seront divisées en 5 groupes (20 souris/groupe). Le groupe témoin recevra un isotype contrôle, les animaux des autres groupes

seront traités avec des anticorps humains et ou des médicaments commerciales. Le nombre de groupes a été réfléchi de sorte à avoir les contrôles suffisants pour pouvoir conclure quant aux résultats obtenus. Le nombre total des animaux est de 100.

- Raffiner : Les animaux atteignant une perte de poids de 20% par rapport à leur poids initial seront euthanasiés, ainsi que les animaux montrant des signes physiques caractéristiques d'un mal être tel qu'un changement de comportement. Pour réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse en cas d'injections cellulaires et prélèvements sanguins les animaux recevront par inhalation de l'isoflurane (1-5%/l d'air). Concernant les conditions de l'élevage, les souris vont être réparties en 5 souris maximum par cage ventilée avec des moyen d'enrichissement (frisottis et tunnel ou dôme).

Durant le protocole, les animaux seront suivis pour leur poids et le score clinique pour diagnostiquer le développement de la maladie (GVHD). Des prélèvements sanguins seront effectués une fois par semaine pour valider la persistance des cellules humaines injectées chez la souris NSG. Tous les animaux traités avec les molécules et ceux du groupe contrôle seront analysés afin d'en obtenir un maximum d'information post mortem, au niveau anatomopathologique pour les lésions dans les organes dues à la réaction de GVHD, et par immuno-histologie pour étudier les conséquences de la migration des cellules injectées.

Les résultats obtenus permettront de déterminer le potentiel thérapeutique des anticorps testés sur les réponses immunes intervenant dans des contextes de GVHD et de mieux comprendre ses mécanismes d'action par les analyses anatomopathologiques des organes des souris traitées versus souris contrôles.

La validation de ces molécules dans ce modèle préclinique de souris humanisée est une étape indispensable pour évaluer l'efficacité de ces anticorps avant de passer aux tests cliniques.

18223 Il a été prouvé scientifiquement qu'une greffe allogénique (de même espèce) ou xénogénique (deux espèces différentes) peut impliquer deux réactions purement immunologiques : la première est la maladie de greffon contre l'hôte (Graft Versus Host Disease GvHD) (un effet majeur mais indésirable) et la deuxième réaction mineure mais très positive GvL (Graft versus Leukemia) ou greffon contre la leucémie, qui est la réaction immunologique des lymphocytes T immunocompétentes contenant dans le greffon contre les cellules tumorales de receveur).

Dans le but d'évaluer le potentiel thérapeutique d'anticorps monoclonaux sur l'effet greffon contre la leucémie et d'en sélectionner le meilleur, nous testons in vivo ces candidats médicamenteux en model GvL (Graft versus Leukemia) des souris immunodéficientes NSG (souris NOD Scid Gamma)

Ces anticorps monoclonaux ont été générés et validés in vitro, ils ciblent un récepteur membranaire exprimé sur les leucocytes humains. Les différents tests in vitro ont permis de sélectionner 2 candidats, mais des tests in vivo sont nécessaires.

Pour pouvoir envisager des essais cliniques nous devons tester ces anticorps dans des modèles in vivo dans le contexte d'une greffe contre la leucémie (GvL) qui fait l'objet de cette étude.

Nous avons modélisé cette réaction GvL en modèle GvT (Graft versus Tumor) sur des souris immunodéficientes NSG. Nous effectuerons deux modèles différents, le premier est un modèle de tumeur solide en sous-cutanée et le deuxième est un modèle de tumeur soluble dans le sang.

-Pour le modèle de tumeur solide, nous injecterons en sous cutanée (s/c) des souris immunodéficientes NSG avec une lignée tumorale déjà définie. Lorsque les tumeurs seront palpables (quelques jours après implantation) nous injecterons des cellules humaines (Les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC)) de sujets sains avec les anticorps monoclonaux d'intérêt à tester.

-Pour le modèle de tumeur liquide, nous injecterons en intraveineuse (i. v) des souris immunodéficientes NSG avec une lignée tumorale (la protéine fluorescente verte + /Luciférase + (GFP+/Luc+), nous suivons les cellules tumorales par imagerie et par prélèvement sanguin. Lorsque les cellules tumorales sont détectables par imagerie, nous injecterons les cellules humaines (Les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) et on traite avec les anticorps monoclonaux d'intérêt.

Pour réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse, les différents actes (injection des cellules, prélèvement sanguin. . . etc) seront effectués sous anesthésie par inhalation d'isoflurane (1-5%/l d'air), ou analgésique (la buprénorphine).

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

- Remplacer : des études fonctionnelles ont été réalisées in vitro à partir de cellules humaines, les résultats sont prometteurs mais sont limités par l'absence du contexte physiologique et de la complexité du système immunitaire et ne peuvent remplacer les études in vivo. Il est donc nécessaire de tester l'efficacité immuno-régulatrice de la molécule dans un modèle in vivo proche de l'Homme. Une alternative solide à l'utilisation de primates en recherche préclinique est le modèle de souris dites « humanisées ».

- Réduire : Le nombre d'animaux par groupe est réduit à 25, nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Les souris seront divisées en 4 groupes (25 souris/groupe). Le groupe témoin recevra un isotype contrôle, les autres groupes seront traités avec les anticorps d'intérêt. Le nombre de groupes a été réfléchi afin d'avoir les contrôles suffisants pour pouvoir conclure quant aux résultats obtenus. Le nombre total des animaux est de 200.

- Raffiner : Afin de respecter le bien-être animal, les souris vont être 3-5 souris par cage, avec des moyens

d'enrichissement (petit bout de papiers et tunnel). Les animaux atteignant une perte de poids de 20% par rapport à leur poids initial seront euthanasiés, ainsi que les animaux montrant des signes physiques caractéristiques d'un mal être tel qu'un changement de comportement. L'euthanasie des animaux sera effectuée par inhalation d'isoflurane en surdose suivie par une dislocation cervicale.

Un prélèvement sanguin sera réalisé tous les 15 jours sur animaux anesthésiés avec un mélange gazeux (isoflurane/oxygène) et surveillés jusqu'à leur réveil complet.

Durant le protocole, les animaux seront suivis pour leur poids et le score clinique pour diagnostiquer le développement de la maladie de greffon contre l'hôte (Graft versus Host Disease), suite à la réaction des lymphocytes T contenant dans le greffon contre les cellules de receveur) ainsi que le rejet de la tumeur. Des prélèvements sanguins seront effectués tous les 15 jours pour valider la persistance des cellules humaines injectées chez la souris immunodéficiente NSG et suivre la croissance des cellules tumorales GFP+. Tous les animaux traités avec les molécules et ceux du groupe contrôle seront analysés afin d'en obtenir un maximum d'information post mortem, au niveau anatomopathologique pour les lésions dans les organes dues à la réaction de greffe contre la tumeur, et par immuno-histologie pour étudier les conséquences de la migration des cellules injectées et leurs mécanismes d'action.

Les résultats obtenus permettront de déterminer le potentiel thérapeutique des anticorps testés sur les réponses immunes intervenant dans des contextes de greffe contre la tumeur et de mieux comprendre ses mécanismes d'action par les analyses anatomopathologiques des organes des souris traitées versus souris contrôles. La validation de ces molécules dans ce modèle préclinique de souris humanisées est une étape indispensable pour évaluer l'efficacité de ces anticorps avant de passer aux tests cliniques.

18224 La stéatose hépatique non-alcoolique (NAFLD) représente un enjeu de santé primordiale car elle est en passe de devenir la première maladie chronique hépatique mondiale. La NAFLD est caractérisée par la présence d'une accumulation de graisse dans au moins 5% des hépatocytes, appelée stéatose, sans consommation excessive d'alcool ou présence de maladies virales. On considère que la présence d'une stéatose seule est asymptomatique. En revanche, cette accumulation de graisse dans les hépatocytes prédispose à l'apparition d'une forme inflammatoire appelée stéatohépatite non-alcoolique (NASH), prédisposant à l'apparition d'une fibrose hépatique pouvant évoluer en cirrhose et en cancer hépatique. Par leur proximité anatomique, le microbiote intestinal et le foie vont avoir de nombreuses interactions regroupées sous le terme «Axe intestin-foie». Cet équilibre entre la flore microbienne et le foie est donc très important. En ce sens, les pathologies chroniques hépatiques sont associées à une modification de la communauté bactérienne. Chez les patients NAFLD/NASH, il a été observé que cette modification de la

communauté bactérienne est corrélée à une augmentation de la perméabilité intestinale et endothéliale ainsi qu'à la sévérité des atteintes hépatiques.

Dans ce contexte, nous nous intéressons aux vésicules extracellulaires produites par le microbiote intestinal des patients NAFLD/NASH et retrouvées dans les fèces des patients (fEVs). Des travaux préalablement réalisés in vitro au sein de notre laboratoire ont démontré que les fEVs des patients NASH (i) augmentent la perméabilité intestinale par un mécanisme dépendant de la kinase de la chaîne légère de la myosine (nmMLCK), et la perméabilité endothéliale et (ii) contribuent à l'inflammation endothéliale et à la fibrogenèse en activant les cellules stellaires. Ces effets ne sont, en outre, pas observés avec les fEVs des patients NAFLD ou dans des conditions contrôles sans vésicules.

La question que nous nous sommes posés ici est de vérifier si les fEVs des patients NASH peuvent accélérer l'apparition de la NASH in vivo chez les souris nourries avec un régime riche en graisses induisant spontanément une stéatose hépatique simple. L'objectif de ce projet est d'évaluer, de manière distincte et en comparaison à des conditions contrôle, l'implication des fEVs des patients NASH dans le développement in vivo des dommages hépatiques et l'apparition de la NASH chez la souris. Et, également, d'observer le potentiel effet protecteur de l'inhibition de nmMLCK sur les dommages hépatiques induits par les fEVs des patients NASH.

Pour ce projet, nous estimons qu'un total de 160 souris wild type (WT) C57BL/6 et 80 souris knock-out (KO) pour nmMLCK (fond génétique C57BL/6) seront utilisées.

Les principes de remplacement, de réduction et de raffinement seront respectés :

- Le gavage intragastrique avec les fEVs des patients NASH des souris, ainsi que l'injection intrapéritonéale de l'inhibiteur de nmMLCK, relève de la stricte nécessité et ne peut être remplacé par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information.
- Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est réduit à son minimum sans compromettre les objectifs du projet.
- Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux. Le bien-être des animaux sera donc évalué de façon complémentaire et hebdomadaire en observant leur comportement et les indices pouvant suggérer une douleur au moyen du score de grimace.

Ce travail permettra de confirmer l'implication des fEVs dans l'évolution et le développement des dommages et de l'inflammation hépatique conduisant à l'apparition de la NASH. De plus, il permettra de confirmer l'implication de nmMLCK dans ces atteintes hépatiques. Ces résultats permettront de démontrer que les fEVs sont des acteurs clés dans la progression de la NAFLD vers le NASH.

18225 Les Glioblastomes (GBM) sont des tumeurs cérébrales de très mauvais pronostic. Le traitement de référence repose actuellement sur l'exérèse la plus complète associée à un traitement par radiochimiothérapie.

Cependant, malgré ce traitement, la médiane de survie est d'environ 15 mois. Il est donc indispensable de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques et de rechercher des paramètres indiquant une résistance au traitement afin d'éviter ou au minimum de retarder la réévolution tumorale qui est souvent fatale. Les modèles murins permettent, par injections orthotopiques de primocultures, de tester de nouvelles thérapeutiques mais ce modèle possède des biais intrinsèques non modifiables.

C'est pourquoi il est capital de trouver un modèle pré-thérapeutique plus proche des conditions humaines. Depuis plusieurs années, des cultures cellulaires en 3 dimensions se développent et permettent de recréer étapes par étapes des conditions expérimentales proches de ces conditions humaines. Notre équipe a mis au point un modèle de culture en 3 dimensions permettant de cultiver des cultures primaires de GBM associées à une partie du microenvironnement tumoral. L'objectif

du projet est double : mettre en évidence des cellules sanguines circulantes permettant de rechercher des indices de résistance en cours de traitement et comparer les modèles de cultures in vitro 3D et les modèles murins, dans le but de démontrer la supériorité du modèle 3D in vitro ou du moins sa non infériorité, afin de pouvoir s'affranchir à terme des modèles murins (règles des « 3R »). Nous pensons que nos modèles de cultures cellulaires en 3D sont de meilleurs modèles précliniques que les modèles murins. Afin de le démontrer il nous faut comparer ces deux modèles pour à terme de plus utiliser les modèles murins (objectif : remplacement total des modèle murins de glioblastomes). Cette comparaison se fera en comparant l'évolution naturelle in vivo et in vitro des cellules lignées cellulaires de glioblastomes ainsi que de primocultures de glioblastomes. Puis de comparer l'évolution des primocultures in vivo et in vitro avec et sans traitement. Dans ce but 390 souris immunodéficientes NOD-SCID-IL-2Rg adultes seront étudiées.

La première étape du projet consistera à injecter en intracrânien des lignées cellulaires de glioblastomes immunomarquées (U251) et de rechercher des cellules tumorales circulantes de GBM dans le sang au fur et à mesure du développement des tumeurs. Avant la réalisation des injections de lignées cellulaires tumorales, des procédures test sont prévues sur des souris issues d'un programme de recyclage des animaux. La réalisation de ces procédures a pour but de valider le déroulement de la procédure d'injection intracrânienne et de prélèvement sanguin, ainsi que la validité est la reproductibilité des résultats. Les souris seront euthanasiées après réalisation des procédures test sans réveil préalable. Les tumeurs seront analysées et comparées au modèle de culture in vitro de ces mêmes cellules.

La deuxième étape consistera en l'injection en intracrânien de cultures primaires de GBM et en parallèle à la culture in vitro dans nos modèles 3D de ces mêmes primocultures. Il sera réalisé lors de l'euthanasie des souris, une analyse des cellules tumorales circulantes dans le modèle murin selon le protocole validé lors de la première étape. Au bout de 5 semaines, le développement dans les deux modèles sera comparé, afin de démontrer l'égalité des modèles ou la supériorité d'un des modèles.

Troisième étape : répétition du protocole de l'étape 2 et en y associant le traitement standard actuel par radiochimiothérapie dans les deux modèles. Il sera ensuite réalisé lors de l'euthanasie des souris, une analyse des cellules tumorales circulantes sur les modèles murins selon le protocole validé de la première étape et la recherche de variations en fonction du traitement. Au bout de 5 semaines, le développement des tumeurs sera comparé au développement dans les modèles de culture 3D afin de démontrer l'égalité des modèles ou la supériorité d'un des modèles.

Dans le souci du raffinement de nos expérimentations, nous procéderons aux 3 étapes de façon successive. Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés et d'améliorer les procédures expérimentales et de gérer au mieux les douleurs induites par les différentes manipulations, les différentes étapes seront réalisées successivement, afin de définir à chaque fois les meilleures conditions expérimentales. En effet, l'étape 1 est la plus simple et sera effectuée en premier afin d'optimiser sa réalisation pour les étapes suivantes. Il en est de même pour l'étape 2 qui sera effectuée avant l'étape 3 afin d'optimiser sa réalisation pour l'étape 3. Comme expliqué, les étapes se suivent dans le temps afin d'améliorer à chaque fois les expérimentations.

Par ailleurs, lors des différentes expérimentations, certaines procédures nécessiteront une anesthésie générale associée à de l'analgésie. L'analgésie sera adaptée en fonction du type de manipulation (analgésie orale et souscutanée standardisée lors des injections puis adaptée en fonction des signes de souffrance (selon les signes cliniques de surveillance après manipulations et de surveillance quotidienne) et anesthésie générale).

Les souris seront hébergées dans des cages disposées sur portants ventilés avec enrichissement, au nombre de 5 par cage.

REPLACEMENT : L'objectif à terme est de prouver que notre modèle in vitro est égal ou supérieur au modèle souris afin d'arrêter d'utiliser les modèles souris.

RÉDUCTION : Nous avons déterminé le nombre minimal de souris suffisant pour conclure pour chaque étape. De plus, afin d'optimiser les expérimentations sur les souris et donc de limiter le

nombre nécessaire, nous procédons successivement aux différentes étapes. Chaque étape est un complément de la précédente.

Nous utiliserons des lots de 10 souris et nous analyserons les résultats par tests statistiques de comparaison : test de Wilcoxon ou Mann-Whitney. D'un point de vue statistique, l'utilisation de plus d'animaux par lot semble préférable, nous sommes éthiquement amenés à tenter de réduire le nombre d'animaux utilisés.

18226 L'accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique est une pathologie neurologique survenant après l'occlusion d'une artère irriguant le cerveau. Cette pathologie est la 3ème cause de mortalité et la première cause de handicap acquis chez l'adulte dans le monde. L'AVC pose donc un problème majeur tant dans le domaine de la santé publique que sur le plan humain. Actuellement, la prise en charge des patients à la phase aiguë de l'infarctus cérébral est réalisée par l'injection intraveineuse de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) associée ou non à la thrombectomie. Toutefois, seule une faible proportion des patients (<10%) peut être traitée du fait des effets secondaires de l'injection de tPA et de la relative difficulté d'accès à la thrombectomie. Ainsi, il paraît indispensable de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques innovantes visant à traiter efficacement cette pathologie.

L'objectif de cette étude est de mettre en évidence l'impact de l'inhibition de l'interaction du tPA avec le récepteur NMDA sur les lésions cérébrales, la réponse inflammatoire et la récupération fonctionnelle suite à un AVC ischémique, grâce à l'utilisation de Glunomab, un anticorps développé au laboratoire bloquant l'interaction du tPA avec la sous unité GluN1 du récepteur NMDA.

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

Nous avons sélectionné le modèle présentant le meilleur compromis entre pertinence scientifique et sensibilité de l'espèce. La souris est avec le rat l'espèce animale la plus étudiée dans le domaine de l'inflammation et l'ischémie cérébrale. La physiopathologie est donc globalement établie, ce qui nous permettra d'interpréter nos résultats de manière fiable. L'ensemble des acquis et des connaissances dont nous disposons rend cette espèce particulièrement intéressante dans le cadre de notre étude.

Nous utiliserons le nombre minimal d'animaux afin de souscrire au principe de réduction. Le nombre d'animaux utilisé est déterminé en fonction de la spécificité/sensibilité des méthodes utilisées, et selon nos travaux précédents publiés et la littérature. 132 souris seront nécessaires pour réaliser cette étude, et l'utilisation d'outils d'imagerie non invasive permettant de mesurer les lésions cérébrale et l'inflammation cérébrale permet de réduire significativement le nombre d'animaux utilisés.

Afin de souscrire au principe de raffinement, les animaux seront anesthésiés durant chaque procédure. Les expériences seront réalisées par du personnel qualifié en respectant les règles de bonnes pratiques de laboratoire pour le respect des animaux, tout en veillant à ne pas dépasser les points limites fixés au préalable. Le bien-être des animaux sera suivi bi-quotidiennement par du personnel qualifié 5j/7 et quotidiennement pendant les week-ends et jours fériés et cela pendant toute la durée du projet. Les animaux seront hébergés dans des cages standards répondant aux normes européennes actuelles (Directive 2010/63/UE). Pour éviter de stresser les animaux, les cages seront isolées de tout bruit extérieur et l'accès à l'eau et à la nourriture sera ad libitum. Enfin, une importance particulière sera apportée au bien-être des animaux. Tout sera mis en œuvre pour réduire l'angoisse, la souffrance et la douleur de chaque animal, pouvant être occasionnées pendant le projet. Les principes éthiques et les standards de raffinement seront utilisés jusqu'à la mise à mort de l'animal.

18227 Les troubles du mouvement sont des maladies neuromusculaires, souvent chroniques, qui handicapent durablement les patients et ont donc un impact sociétal important. La dystonie, par exemple, est un trouble qui se caractérise par des contractions musculaires involontaires, pouvant

notamment entraîner des mouvements répétitifs ou des postures figées. La spasticité musculaire, quant à elle, est considérée comme une sur-contraction inhabituelle et involontaire du ou des muscles. Ce trouble du système nerveux central résulte en une crispation et une rigidité accrue du muscle touché. Le traitement de ces maladies neuromusculaires implique généralement la prescription de traitements administrés oralement : le baclofène, les benzodiazépines, le dantrolène... Ces traitements systémiques comportent cependant tous des effets secondaires conséquents (sommolence, nausée, fatigue). Une solution pour diminuer ces effets secondaires consiste à administrer le baclofène via une pompe intrathécale ; cette approche est toutefois invasive. Alternativement, l'injection intramusculaire de certains produits directement dans le muscle affecté peut soulager ces maladies : le phénol ou la toxine botulique. Cette approche présente de clairs avantages devant celles présentées précédemment, notamment concernant les effets secondaires. Toutefois, cette approche doit encore être optimisée : les patients et soignants attendent des myorelaxants offrant encore moins d'effets secondaires, capables d'être efficaces rapidement après l'injection, et dont les effets seraient durables. L'objectif de notre projet global est de mettre en évidence les effets bénéfiques de l'utilisation locale de différents produits myorelaxants novateurs à effet rapide et durable, sur la contraction musculaire pour les patients souffrant de troubles du mouvement comme la dystonie et la spasticité. Au cours d'une étude princeps, nos travaux préliminaires nous ont permis d'identifier au moins 5 produits présentant une activité myorelaxante d'intérêt. Chacun des produits semble avoir des caractéristiques pharmacologiques différentes : certains induisent une myorelaxation très rapide, et d'autres offrent un effet durable par exemple. Or, selon la maladie neuromusculaire, le besoin clinique est différent, et donc chaque caractéristique est plus ou moins critique. Nous visons ainsi le développement de plusieurs produits, car nous envisageons la possibilité de positionner chacun des produits finaux pour le traitement de différentes maladies neuromusculaires.

A terme, nous démontrerons les bénéfices de nos produits face aux produits de référence utilisés en clinique. Ce projet expérimental concerne l'étude pharmacocinétique du produit lead FTP-501, dont les effets pharmacodynamiques ont précédemment été caractérisés.

Ces données pharmacocinétiques sont primordiales à l'avancée de notre lead vers des phases plus aval. Toutefois, il n'existe à ce jour pas de modèle *in vitro* établi qui puisse récapituler la distribution et la métabolisation d'un produit dans un organisme. Ainsi, ces éléments justifient la présente demande, visant à explorer la pharmacocinétique de notre lead chez le rongeur.

Au cours de cette étude, le lead FTP-501 sera administré aux rats via différentes voies (orale, intraveineuse, et intramusculaire), puis un volume sanguin limité sera prélevé aux animaux à différents temps ; le produit sera finalement dosé dans le sérum par une technique analytique de spectrométrie de masse. La procédure de prélèvement de sang se fera via une ponction par la veine caudale : cette approche est reconnue comme étant peu douloureuse, et moins stressante que d'autres. L'objectif final sera de comparer les concentrations plasmatiques selon la voie d'administration.

Concernant l'application des 3R, le remplacement ne peut pas être assuré dans cette étape du programme de travail, car la pertinence des modèles cellulaires (tels que le recours aux « organ-on-a-chip ») reste encore débattue. L'étude pharmacocinétique ne pourra donc se faire que sur l'animal.

Pour la réduction, l'existence d'études pharmacocinétiques précédentes (toutefois limitées à une voie d'administration) nous permettent de limiter les expériences de mise au point (volume sanguin requis, fréquence des prélèvements) ; nous nous tiendrons donc au minimum d'animaux nous permettant d'arriver à une conclusion. Concernant le raffinement, les animaux seront hébergés en groupe de 2 avec enrichissement du milieu, et surveillés quotidiennement. Les prélèvements sanguins seront réalisés par un expérimentateur entraîné, et via une approche limitant le stress et la douleur. Au cours de cette étude, nous souhaitons continuer à limiter au maximum le stress des animaux.

En conclusion, cette étude nous permettra donc de connaître les doses plasmatiques et donc l'exposition systémique de notre produit selon la voie d'administration. Nous utiliserons au maximum

210 rats (souche : Sprague-Dawley femelles). Ces données serviront de base à la conception d'essai clinique chez l'homme.

18228 Le pancréas de l'adulte est un organe hétérogène avec une composante exocrine et une composante endocrine. Le tissu endocrine est constitué par les îlots de Langerhans qui contiennent en majorité des cellules b, productrices d'insuline, mais aussi des cellules a, qui synthétisent du glucagon. Ces deux types de cellules permettent de réguler les niveaux de glucose, que l'on appelle aussi la glycémie. Les anomalies fonctionnelles des cellules b ont des conséquences pathologiques graves, représentées par différentes formes de diabète. De plus, le cancer pancréatique est situé au quatrième rang des causes de décès par cancer et son incidence est en forte progression.

De façon intéressante, on a découvert récemment une nouvelle mutation qui conduit chez l'homme soit au diabète, soit à des tumeurs du pancréas endocrine. Pour le moment, le mode d'action de ces mutations n'est pas connu.

L'objectif de mon projet est donc de mieux comprendre comment cette mutation décrite chez l'homme provoque soit un diabète, soit un insulinome (tumeur endocrine). Pour répondre à cette question, plusieurs mutations représentatives de celle trouvée chez les patients seront introduites chez la souris.

Remplacement : Les effets de cette mutation ont déjà été décrits au laboratoire. Pour limiter les investigations in vivo, un maximum d'informations proviendront d'analyses histologiques sur des tissus fixés et des analyses in silico pour les comparaisons transcriptomiques. Les paramètres physiologiques, c'est à dire les mesures de glycémie et d'insulinémie ne peuvent être effectuées que in vivo :

Réduction : L'ensemble de ce projet d'une durée de 5 ans requiert un nombre total d'animaux estimé à 988. Ce nombre est surestimé afin de pallier d'éventuelles pertes, sans altérer la validité statistique des résultats obtenus. Il comprend la génération de 4 modèles différents de souris.

Le développement de diabète et de tumeurs pancréatiques seront analysés. Notamment, des tests exploratoires seront effectués. Ainsi, nous évaluerons leur capacité à contrôler la glycémie après l'administration de glucose ou d'insuline. Ceci constitue une analyse fonctionnelle du pancréas.

En effet, dans ces conditions, une élévation anormale de la glycémie traduirait la présence d'un diabète. En revanche, la baisse anormale de glycémie serait synonyme d'une tumeur endocrine du pancréas. Une analyse de l'expression des gènes dans le pancréas des souris sera effectuée grâce à des techniques de biologie moléculaire. Ceci a pour but d'identifier les mécanismes génétiques impliqués dans le développement d'un diabète ou d'un cancer.

Enfin, l'un des modèles de souris générées sera exposé à un régime riche en graisse. Ce procédé représente une façon d'explorer la susceptibilité des souris à déclencher un diabète ou un insulinome en fonction des facteurs environnementaux.

Raffinement : En accord avec les recommandations internationales dans le domaine du diabète et de la cancérologie, les animaux seront suivis régulièrement afin d'assurer leur bien-être et les expérimentations seront arrêtées avant la souffrance des animaux. Une grille de score sera également mise en place. Dans le cadre des procédures, tous les soins pré- et post-opératoires seront réalisés pour garantir le meilleur confort à l'animal. Les stratégies d'accouplement ont été optimisées afin de réduire le nombre d'animaux.

18229 L'encéphalopathie hypoxique-ischémique (EHI) néonatale est une lésion cérébrale grave résultant d'une diminution importante du débit sanguin et de l'oxygène dans le cerveau à la naissance. Les nouveau-nés atteints peuvent présenter une altération de la conscience, une diminution ou une disparition des réflexes et du tonus musculaire, des crises d'épilepsie ainsi que des signes de défaillance d'organe. L'EHI est responsable de près d'un million de décès par an, soit 24 % de l'ensemble des décès survenant chez les nouveau-nés dans le monde. Chez les survivants, cet événement dans le cerveau immature et en développement peut se traduire par des déficits neurologiques à long terme tels que la paralysie cérébrale, des déficits d'apprentissage et intellectuels graves, des déficits cognitifs et du comportement.

L'hypothermie thérapeutique est actuellement la seule option de soin post EHI. Cette technique n'est que partiellement protectrice et nécessite le développement de thérapies complémentaires. En effet, les lésions cérébrales causées par l'EHI évoluent sur plusieurs heures, plusieurs jours, voire plusieurs mois, selon une séquence temporelle bien spécifique. La fenêtre thérapeutique pour une hypothermie contrôlée se situe, quant à elle, durant les 6 premières heures, ce qui limite son utilisation.

L'inflammation et le dysfonctionnement neurovasculaire (barrière hémato-encéphalique ou BHE) lors de l'EHI sont des facteurs importants qui accentuent les lésions cérébrales. Ces mécanismes se mettent en place rapidement après l'accident et perdurent pendant plusieurs jours voire semaines. Par conséquent, ils représentent de nouvelles cibles thérapeutiques importantes pour prévenir l'aggravation des lésions cérébrales après EHI.

Des résultats préliminaires obtenus au laboratoire chez la souris adulte montrent que des molécules que nous avons brevetées i) sont distribuées au cerveau, ii) restaurent les troubles cognitifs associés au vieillissement, iii) préviennent les troubles de la neurogenèse, iv) améliorent la fonction synaptique et v) réduisent la neuro-inflammation. In vitro nous avons montré que ces molécules ont également un effet bénéfique au niveau de la vasculature cérébrale en prévenant la perte de fonctionnalité et l'inflammation. L'ensemble de ces résultats prometteurs nous a conduits à émettre l'hypothèse que ces molécules atténueraient les lésions cérébrales induites à la fois par le dysfonctionnement de la BHE et l'inflammation après un accident hypoxique-ischémique dans la période néonatale.

Nous souhaitons donc maintenant établir la preuve de concept dans un modèle d'EHI néonatal in vivo en utilisant le modèle largement décrit dans la littérature et considéré comme le modèle de référence pour l'EHI chez le raton de 7 jours. 1170 animaux seront utilisés afin d'établir une relation dose/effet. Pour ce faire, 3 doses seront testées ainsi que 2 durées d'hypoxie permettant d'induire des lésions modérées ou sévères. Dans ce modèle, l'intensité des lésions cérébrales qui sont induites est différente chez les mâles et les femelles, ce qui correspond à la réalité clinique chez l'homme. Nous devons donc étudier les deux sexes séparément. Dans chaque groupe, les animaux seront répartis dans des sous-groupes afin d'étudier différents paramètres permettant de caractériser les effets thérapeutiques. Certains animaux seront utilisés pour quantifier le candidat médicament dans le cerveau, d'autres pour mesurer l'effet thérapeutique : étendue de la lésion cérébrale, expression de marqueurs neuronaux, de marqueurs de l'inflammation... Enfin, des tests cognitifs et des IRMs seront réalisés sur certains animaux pour évaluer les effets bénéfiques à long terme.

Cette expérimentation répond aux exigences en termes de réduction, de remplacement et de raffinement. Nous avons calculé qu'un nombre maximum de 1170 rats permettra une analyse statistiquement valable des résultats que nous obtiendrons. Une partie des expériences de ce projet ont été menées in vitro sur des modèles de BHE en cultures afin de remplacer au maximum l'utilisation des animaux mais toutes ont leurs limites. Il est donc impossible aujourd'hui de se substituer totalement à une expérimentation in vivo. Par ailleurs, notre projet a des ambitions d'application en clinique humaine et il est important d'avoir un développement mimant les essais réalisés en clinique. Enfin, le raffinement des animaux sera assuré, durant l'élevage, notamment par le suivi quotidien des animaux par un personnel qualifié et compétent et la constitution de groupes sociaux d'animaux. Les animaux seront hébergés en groupes dans une cage enrichie avec des accessoires de jeu et du matériel pour la fabrication de nids. Des critères d'arrêt sont également prévus sous le contrôle du vétérinaire de l'établissement, afin d'éviter toute souffrance des animaux.

18230 L'encéphalopathie hypoxique-ischémique (EHI) néonatale est une lésion cérébrale grave résultant d'une diminution importante du débit sanguin et de l'oxygène dans le cerveau à la naissance. Les nouveau-nés atteints peuvent présenter une altération de la conscience, une diminution ou une disparition des réflexes et du tonus musculaire, des crises d'épilepsie ainsi que des signes de défaillance d'organe. L'EHI est responsable de près d'un million de décès par an, soit 24 % de l'ensemble des décès survenant chez les nouveau-nés dans le monde. Chez les survivants, cet événement dans le cerveau immature et en développement peut se traduire par des déficits

neurologiques à long terme tels que la paralysie cérébrale, des déficits d'apprentissage et intellectuels graves, des déficits cognitifs et du comportement.

L'hypothermie thérapeutique est actuellement la seule option de soin post EHI. Cette technique n'est que partiellement protectrice et nécessite le développement de thérapies complémentaires. En effet, les lésions cérébrales causées par l'EHI évoluent sur plusieurs heures, plusieurs jours, voire plusieurs mois, selon une séquence temporelle bien spécifique. La fenêtre thérapeutique pour une hypothermie contrôlée se situe, quant à elle, durant les 6 premières heures, ce qui limite son utilisation.

L'inflammation et le dysfonctionnement neurovasculaire (barrière hémato-encéphalique ou BHE) lors de l'EHI sont des facteurs importants qui accentuent les lésions cérébrales. Ces mécanismes se mettent en place rapidement après l'accident et perdurent pendant plusieurs jours voire semaines. Par conséquent, ils représentent de nouvelles cibles thérapeutiques importantes pour prévenir l'aggravation des lésions cérébrales après EHI.

Des résultats préliminaires obtenus au laboratoire chez la souris adulte montrent que des molécules que nous avons brevetées i) sont distribuées au cerveau, ii) restaurent les troubles cognitifs associés au vieillissement, iii) préviennent les troubles de la neurogenèse, iv) améliorent la fonction synaptique et v) réduisent la neuro-inflammation. In vitro nous avons montré que ces molécules ont également un effet bénéfique au niveau de la vasculature cérébrale en prévenant la perte de fonctionnalité et l'inflammation. L'ensemble de ces résultats prometteurs nous a conduits à émettre l'hypothèse que ces molécules atténueraient les lésions cérébrales induites à la fois par le dysfonctionnement de la BHE et l'inflammation après un accident hypoxique-ischémique dans la période néonatale.

Nous souhaitons donc maintenant établir la preuve de concept dans un modèle d'EHI néonatal in vivo en utilisant le modèle largement décrit dans la littérature et considéré comme le modèle de référence pour l'EHI chez le raton de 7 jours. 1170 animaux seront utilisés afin d'établir une relation dose/effet. Pour ce faire, 3 doses seront testées ainsi que 2 durées d'hypoxie permettant d'induire des lésions modérées ou sévères. Dans ce modèle, l'intensité des lésions cérébrales qui sont induites est différente chez les mâles et les femelles, ce qui correspond à la réalité clinique chez l'homme. Nous devons donc étudier les deux sexes séparément. Dans chaque groupe, les animaux seront répartis dans des sous-groupes afin d'étudier différents paramètres permettant de caractériser les effets thérapeutiques. Certains animaux seront utilisés pour quantifier le candidat médicament dans le cerveau, d'autres pour mesurer l'effet thérapeutique : étendue de la lésion cérébrale, expression de marqueurs neuronaux, de marqueurs de l'inflammation... Enfin, des tests cognitifs et des IRMs seront réalisés sur certains animaux pour évaluer les effets bénéfiques à long terme.

Cette expérimentation répond aux exigences en termes de réduction, de remplacement et de raffinement. Nous avons calculé qu'un nombre maximum de 1170 rats permettra une analyse statistiquement valable des résultats que nous obtiendrons. Une partie des expériences de ce projet ont été menées in vitro sur des modèles de BHE en cultures afin de remplacer au maximum l'utilisation des animaux mais toutes ont leurs limites. Il est donc impossible aujourd'hui de se substituer totalement à une expérimentation in vivo. Par ailleurs, notre projet a des ambitions d'application en clinique humaine et il est important d'avoir un développement mimant les essais réalisés en clinique. Enfin, le raffinement des animaux sera assuré, durant l'élevage, notamment par le suivi quotidien des animaux par un personnel qualifié et compétent et la constitution de groupes sociaux d'animaux. Les animaux seront hébergés en groupes dans une cage enrichie avec des accessoires de jeu et du matériel pour la fabrication de nids. Des critères d'arrêt sont également prévus sous le contrôle du vétérinaire de l'établissement, afin d'éviter toute souffrance des animaux.

18231 Ce projet vise à utiliser un système d'impulsions électrostatiques simple afin de provoquer un effet anticancéreux sur des tumeurs solides chez le rat. Cette technique reprend certains principes de l'électroporation anticancéreuse à distance, par l'application d'impulsions de champ électrique, sans contact avec l'animal et donc sans douleur, ni contention.

Les perspectives sont particulièrement intéressantes car l'application à l'homme est directe, seule diffère la puissance nécessaire des champs appliqués.

L'effet biologique souhaité est de provoquer une mort cellulaire ciblée des cellules tumorales, liée au nombre d'impulsions et à l'importance du champ électrostatique associé auquel sont soumis les animaux, car aucun courant ne les traverse (par l'utilisation de lames isolantes et mises à la terre). Le mécanisme par lequel cet effet biologique arrive est celui de provoquer une mort immunologique, qui expliquerait l'absence d'effets délétères observées lors d'expériences précédentes chez les rongeurs.

L'appareil comporte une électrode d'application unique délivrant des champs électrostatiques intenses. Cette électrode est portée en basse fréquence pendant une durée courte à un potentiel élevé et semble agir sur la distribution électrique de macromolécules des membranes des cellules tumorales.

Différents tests concluants ont été faits sur des masses tumorales de biopsies ex vivo, mais la validation de cette technique chez des animaux vivants est indispensable. Le :

REMPACEMENT de l'organisme vivant n'étant pas possible pour caractériser la réduction et suppression des tumeurs dans les groupes traités car c'est une action immunologique complexe. Les traitements sont prévus pendant 90 minutes deux fois par jour cinq jours par semaine et une fois le WE, pendant 3 semaines. Une attente d'une semaine est à prévoir entre le moment de l'inoculation des cellules tumorales et l'apparition palpable de la masse tumorale. Les cellules seront inoculées sous sédation derrière le cou dans sa partie basse. Des mesures de croissance tumorale seront réalisées trois fois par semaine et le poids des animaux sera également suivi afin de réaliser des courbes de croissance et décroissance tumorales (groupe non traité / traité) et corrélérer l'augmentation de poids. Tout ceci n'est pas possible chez un autre organisme non vivant.

RAFFINEMENT : les animaux bénéficieront de toutes les conditions de raffinement possibles, commençant par un hébergement en atmosphère contrôlée dans des groupes sociaux avec de l'enrichissement adapté. De plus, le personnel qui surveillera et manipulera les animaux est formé et expérimenté et une légère sédation sera réalisée afin de minimiser le stress au moment de l'inoculation cellulaire.

REDUCTION : les conditions expérimentales prévues pour compléter ce projet nécessitent l'utilisation de 4 groupes de rats. Nous avons minimisé au maximum le nombre final d'animaux susceptibles de donner des résultats pertinents et nécessiterons de 20 rats afin de réaliser l'intégralité du projet. Les rats doivent être de jeunes femelles, qui sont plus petites, dociles et calmes. Ceci afin de nécessiter le moins de volume possible sans restreindre les mouvements et ainsi ne pas avoir de sensation d'inconfort du au confinement dans la cage d'expérience, qui a un volume libre d'environ 2500cm³ (20cm de diamètre sur 8cm de hauteur).

18232 Première cause mondiale de cécité, les neurodégénérescences rétinienne sont sans cesse en augmentation et concernent aujourd'hui une grande partie de la population française et mondiale. Les troubles de la vision restent une préoccupation grandissante avec l'avènement des dernières technologies. Par exemple, le glaucome touche plus de 10% de la population âgée de plus de 70 ans tandis que la Dégénérescence Maculaire liée à l'Age (DMLA) a une incidence de 8% après 50 ans. On estime également que 40% des diabétiques sont porteurs d'une rétinopathie. Avec les neurodégénérescences congénitales ces maladies sont devenues la première cause mondiale de handicap visuel (juste derrière les cataractes dont la prise en charge thérapeutique a fait ses preuves) et les besoins médicaux restent encore très insatisfaits. D'ailleurs, la plupart de ces pathologies ne bénéficient pas de traitement curatif si ce n'est palliatif.

Cette demande de projet a pour objectif d'apporter des solutions pour améliorer les perspectives thérapeutiques. De récents travaux scientifiques se sont focalisés sur la compréhension des mécanismes d'apparition et de détectations de ces maladies, améliorant la précocité des diagnostics et les chances de succès. Dans l'œil aussi, il existe des barrières physiologiques du corps humain qui limitent considérablement les possibilités de traitements et constituent de réels challenges thérapeutiques.

Il existe 3 grandes routes d'administration pour cibler le compartiment postérieur de l'œil :

1) L'administration systémique : La rétine présente un réseau vasculaire qui assure des échanges constants entre le compartiment sanguin et le parenchyme nerveux. Ces échanges sont régulés et très sélectifs, d'où le nom de barrière hémato-rétinienne (BHR). Son rôle est d'assurer l'apport d'éléments essentiels à son bon fonctionnement, mais bloque aussi le passage de molécules non-spécifiques tels que certains médicaments.

2) L'administration topique : cette formulation en collyre a pour finalité le passage successif au travers de la cornée, des humeurs aqueuses et vitrées de l'œil pour finalement atteindre la rétine. A ce jour et pour des questions de formulation il n'existe, à l'exception de quelques essais cliniques, peu ou pas de traitement pour la rétine empruntant cette route.

3) Enfin, l'injection intra-vitréenne, qui consiste à injecter directement dans le vitré de l'œil des molécules thérapeutiques pour augmenter l'exposition de la rétine à ces dernières et c'est actuellement, la seule voie considérée comme efficace dans bon nombre de pathologies.

La stratégie envisagée dans ce projet sera de faciliter ce passage de biomolécules au travers des différents compartiments de l'œil pour atteindre la rétine. Par le développement de molécule-vecteurs, notre société améliore la biodisponibilité et le passage d'agents thérapeutiques vers la rétine. Grâce à la reconnaissance spécifique d'un partenaire ou d'un récepteur, le complexe vecteur-médicament pourra franchir ces barrières. Lorsque celui-ci n'arrive pas à atteindre sa cible par injection intra-veineuse une administration par contact topique ou directement dans le vitré s'avère être une bonne alternative.

Notre société et ses partenaires académiques ont engagé le développement de vecteurs (peptides, fragments d'anticorps), conjugués avec différentes classes de molécules (agents d'imagerie, drogues thérapeutiques, siRNA) et proposé comme potentiels candidat-médicaments. Dans notre cas de petits ARN interférents (siRNA), dont la finalité est de bloquer en amont les ARN messagers responsables de l'expression de certaines protéines impliquées dans l'apparition symptomatique des pathologies rétinienne. L'association de ces protéines aux rétinopathies est maintenant bien connue et décrite dans la littérature. Leur criblage et études sur sujets sains permettent notamment de mieux comprendre et appréhender leurs dysfonctionnements, sans que pour autant elles n'aient à court terme d'effets sur la santé et le bien-être animal (3R : raffinement).

Dans ce projet nous proposons d'étudier 7 jours post administration topique ou intra-vitréenne (IVT) les quantités d'ARNm rémanentes dans la rétine pour valider directement l'efficacité de nos composés. Ainsi, nos vecteurs pourraient permettre une médication optimisée et réduite par rapport à l'intraveineux (action plus locale, doses moins importantes), limitant de ce fait de possibles effets secondaires non souhaités (3R : raffinement).

Nos conjugués sont développés dans le cadre de partenariats industriels qui nous imposent de ne pas divulguer les récepteurs cibles de nos vecteurs ni les types de siRNA utilisés. Pour mener à bien notre modèle préclinique, nous envisageons de réaliser des expériences sur la souris, modèle indispensable pour l'étude de ces mécanismes (3R : remplacement).

Ce projet comportera deux procédures pour une durée de 3 ans : 1) Valider les conjugués vecteurs couplés à des siRNA au niveau oculaire via une administration topique chez l'animal vigile pour tester l'efficacité pharmacologique par dosage des ARN messagers dans le tissu cible. Préalablement sélectionnés et produits, nos Vecteur-médicaments sont testés de manière à valider leurs effets pharmacologiques au niveau rétinien. 2) La seconde procédure aura la même finalité mais en administration IVT. Au total, nous envisageons d'utiliser un nombre maximum de 720 souris sur 3 ans, calculé sur la base de : 24 animaux par conjugué, 4 groupes de 6 individus, (groupes tests, contrôles) à raison d'une dizaine de composés à tester par an. Ce n de 6 correspond au nombre minimum nécessaire pour encadrer et valider l'effet pharmacologique d'un conjugué (3R : réduction). Enfin un enrichissement matériel (dômes) est mis en place dans toutes les cages, le tout en hébergement spécifique (T°C, cycle lumière 12h/12h. . .), avec suivi global du bien-être (3R : raffinement).

REPLACEMENT : Les supports vitro ne suffisent pas à reproduire les modèles complexes de l'œil pour répondre aux questions soulevées par la régulation de la dynamique des protéines rétinienne.

REDUCTION : Nombre d'animaux par groupe expérimental a été réduit au minimum requis pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs.

RAFFINEMENT : Les conditions d'hébergement seront optimales et enrichies avec suivi du bien-être. Les animaux seront soumis à un protocole anesthésique et analgésique rigoureux, comportant une anesthésie et une analgésie adaptée.

18233 L'asthme, toutes causes confondues, touche environ 4 millions de personnes en France et provoque près de 900 décès par an. L'asthme allergique est une maladie inflammatoire des bronches, liée à l'inhalation d'allergènes qui débute essentiellement avant l'âge de 20 ans. Les allergènes de l'environnement sont plus fréquemment en cause que les allergènes alimentaires. De plus, depuis quelques années sont recensées des maladies pulmonaires causées par des polluants environnementaux, comme l'ozone, la fumée de cigarette... Ces divers polluants seraient la cause de 5% des cancers mortels en France. Ces 2 modèles peuvent être exacerbés l'un par l'autre et ainsi amplifier l'altération des poumons qui ne parviennent plus à assurer correctement leur fonction respiratoire.

Le but de ce projet est de développer les protocoles permettant d'associer l'exposition aux allergènes et polluants puis d'étudier et comprendre le rôle des cytokines, récepteurs et voies de signalisation impliquées dans la réponse immunitaire de l'hôte lors du développement de l'asthme allergique chez la souris induit par HDM (acariens), OVA (ovalbumine), papaïne (protéine mimant les allergènes comme les excréments d'acariens) et pollen de bouleau (Birch pollen ; BP), exacerbé par une exposition aux polluants comme la silice, DEP (Diesel Exhaust Particle) et autres microparticules, ozone et fumée de cigarette ainsi que le virus Influenza A H3N2 (Scotland/20/74) ou *Aspergillus fumigatus* (Asp ; champignon microscopique). L'effet exacerbant de l'asthme sur une inflammation ou fibrose pulmonaire provoquée par l'exposition aux polluants pourra aussi être étudié.

Ce projet s'inscrit dans la continuité de divers projets qui ont déjà fait l'objet d'une évaluation pour les modèles d'asthme induit par HDM, OVA, papaïne et BP, et les modèles de fibrose pulmonaire après exposition à la silice, DEP et autres microparticules, ozone, fumée de cigarette ainsi que des infections virales (Influenza A ; H3N2) ou Asp. Ces projets nous ont permis de mettre en évidence une partie du mécanisme d'induction de l'asthme allergique et de la fibrose pulmonaire séparément.

Dans ces modèles d'inflammation pulmonaire, les animaux vont développer une maladie respiratoire mimant les symptômes présents chez les patients atteints d'asthme allergique avec fibrose pulmonaire induite par les polluants environnementaux, ou infection virale (Influenza A) ou Asp, à savoir fatigue, dyspnée et respiration sifflante.

Ces associations allergène et polluant étant encore peu caractérisées, nous n'avons pas de recul sur les dommages pouvant être causés à l'animal, néanmoins chaque protocole séparé n'a jusqu'alors pas induit de souffrance à l'animal avec atteinte du point limite impliquant une mise à mort. Toutefois, nous agissons dans le respect de l'animal et de la réglementation. Durant l'expérimentation, en fonction des modèles, les animaux peuvent présenter un amaigrissement et développer une gêne respiratoire. Pour limiter au maximum la souffrance et le stress pouvant être occasionné, des anesthésiques seront utilisés pour les expositions et une grille de score clinique ayant pour critère le comportement, l'aspect et l'amaigrissement de chaque animal sera renseignée quotidiennement.

Pour étudier les mécanismes d'exacerbation de l'asthme par l'exposition à un polluant ou une infection, ou l'inverse, nous devons développer ces protocoles en associant allergène et polluant.

Les souris vont recevoir un allergène respiratoire et vont développer une insuffisance respiratoire spécifique de la pathologie, liée à un afflux de cellules dans les poumons. Les animaux sont avant ou après (1-21 jours selon le modèle) induction de l'asthme allergique exposés à des polluants environnementaux, virus (Influenza A H3N2) ou Asp, provoquant une fibrose pulmonaire.

L'animal utilisé est la souris C57BL/6 et BALB/c génétiquement modifiée (37 lignées d'intérêt considérées) ou non. L'administration des allergènes, virus (Influenza A H3N2) et/ou polluants se fait par voie intranasale, intratrachéale sous anesthésie pour minimiser les situations douloureuses

et stressantes ou par exposition, voie intrapéritonéale ou intraveineuse. Les animaux déficients utilisés ne présentent pas de phénotype dommageable. Les animaux seront mis à mort 24-72h après le dernier challenge ou exposition pour étudier les paramètres inflammatoires, immunologiques et histologiques dans les poumons

Une surveillance quotidienne des animaux est effectuée pendant la période d'acclimatation et d'expérimentation. Les animaux sont hébergés par 5 maximum dans des cages de 530 cm² à fond plein sur portoir ventilé (l'annexe II de l'arrêté relatif à l'agrément des EU).

Le projet représente un ensemble d'études types. Le nombre d'études réalisées durant la période de validité de l'autorisation va dépendre des résultats obtenus.

Chaque étude comprendra 8 groupes/lots, soit 64 animaux/étude

Chaque allergène pourra être étudié avant ou après exposition à un des 6 facteurs aggravants (polluants, virus Influenza ou Aspergillus), soit 12 études par allergène.

Seules les exacerbations les plus pertinentes seront répétées pour vérifier la reproductibilité de l'expérience, soit 3 études supplémentaires, ce qui donne une moyenne de 15 études pour un allergène. Soit pour 4 allergènes fois 15 études = 60 études.

Le projet comporte 60 études de 64 animaux, soit 3840 animaux.

A ce jour, l'animal de laboratoire reste le seul recours fiable et pertinent permettant d'étudier les mécanismes d'inflammation et de régulation. Ce projet sera réalisé en respectant les principes fondamentaux de l'expérimentation animale :

Remplacement : le modèle animal est fondamental dans notre cas, puisque l'étude de l'inflammation et de la pathologie ne peut se faire que sur un organisme vivant entier.

Raffinement: Pour respecter le bien-être des animaux et éviter au maximum la douleur et le stress au moment de l'expérimentation, une grille de score clinique comprenant des points limites adaptés et prédictifs sera renseignée quotidiennement. Le/les animaux atteignant le point limite seront mis à mort. De plus une anesthésie générale sera utilisée pour les intranasale et intratrachéale

Réduction : le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement pertinents et reproductibles, évitant ainsi de refaire plusieurs fois les mêmes expérimentations

18234 Il y a 40 ans, le mot "stress" commençait à peine à être connu. Maintenant, c'est une réalité que plusieurs considèrent comme un problème normal de la vie moderne. Le stress est le lot quotidien d'une majorité de personnes dans leur travail, mais il atteint également les enfants, les adolescents et les personnes âgées. Selon l'American Institute of Stress, ce problème est à l'origine de 75 à 90% des nouvelles consultations médicales et de 60 à 80% des accidents de travail. Les coûts du stress se manifestent sous forme d'absentéisme, de perte de productivité, de rotation de personnel, d'accidents, de frais médicaux et légaux directs ainsi que d'assurances et de compensations. Cette situation s'aggrave d'année en année et la situation pandémique telle que celle vécue au cours de l'année 2020 a accéléré celle-ci et a touché de nouvelles catégories de personnes, étudiants, restaurateurs, personnes travaillant dans l'évènementiel, la culture et les loisirs pour ne citer qu'elles.

Dans le cas de stress aigu, les traitements médicamenteux permettent de reprendre le contrôle de la situation. Dans le cas de stress chronique, différents traitements médicamenteux peuvent être prescrits (bêta-bloquants, anxiolytiques, anti-dépresseurs, neuroleptiques) mais l'indication de ces traitements n'est pas toujours prioritairement l'effet anti-stress et ils ne sont pas dénués d'effets secondaires. En effet, le sevrage des traitements médicamenteux est très complexe et un arrêt brutal du traitement peut s'avérer dangereux. Le sevrage s'effectue sur une longue période avec une diminution de la dose très progressive. Ainsi, il est indispensable de privilégier des traitements anti-stress à court terme.

Le modèle rat est utilisé régulièrement par l'industrie pharmaceutique pour évaluer l'efficacité de produit contre le stress et le test comportemental utilisé est validé et reconnu par la communauté scientifique travaillant sur les tests comportementaux.

Le protocole consiste, après administration orale du produit à tester, en la mise en présence de l'animal d'une sonde électrique lui administrant une unique et très faible décharge électrique de 2mA sur les pattes antérieures. Ensuite, le comportement de l'animal est observé pendant 5 minutes. Un rat stressé va naturellement enfouir la source de stress (la sonde) en la recouvrant de sciure. Un rat non stressé ne portera pas d'attention particulière à la sonde, il retournera volontiers dessus.

Dans ce projet, 3200 rats seront utilisés en 50 études sur 5 années pour valider l'efficacité de 200 lots de production d'un produit anti-stress commercialisé pour l'homme et les animaux de compagnie. L'utilisation d'animaux est indispensable pour étudier les effets de ces lots de production sur le stress car il n'existe pas de méthode alternative (tests in vitro ou in silico) pour le remplacer (remplacement). Le nombre d'animaux est cependant limité au strict minimum afin de garantir la validité et l'interprétation scientifique des résultats, 4 produits étant testés simultanément pour limiter le nombre de groupes contrôle et référence (réduction). Chaque groupe comprend 10 animaux et 4 rats supplémentaires sont commandés pour pallier les problèmes de rats ne touchant pas l'électrode et étant donc exclus de l'étude. Deux animaux supplémentaires par groupe seraient trop et l'expérience a montré que 4 rats supplémentaires pour 6 groupes d'animaux étaient nécessaires et suffisants. Les expérimentations sont effectuées selon la réglementation et les recommandations en vigueur afin de limiter au maximum l'impact de l'administration orale et du test comportemental sur l'état de stress des animaux (raffinement).

Les 2 seules procédures utilisées dans ce projet sont 1) le traitement par voie orale des animaux avec les composés à tester, et 2) le test comportemental de l'enfouissement défensif conditionné (EDC) consistant après une période d'habituation sur 2 jours des animaux au dispositif expérimental sans électrode, à placer une électrode délivrant un choc électrique léger unique le jour du test, effectué 1 heure après traitement avec les composés à tester, et d'enregistrer son comportement pendant 5 minutes.

Les animaux sont hébergés par 3 ou 4 dans des cages ouvertes de 1300 cm² de surface, 18 cm de hauteur et placés en cycle de lumière inversé (lumière de 20h à 8h) afin de respecter leur chronobiologie et réaliser les études pendant leur phase d'activité, et également de respecter la chronopharmacologie des composés testés.

Aucun enrichissement n'est utilisé pour ce projet, celui-ci pouvant influencer le comportement naturel des animaux selon des expériences menées en interne.

Un contrôle du bien-être des rats est effectué quotidiennement tout au long de l'étude (vocalises, piloérection, cachexie,...), week-end et jours fériés inclus. Les animaux qui présenteraient un comportement anormal (arrêt de prises de nourriture ou de boisson, perte de poids, émission de vocalises, piloérection, cachexie,...) seraient exclus de l'étude et une mise à mort en conformité avec les recommandations éthiques serait effectuée.

Les animaux issus de ce projet pourront être réutilisés pour de la recherche interne comme des entraînements à la chirurgie avec procédure sans réveil, ou donner à des établissements utilisateurs agréés pour des enseignements (travaux pratiques).

18235 Le développement et l'évolution des lésions athérosclérotiques résultent d'un processus lent et complexe au niveau des artères de gros ou moyen calibre. La détection de, et l'intervention précoce sur ce processus responsable de la majorité des décès par maladie cardiovasculaire est un enjeu de santé publique considérable. L'identification de facteurs de risque précoces d'athérosclérose, ainsi que la compréhension des mécanismes moléculaires sous-tendant leur apparition, sont donc clefs dans la lutte contre l'athérosclérose. Dans ce contexte, la maladie du foie gras non alcoolique (NAFLD) revêt un intérêt majeur puisque des études épidémiologiques ont clairement identifié la NAFLD comme un facteur de risque précoce d'athérosclérose indépendant de l'obésité. La progression de la NAFLD, de la stéatose, simple accumulation bénigne d'acide gras dans le foie, vers un stade pro-inflammatoire (Non alcoholic steatohepatitis ou NASH), voire un stade fibrotique ou cirrhotique dans 10-30% des cas rend cette maladie redoutable en soi, et la découverte d'un NASH par des tests biochimiques ou échographiques doit aussi faire suspecter une possibilité de

pathologie vasculaire à long terme. La relation de causalité entre NASH et atherosclérose est le sujet d'intenses débats, mais l'hypothèse que la production de facteurs pro-athérogéniques par le foie enflammé tels que la CRP, le fibrinogène, PAI-1 ... favorise la progression de la plaque athéromateuse est crédible, mais reste non démontrée.

Les études extensives menées par notre laboratoire identifient le récepteur nucléaire Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha (PPAR α) comme une cible thérapeutique d'intérêt majeur dans ce champ pathologique. PPAR α est un récepteur nucléaire connu pour réguler l'utilisation des acides gras et réprimer les voies de signalisation pro-inflammatoires dans le foie. Nos travaux les plus récents ont montré pour la première fois que PPAR α inhibe la progression de la stéatose vers le NASH et la fibrose par un mécanisme anti-inflammatoire direct, indépendant de son effet sur le métabolisme lipidique hépatique dans un modèle murin de NASH. En utilisant un mutant de PPAR α possédant uniquement ces activités anti-inflammatoires et dont l'expression sera restreinte aux cellules hépatocytaires dans un modèle génétique murin d'athérosclérose et de NASH (PPAR α KOxLDL-R KO), nous évaluerons donc directement la contribution d'un processus inflammatoire hépatique à la progression de la plaque d'athérome aortique. Les déterminants moléculaires du processus inflammatoire hépatique seront identifiés par des études de génomique fonctionnelle, d'épigénomique et d'interactomique. L'évolution de la NASH sera suivie par transcriptomique à la fois dans le modèle murin et dans des cohortes de patients stratifiées par leur degré de NASH, afin d'identifier un (des) marqueurs prédictifs de l'évolution du NASH et sa corrélation avec les atteintes vasculaires. Les études in vitro sur modèles cellulaires ont permis de cerner des mécanismes d'action probables. Le recours aux modèles animaux est nécessaire car ce projet étudie des interactions inter-organes non modélisables in vitro ou in tubo. Le nombre total de souris utilisées sera de 864 souris, nombre justifié ci-dessous sur le plan expérimental.

18236 Le cancer de la prostate est le 1er cancer chez l'homme en fréquence. Actuellement, en fonction de l'avancé de la maladie, plusieurs approches thérapeutiques sont utilisées telles que la chirurgie, l'hormonothérapie la chimiothérapie et également la radiothérapie. Concernant cette dernière approche celle-ci est particulièrement intéressante pour traiter des tumeurs localisées ou encore en complément à la chirurgie pour traiter les résidus de tumeur. Néanmoins, les formes avancées de cancer de la prostate, notamment celles accompagnées de la présence de métastases, reste résistance à ces approches thérapeutiques. Aussi la recherche s'oriente vers de nouvelles stratégies.

Ainsi, le présent projet consiste à évaluer les effets anti-tumoraux de différentes approches thérapeutiques (chimiothérapie, immunothérapie, radiothérapie - associées ou non à une ablation chirurgicale de la tumeur) dans des modèles expérimentaux de cancers de la prostate chez la souris induits par l'inoculation de cellules tumorales.

Après implantation des cellules tumorales, les souris seront suivies cliniquement pendant une période variable, allant de quelques semaines à plusieurs mois, en fonction de la vitesse de croissance tumorale in vivo des cellules implantées et de l'apparition des signes cliniques associés à la tumeur. Selon les cas, le suivi de la croissance tumorale pourra être réalisé par l'utilisation des techniques d'imagerie.

Les animaux seront suivis quotidiennement.

Pour ce projet, il est prévu un nombre maximal de 800 animaux sur 5 ans.

La conception de ce projet prend en compte la règle des 3R.

Remplacement : dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez la souris car il n'existe pas de méthode de substitution (in vitro ou in silico) pour évaluer les effets d'une nouvelle approche thérapeutique pour ces tumeurs. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité, de la toxicité et de la pharmacocinétique d'un candidat médicament. À ce jour, la souris est l'espèce la plus adaptée à ce type de modèle d'étude.

Réduction : Un nombre minimal et suffisant d'animaux par groupe est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et d'effectuer des analyses statistiques.

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

- la mise au point de procédures rigoureuses
- un protocole analgésique adapté pour la chirurgie et la période post-opératoire et un suivi post-opératoire de l'état de santé des animaux avec des soins et un enrichissement adapté afin de permettre une bonne récupération des animaux
- le recours à des procédures les moins invasives et moins douloureuses possibles (par exemple l'imagerie)
- un suivi clinique étroit des animaux pendant la phase de croissance des tumeurs et après
- la mise en place de points limites adaptés et le suivi d'éventuels signes cliniques
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

18237 Les reins ont pour rôle essentiel d'éliminer l'excès d'eau et les déchets de l'organisme par la filtration du sang et la production de l'urine.

Au cours du diabète, certains patients présenteront une dysfonction de ce filtre rénal, avec d'abord des anomalies des microvaisseaux, une fuite anormale de protéines du sang dans les urines (protéinurie) puis une rétention d'eau et de déchets (insuffisance rénale), mettant en jeu le pronostic vital en l'absence de traitement.

Le diabète est actuellement la première cause d'insuffisance rénale chronique en France.

Sur des biopsies de reins de patients diabétiques, nous avons observé l'expression anormalement intense d'un facteur de croissance, l'amphiréguline, au niveau des microvaisseaux.

Des études récentes ont montré le rôle pathologique de l'amphiréguline dans d'autres maladies rénales.

Notre projet a pour but de déterminer si l'amphiréguline a un rôle dans le développement des anomalies vasculaires au cours de la néphropathie diabétique.

Nous traiterons des souris à la streptozotocine afin de les rendre diabétiques, un modèle de diabète reconnu depuis de nombreuses années, et nous analyserons la fonction rénale en réalisant des prélèvements urinaires mensuels et sanguins en fin de procédure.

La streptozotocine est un antibiotique qui a aussi un effet toxique sur les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas, responsables de la sécrétion d'insuline. Son administration chez la souris entraîne donc une carence en insuline et un diabète.

Nous allons étudier une lignée de souris déficientes en amphiréguline, et observer si l'absence de cette protéine peut protéger des lésions vasculaires du diabète par rapport à des souris non déficientes.

Après 10 semaines, les souris seront euthanasiées pour prélèvement d'organes afin d'étudier les lésions vasculaires rénales.

Ce projet s'inscrit dans un respect strict de la règle des 3R.

REEMPLACER.

Le diabète est une maladie complexe et seule l'expérimentation animale, mimant le plus fidèlement possible le microenvironnement diabétique et les interactions cellulaires, permettra d'étudier les mécanismes impliqués dans les lésions vasculaires rénales au cours du diabète.

La souris est un modèle de choix car elle développe des complications vasculaires du diabète proches de celles de l'homme.

Nous avons au préalable confirmé la surexpression de l'amphiréguline au niveau des reins de souris diabétiques provenant de précédentes expériences dans le laboratoire, afin de remplacer autant que possible l'utilisation du modèle animal, avant de procéder au présent projet.

REDUIRE.

Le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum (80) tout en assurant une puissance statistique suffisante.

RAFFINEMENT.

Afin de limiter au minimum les contraintes infligées aux animaux, ils seront placés en petit nombre par cage, et les procédures se dérouleront avec une surveillance quotidienne, des analgésiques étant prévus en cas de nécessité.

Des points-limites précoces ont été établis, permettant l'euthanasie anticipée de l'animal si les soins prodigués ne permettent pas de soulager sa souffrance.

A terme, les résultats de ce projet permettront de comprendre plus précisément le rôle de l'amphiréguline dans le développement de la néphropathie diabétique, et pourraient ouvrir la voie au développement de thérapie ciblée chez l'humain.

18238 Dans le cadre de la recherche contre le cancer visant à définir les meilleures conditions d'utilisation d'un traitement innovant en clinique chez les patients, des études précliniques de pharmacocinétiques/pharmacodynamiques (PK/PD) sur l'animal permettent d'étudier la biodistribution, le cheminement et l'élimination de l'organisme des traitements administrés.

La PK ou ADME (Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion) permet de déterminer comment l'organisme distribue et utilise un traitement, alors que la PD analyse les effets du traitement sur l'organisme (ex : toxicité, effets secondaires).

Pour effectuer ces analyses, nous utiliserons des souris porteuses de tumeurs humaines ou PDX (Patient-Derived Xenograft) que recevront spécifiquement des traitements à différentes doses et suivant différents schémas et/ou voies d'administration. La présence d'une tumeur peut potentiellement perturber les paramètres de PK/PD des molécules évaluées. Il est ainsi important de travailler dans des modèles reproduisant le contexte tumoral observé chez les patients en clinique.

Une fois le traitement administré, des prises de sang à des temps donnés en fonction des types de molécule sont réalisées sur les animaux pour déterminer la propagation de cette molécule dans l'organisme (analyse pharmacocinétique). Puis pour compléter les prélèvements sanguins, les animaux sont euthanasiés afin de prélever des organes et tissus nécessaires aux analyses de pénétration et de distribution de cette molécule dans les tissus et la tumeur (analyse pharmacodynamique). La procédure expérimentale nécessite 63 animaux au maximum.

Ce projet est un ensemble de 40 études basées sur la même procédure expérimentale : greffe-traitement-prélèvements. Ces 80 études différeront sur le modèle tumoral utilisé, les traitements administrés (doses, schéma et voie d'administration) et les temps de prélèvements, ainsi que les tissus prélevés. Ce projet se déroulera sur 5 ans et comprendra au maximum 5040 animaux (80*63). Ce nombre de souris pourra être réduit en fonction des modèles tumoraux utilisés.

Concernant la règle des 3Rs, ces prélèvements ne peuvent être réalisés qu'à partir d'organisme entier pour étudier leur parcours de l'administration à l'élimination et donc l'utilisation de l'animal ne peut pas être remplacée à ce jour.

Les modèles utilisés sont parfaitement maîtrisés et permettent de n'utiliser que le nombre strictement nécessaire d'animaux et d'obtenir des résultats pertinents. Les traitements retenus pour ce projet auront été sélectionnés au préalable lors d'étude in vitro permettant la réduction du nombre de groupe à tester. Toujours d'après les résultats in vitro, seuls les traitements démontrant les meilleurs effets seront testés in vivo permettant au mieux de raffiner ces études.

18239 L'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) est une sérine protéase avec des fonctions pléiotropiques. Le tPA est impliqué entre autres dans la fibrinolyse, la survie des neurones et l'inflammation. Le rôle du tPA dans les réponses immunitaires innées et adaptatives impliquant respectivement les macrophages, cellules dendritiques et les lymphocytes T et B, est très mal caractérisé à ce jour. Afin de mieux le comprendre, nous proposons d'analyser la réponse

immunitaire chez des souris sauvages et déficientes pour le tPA de manière constitutive (tPA Wild type vs tPA Knock-Out et tPA Null).

Trois panels visant à étudier d'une part la réponse immunitaire innée et d'autre part l'immunité acquise, seront mis en place. Le premier panel d'animaux ne recevra aucun agent pharmacologique, il sera dit naïf. Le second panel recevra une injection de Lipopolysaccharide (LPS) afin d'étudier les profils phénotypiques de macrophages et cellules dendritiques. Le troisième panel d'animaux sera immunisé par un antigène : hémocyanine de patelle (Keyhole Limpet Hemocyanin ; KLH), en présence d'adjuvant. La production d'anticorps anti-KLH et les caractéristiques des cellules immunitaires jouant un rôle dans la réponse adaptative seront étudiées.

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

Premièrement, nous ne pouvons souscrire au principe de Remplacement dans ce protocole. La souris est l'espèce animale la plus étudiée en recherche dans le domaine de la réponse immunitaire. Que ce soit pour étudier les effets de l'injection de lipoglycane d'origine bactérienne que pour étudier les effets de l'immunisation par un antigène fortement immunogène, il est important de pouvoir tester ces paramètres chez l'animal afin d'observer les réponses d'un organisme complexe. De plus, cette étude utilisant des animaux se base sur une bibliographie pertinente rendant cette étude sérieuse et fondée sur des principes scientifiques déjà établis. Afin de Réduire le nombre d'animaux inclus dans notre étude, nous procéderons à une limitation aux seules expériences considérées comme absolument indispensables. Ainsi, les procédures expérimentales décrites dans ce projet ont un caractère de stricte nécessité et ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information.

Enfin, afin de souscrire aux principes éthiques et de Raffinement, les conditions de transport, d'élevage et d'hébergement sont optimisées (cages standards aux normes européennes avec litière enrichie et favorisation de la nidification. Le bien-être des animaux est contrôlé 7j/7 par du personnel qualifié. Cette surveillance quotidienne et hebdomadaire permet de détecter tous signes cliniques de souffrance (douleur, perte de poids etc.) et d'agir rapidement pour mettre fin à cette détresse. Les animaux seront anesthésiés durant la chirurgie. L'ensemble des connaissances et des acquis dont nous disposons au laboratoire montre que les animaux se déplacent et s'alimentent normalement, prennent bien soin de leur pelage, n'émettent aucun son et ne présentent aucun « sickness behavior syndrom ». Le protocole est planifié pour éviter le stress des animaux. Nous avons établi en amont des points limites (ou critères d'arrêt anticipé) de la procédure. Le Raffinement concernant les méthodes et les procédures expérimentales sera assuré par des soins adéquats avant, pendant et après chaque procédure expérimentale, ainsi que par l'utilisation d'anesthésie/analgésie. Le Raffinement de l'étude sera également assuré par la réduction maximale de la durée de l'expérimentation et par l'emploi de procédures de mise à mort appropriées.

Nous avons défini, en amont, la taille des groupes de nos animaux grâce à l'emploi d'une analyse de puissance statistique. 400 animaux seront nécessaires pour mettre en évidence des phénomènes biologiques reproductibles et robustes sur lesquels des analyses statistiques pourront être réalisées. En prenant en compte ces recommandations, un total de 100 souris tPA KO, 100 souris sauvages associées, 100 souris tPA Null et 100 souris sauvages associées sera utilisé lors de ce projet. Ces animaux seront répartis comme suit, dans 3 panels :

- 1) Animaux naïfs (sans procédure expérimentale ; =80 animaux),
- 2) Animaux injectés LPS (procédure expérimentale 1 ; =160 animaux),
- 3) Animaux immunisés par la KLH (procédure expérimentale 2 ; =160 animaux).

Mots clefs : activateur tissulaire du plasminogène (tPA) ; cellules immunitaires ; macrophages ; cellules dendritiques ; lymphocytes T ; lymphocytes B.

18240 La myopathie à némaline (NM), aussi appelée myopathie à bâtonnets, est une maladie héréditaire touchant les muscles qui est de sévérité variable. Cette pathologie, dont l'incidence dans la population est de 1/50 000, ne bénéficie à l'heure actuelle d'aucun traitement et se traduit dans la majorité des cas par un décès à un âge précoce. Cette pathologie est due à des mutations localisées dans une dizaine de gènes, dont le gène codant pour la protéine : α -actine squelettique (ACTA1).

A ce jour, aucun modèle cellulaire ne permet de reproduire l'ensemble du phénotype de la maladie et il est essentiel d'avoir un modèle physiologique pour mettre au point la stratégie de thérapie génique. Le modèle animal murin reproduit bien les différents aspects phénotypiques et permet d'étudier l'ensemble des mécanismes physiopathologiques (pas de remplacement possible). Notre projet vise à étudier une souche murine porteuse d'une mutation au niveau du gène de l' α -actine squelettique et de mettre au point une stratégie de thérapie génique pour la NM en utilisant des Virus Associés aux Adénovirus (AAV) afin d'apporter aux cellules musculaires, ayant une forme mutée de la protéine ACTA1, un ADN capable de synthétiser la forme non mutée de cette protéine. Pour étudier l'efficacité de cette stratégie de thérapie génique, l'utilisation de la lignée murine possédant le gène muté d'ACTA1 est nécessaire. Cette lignée reproduit les aspects cellulaires et phénotypiques de la maladie humaine avec fidélité (faiblesse musculaire, présence de bâtonnets de némaline dans les fibres musculaires).

Notre projet nécessite le maintien de cette lignée au sein de l'animalerie, elle nous servira pour l'étude de notre stratégie de thérapie génique pour la NM.

De surcroît, afin de prévenir tout risque d'inconfort, de douleur ou de détresse des souris, des indicateurs de douleur et de souffrance (raffinement) ont été clairement définis (perte de poids excessive, aspect général de l'animal) et sont maîtrisés par le personnel qualifié en charge de l'expérimentation animale. Par ailleurs, le raffinement sera mis en avant par l'utilisation d'une alimentation adaptée et enrichie pour pallier aux conséquences de la maladie chez l'animal (les souris malades ayant un défaut de motricité, un aliment spécifique hydratant et nourrissant sera placé au sol dans la cage afin de leur en faciliter l'accès), des espaces de nidification seront également aménagés dans les cages. Par ailleurs, les infections oculaires qui peuvent accompagner le phénotype des souris mutantes seront traitées avec une pommade oculaire d'antibiotiques.

Les procédures expérimentales prévues dans ce projet se limiteront au strict nécessaire afin d'atteindre des résultats scientifiquement et significativement valides (réduction). Pour garantir cela, des calculs statistiques ont été réalisés pour estimer le nombre d'animaux nécessaire et suffisant à l'obtention de résultats statistiquement exploitables.

La durée du projet sera de 3 ans et il nécessitera l'utilisation totale de 720 souris.

18241 Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, l'infarctus du myocarde reste l'une des principales causes de mortalité dans le monde. Il est causé par l'apparition d'un caillot dans une artère coronaire qui provoque l'arrêt de la circulation sanguine dans le cœur aboutissant à la mort des cellules cardiaques, notamment par manque d'oxygène. Le traitement de l'infarctus du myocarde consiste à rétablir rapidement la circulation coronaire, que l'on nomme reperfusion, par élimination du caillot sanguin.

Cette reperfusion sanguine est indispensable pour permettre la survie des cellules cardiaques mais, paradoxalement, elle est elle-même potentiellement néfaste.

Il est donc essentiel de développer des stratégies de protection du cœur, à associer aux techniques de reperfusion classiquement utilisées pour réduire davantage la mortalité liée à cette pathologie.

Une des causes majeures de la mort des cellules cardiaques lors d'un infarctus du myocarde est un dysfonctionnement de composants des cellules, appelés mitochondries. Ces dernières sont des centrales énergétiques qui utilisent l'oxygène que nous respirons pour produire 90% de l'énergie dont nous avons besoin quotidiennement. Protéger les mitochondries lors de la reperfusion d'un cœur ayant subi un infarctus s'avère donc être une cible thérapeutique majeure.

Il a été montré sur des rats que la reperfusion du cœur s'accompagne d'une augmentation très importante de la quantité de cholestérol dans les mitochondries cardiaques. Cette accumulation de cholestérol pourrait être responsable, au moins en partie, du dysfonctionnement des mitochondries évoqué auparavant car des résultats récents montrent que des stratégies qui limitent cette accumulation, diminuent la sévérité des lésions causées par l'infarctus du myocarde chez le rat. Réduire cette accumulation de cholestérol dans la mitochondrie peut donc constituer une cible intéressante pour limiter les lésions de reperfusion.

Pour ce faire, il est important de connaître les mécanismes d'entrée du cholestérol dans la mitochondrie cardiaque et l'implication de protéines mitochondriales comme la protéine translocatrice, dans ce processus. Cette stratégie serait particulièrement pertinente chez les patients ayant un taux élevé de cholestérol dans le sang (hypercholestérolémie) car ils ont un risque plus important de faire un infarctus du myocarde.

L'objectif de ce projet est donc d'étudier l'effet d'un nouvel inhibiteur de la protéine translocatrice, utilisé en clinique humaine dans des pathologies neurologiques, sur l'accumulation du cholestérol dans la mitochondrie cardiaque et l'apparition des lésions de reperfusion après un infarctus du myocarde.

Pour ce projet, des rats Sprague Dawley seront soumis à un modèle expérimental d'infarctus du myocarde, technique employée habituellement au laboratoire et au plus proche de la réalité clinique. Certains de ces animaux seront traités avec ce nouvel inhibiteur par intraveineuse et qui a déjà montré des effets protecteurs dans le cas d'accidents ischémiques cérébraux.

Au total, nous utiliserons 132 rats, qui seront hébergés dans une animalerie conventionnelle. Ils auront à leur disposition des boules de coton et des feuilles de papier pour explorer, des maisonnettes en plastique pour se cacher ainsi que des bâtonnets ou billes en bois pour ronger et manipuler. Ils feront l'objet d'une surveillance quotidienne et auront accès à la nourriture et à l'eau à volonté.

L'ensemble des procédures sera réalisé chez l'animal profondément anesthésié. Afin de lutter contre la douleur post-opératoire, les animaux recevront une dose d'antalgique dès leur réveil, ainsi qu'une dose de rappel le lendemain.

Par ailleurs, il n'est pas possible de remplacer les animaux car seule leur utilisation permet d'atteindre les objectifs du projet et de rester proche de la réalité clinique humaine.

Enfin, nous prévoyons d'utiliser le minimum d'animaux en contrôlant leur nombre par des méthodes statistiques.

18242 L'arrêt cardiaque représente une affection majeure de santé publique avec environ 40 000 cas chaque année en France. Cette affection est associée à un très faible taux de survie puisque la majeure partie des patients réanimés meurt dans les quelques jours qui suivent l'arrêt cardiaque d'une sévère dysfonction neurologique. L'une des principales hypothèses physiopathologiques pour expliquer cette atteinte cérébrale est l'existence d'altérations métaboliques sévères survenant lors de l'arrêt et la reprise de la circulation sanguine. L'arrêt cardiaque entraîne notamment un phénomène d'ischémie-reperfusion généralisée qui conduit à une élévation très forte de la concentration sanguine en lactate. Le lactate peut être utilisé comme substrat énergétique par les neurones qui peuvent alors oxyder cette molécule en pyruvate afin de soutenir leur métabolisme mitochondrial. Ce phénomène est considéré comme protecteur dans le contexte de l'accident vasculaire cérébral ou le traumatisme crânien. Néanmoins, les conséquences fonctionnelles du métabolisme du lactate par les neurones sont inconnues dans le contexte de l'arrêt cardiaque.

Au cours de cette étude, nous nous proposons donc d'évaluer les conséquences neurologiques de la lactatémie en évaluant son devenir dans le cerveau au décours de l'arrêt cardiaque chez le lapin soit en augmentant soit en diminuant la lactatémie. Afin d'étudier le rôle du lactate, nous comparerons des conditions visant à aggraver la lactatémie au moyen de l'administration intraveineuse de lactate ou à mimer son utilisation par les neurones au moyen de l'administration de pyruvate par voie intraveineuse. Nous réaliserons parallèlement une inhibition pharmacologique de l'utilisation du lactate au moyen de l'administration d'oxamate, un puissant inhibiteur de la lactate

déshydrogénase. Enfin nous comparerons ces différentes conditions à une stratégie neuroprotectrice de référence développée par le laboratoire depuis de nombreuses années consistant en l'induction d'une hypothermie ultra-rapide par ventilation liquide totale.

Afin d'évaluer les conséquences neurologiques de ces conditions expérimentales, notre étude consistera d'une part à évaluer la consommation cérébrale de divers métabolites au moyen de la mesure de la différence artériovo-jugulaire en O₂, glucose et lactate ainsi qu'à une évaluation des concentrations intracérébrales de métabolites grâce à une méthode de microdialyse cérébrale. Dans un second temps, l'objectif sera de caractériser les conséquences fonctionnelles de ces modulations de l'utilisation du lactate par les neurones.

L'utilisation de modèles animaux est indispensables dans ce contexte en raison de la complexité de l'affection considérée et de la diversité des voies métaboliques étudiées ici. Cette situation ne peut en effet pas être mimée *in vitro* et il n'existe aucune méthode alternative (absence de Remplacement possible). Nous avons calculé statistiquement le nombre d'animaux minimum pour pouvoir mettre en évidence un éventuel effet, tout en réduisant autant que possible l'usage d'animaux et chaque expérience sera valorisée au maximum au travers d'analyses complémentaires, comme des analyses histologiques ou des dosages de biomarqueurs (Réduction). A toutes les étapes susceptibles d'être à l'origine d'une douleur, les animaux feront l'objet d'une anesthésie ou d'une analgésie avec des antalgiques puissants (Raffinement). Nous utiliserons ainsi 175 lapins sur une période de 3 ans. Les conditions d'hébergement des animaux correspondent aux normes en vigueur.

18243 La reproduction chez les ovins est saisonnière. Cette saisonnalité conduit à des variations annuelles dans la disponibilité et du prix des produits animaux (lait, viande) sur le marché. La reproduction hors saison sexuelle est un objectif prioritaire des filières ovines pour pouvoir étaler la production et les revenus des éleveurs tout au long de l'année.

La saisonnalité de la reproduction est d'autant plus marquée chez les jeunes femelles. Pour réussir la reproduction des agnelles hors saison sexuelle, le conseil en élevage préconise l'utilisation systématique d'un traitement hormonal pour induire et synchroniser les ovulations. Or, le contexte réglementaire et sociétal actuel oriente vers une moindre utilisation d'hormones en élevage. De plus, les traitements hormonaux ne sont pas autorisés en Agriculture Biologique.

Des données de la littérature montrent, chez différentes espèces des mammifères, qu'une supplémentation alimentaire avec des substrats riches en acides gras oméga 3, tels que l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et le docosahexaénoïque (DHA), aurait des effets favorables sur la fonction de reproduction. L'objectif du projet est d'évaluer si une supplémentation de la ration avec des acides gras polyinsaturés oméga 3, permettrait d'améliorer la fertilité et la prolificité des agnelles hors saison sexuelle, sans utilisation d'hormones.

Un total de 60 agnelles de race Ile-de-France seront utilisées. Des prélèvements sanguins (procédure 1) seront réalisés dans la veine jugulaire (au niveau du cou) des agnelles (supplémentées et non supplémentées) pour i/ confirmer la présence dans la circulation sanguine des acides gras apportés par l'aliment et ii/ évaluer l'activité ovulatoire des agnelles avant et pendant la période de reproduction. La fertilité sera étudiée grâce à un diagnostic de gestation par échographie et aux données des mises bas.

Remplacement : La reproduction, dès la conception à la mise bas, est une fonction complexe impliquant plusieurs organes (système nerveux central, hypophyse, ovaires, utérus) et ne pouvant pas être étudié *in vitro*.

Réduction : Un calcul de puissance statistique a été fait pour réduire au minimum le nombre d'animaux.

Raffinement : Pour les prélèvements sanguins, des précautions seront prises afin d'éviter tout risque de phlébite (tonte au niveau du cou pour mieux visualiser les veines, application d'un baume décongestionnant, antiseptique et cicatrisant). Les agnelles seront hébergées en groupe dans un bâtiment d'élevage conventionnel avec lit paillé et un accès aisé à l'auge et aux points d'abreuvements.

18244 Le test de l'inhibition du réflexe de sursaut consiste à mesurer l'amplitude du réflexe de sursaut d'un individu à un stimulus auditif, ainsi que l'inhibition de ce réflexe de sursaut lorsque ce même stimulus est précédé d'un stimulus auditif d'une intensité plus faible. Ce test est utilisé chez l'Homme et des déficits de cette inhibition du réflexe de sursaut sont observés chez les patients atteints de maladies neurologiques comme la schizophrénie ou la maladie d'Alzheimer. Ce test est largement utilisé dans la recherche préclinique et est régulièrement réalisé chez la Souris dans notre service.

Nous souhaiterions mettre en place ce test chez le Rat. Ce test peut être répété sur les mêmes animaux, sans impact sur les résultats obtenus, et nous aurions donc besoin de 10 rats pour établir une ligne de base des niveaux d'inhibition, avec la possibilité de modifier les intensités des stimuli si ces niveaux d'inhibition n'étaient pas adaptés à la détection d'un phénotype.

Le sexe n'a pas d'impact sur ce test et un groupe de 10 rats mâles, déjà présents dans notre zone pour d'autres développements, sera suffisant pour sa mise en place.

REMPACEMENT : de nombreuses structures cérébrales sont impliquées dans le réflexe de sursaut ainsi que dans son inhibition et l'utilisation d'un modèle animal est inévitable à l'heure actuelle.

REDUCTION : ce test peut être réalisé à plusieurs reprises sur les mêmes animaux, nous pourrions donc tester différents stimuli en conservant le même lot.

RAFFINEMENT : la mise en place de ce test chez le Rat peut permettre de confirmer des résultats obtenus chez la Souris et ainsi donner plus de force au phénotype observé et passer de façon plus rapide et sûre en phase clinique.

18245 L'espèce de poisson *Mullus surmuletus* (rougets de roche) est une espèce d'intérêt commercial qui est largement exploitée par les pêcheurs sur les différentes façades maritimes (Atlantique, Méditerranée).

Le projet porte sur la mise en évidence de différences génétiques intra-spécifiques au sein de cette espèce et ambitionne de tester la capacité de l'ADN environnemental à observer ces mêmes différences. Les résultats d'analyses de génétique des populations de rougets issus des tissus prélevés sur les spécimens seront comparés aux résultats obtenus avec les échantillons d'eDNA prélevés dans les aquariums.

L'objectif de cette « expérimentation » est de tester la faisabilité, et de démontrer l'utilité de l'eDNA en génétique des populations. En cas de succès, il deviendra inutile de capturer des animaux vivants pour effectuer des analyses génétiques intra-populationnelles. Celles-ci pourront être conduites directement en prélevant de l'eau de mer dans le milieu. Cela constitue une avancée majeure en génétique des populations en particulier en milieu marin pour la détection des patrons de diversité génétique spatiaux (génétique du paysage) où l'échantillonnage de nombreux individus dans de nombreuses localités se révèle souvent laborieux et coûteux, voire parfois impossible. Ce projet vise donc à répondre également à la « Règle des 3 R » : réduire le nombre d'individus ; remplacer par des techniques non invasives sur le poisson ; raffiner les analyses spatiales.

Le nombre total d'individus nécessaires sera de 50 (2 lots de 25 individus).

18246 Ce projet vise à évaluer si il est possible de suivre dans le temps les modifications de structure et fonction du cœur par imagerie après un infarctus expérimental induit chez la souris (en ligaturant une artère nourrissant le cœur appelée artère coronaire).

Pour mener ce projet nous avons dans un premier temps mis en place le modèle de souris d'infarctus et développé l'imagerie cardiaque chez la souris. Le présent projet vise maintenant à allier ces 2 méthodes aujourd'hui maîtrisées.

Pour cela nous induirons des infarctus transitoires ou permanents chez 7 souris : pour 3 d'entre elles un fil sera noué autour de l'artère coronaire et pour les 4 autres le fil sera noué puis relâché après 45min afin de mimer au mieux les 2 situations possibles chez l'homme. L'imagerie cardiaque sera réalisée avant l'infarctus puis régulièrement au cours des 4 semaines suivant l'infarctus. Cette technologie permet d'évaluer des paramètres cardiovasculaires morphologiques et fonctionnels de

façon répétée chez le même animal réduisant ainsi drastiquement le nombre d'animaux mis en œuvre.

Notre objectif est de déterminer si les modifications cardiaques induites par l'infarctus permettent toujours d'évaluer la fonction cardiaque par imagerie. Une zone du cœur va former une cicatrice suite à l'infarctus et modifier profondément la morphologie cardiaque. Il est donc impératif avant de lancer un programme de recherche plus important, de vérifier sur un petit nombre d'animaux qu'il est toujours possible d'évaluer différents paramètres cardiaques par imagerie non invasive.

Un total de $n=7$ souris est donc prévu.

La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R. Tout d'abord, en comparaison avec une étude classique qui nécessite la mise à mort des animaux à chaque point de temps examiné, l'imagerie nous permet de répéter l'imagerie à différents temps et donc de réduire le nombre d'animaux d'autant. Le raffinement a été pris en compte : la totalité des procédures impliquant les animaux (infarctus, injection intraveineuse et imagerie) est réalisée sous anesthésie suivie d'un réveil sous lampe chauffante réduit l'inconfort potentiel à son minimum. L'utilisation d'analgésiques est également prévue après l'infarctus. Dans le cas où il serait impossible de suivre les animaux par imagerie, le protocole prendra fin de manière anticipée. L'étude du fonctionnement cardiaque rend la règle de remplacement difficilement applicable puisqu'il est nécessaire de l'étudier dans son environnement nerveux et hormonal.

18247 L'arthrose, maladie dégénérative articulaire la plus répandue, est caractérisée par une érosion du cartilage, la formation d'ostéophytes, une sclérose osseuse sous-chondrale et une inflammation synoviale. L'arthrose est également couramment décrite comme la conséquence d'une perturbation de l'homéostasie des tissus cartilagineux. Le vieillissement étant l'un des principaux facteurs de risque de l'arthrose, nous proposons de tester des facteurs anti-âge pour le traitement de cette maladie. Parmi les facteurs anti-géroniques, la protéine alpha-klotho (a-KL) semble être l'un des plus pertinents. Les souris hypomorphes pour a-KL présentent un vieillissement prématuré, plusieurs polymorphismes du gène a-KL sont associés à un risque accru d'arthrose et des niveaux différents d'ARNm d'a-KL ont été rapportés entre le cartilage articulaire sain et arthrosique. Par ailleurs, des diminutions d'a-KL semblent impliquées dans plusieurs autres maladies liées à l'âge. Lors de premières expérimentations nous avons montré qu'a-KL diminue avec l'âge dans le cartilage articulaire alors que l'arthrose apparaît. Cependant, le rôle d'a-KL dans la physiopathologie du cartilage articulaire reste inconnu. Dans ce contexte, l'objectif global de ce projet est d'explorer le rôle de la protéine anti-géronique a-KL dans le cartilage articulaire. Pour cela, nous avons généré une souche de souris inductible pour la délétion d'a-KL (Rosa26-KL). Ces souris vont nous permettre d'analyser l'impact de la délétion globale de la protéine a-KL sur le vieillissement du cartilage articulaire. La Procédure n°1 a pour but de déterminer l'impact de la délétion globale d'a-KL sur le vieillissement articulaire et l'apparition de l'arthrose liée à l'âge. Pour cela, a-KL sera délété chez des souris jeunes (3 mois), des souris d'âge moyen (6 mois) et des souris vieilles (12 mois). L'impact de la délétion d'a-KL sur le vieillissement articulaire sera évalué 1 mois, 3 mois et 6 mois après délétion. Pour cela, les souris issues de la procédure 1 seront sacrifiées selon la procédure n°2 via une ponction intracardiaque terminale puis les pattes, le rachis, la tête, l'appendice xyphoïde et les reins seront prélevés pour évaluer le niveau d'arthrose par des analyses moléculaires, radiologiques, histologiques et immunohistochimiques et pour l'analyse des concentrations sériques de la protéine a-KL par dosage ELISA.

Ce projet prend en compte la règle des 3R en appliquant les consignes suivantes :

- Je réduis le nombre d'animaux en utilisant le nombre minimal requis pour chaque type de test afin d'atteindre une significativité statistique. La procédure n°1 utilisera un total de 990 souris répartis en groupe de 15 souris par sexe (mâle et femelle), par âge d'induction (3, 6 et 12 mois) et temps d'analyse post délétion (1, 3 et 6 mois) et par phénotype étudié (sauvage (WT), Rosa26-KL hétérozygote (HE) et Rosa26-KL homozygotes (HO)) auxquelles s'ajoutent deux groupes contrôles de 5 souris par sexe (mâle et femelle), par âge d'induction (3, 6 et 12 mois) par temps d'analyse (1, 3 et 6 mois) permettant de vérifier l'effet du tamoxifène seul et l'effet de l'expression de la recombinase Cre. Cette saisine nécessitera donc un total de 990 souris. La procédure n°2 concerne

également les souris de la procédure n°1 et n'utilisera pas d'animaux supplémentaires. Ainsi, le nombre d'animaux total pour cette saisine s'élève à 990.

- Je raffine en réduisant la douleur lors des expérimentations afin d'améliorer la reproductibilité et la qualité de l'expérimentation. Les souris seront hébergées en groupe sociaux à raison de 5 souris par cage avec de l'enrichissement. Les souris seront observées 1 fois par semaine jusqu'à la fin de l'expérimentation. Par ailleurs, des points limites ont été identifiés et les procédures de raffinement à mettre en place lors de l'atteinte de ces points limites ont été décrites.

- Malheureusement, je ne peux pas remplacer cette expérimentation animale par un modèle in vitro, car cette étude vise à déterminer l'impact de l'invalidation d'un gène sur l'apparition de l'arthrose liée à l'âge.

18248 La mémoire épisodique est un type de mémoire qui permet de former des souvenirs de nos expériences personnelles associées à un ou des événements spécifiques. Elle fournit la capacité de se remémorer cette expérience mais aussi les émotions et le contexte spatial et temporel associés à cette expérience.

Il est important de caractériser les mécanismes neurobiologiques de la mémoire à la fois pour le bénéfice de nos connaissances (comment des capacités cognitives et mentales peuvent-elles émerger d'un organisme biologique) mais aussi pour comprendre par quels processus ces systèmes de mémoire peuvent être dévoyés dans certaines conditions pathologiques et traumatiques (telles que le trouble de stress post-traumatique (PTSD), dans lequel les patients sont confrontés aux rappels involontaires et intrusives d'événements aversifs et traumatiques) et ouvrir éventuellement de nouvelles voies de traitement.

Une des caractéristiques les plus frappantes de la mémoire épisodique est sa capacité à associer différentes traces mnésiques dans un seul et même épisode (association temporelle). Dans le cerveau, une région, l'hippocampe, a été identifiée comme une structure cérébrale cruciale pour cette association temporelle : les événements partageant une certaine proximité temporelle induisent une activité des neurones de l'hippocampe plus similaire que des événements plus éloignés dans le temps, et cela même si ces derniers partagent des similitudes contextuelles ou sensorielles.

Ainsi, dans ce projet, nous posons l'hypothèse qu'un phénomène associé à la plasticité cérébrale (le tagging et la capture synaptique STC) est impliqué dans l'association temporelle de mémoires épisodiques.

Pour cela, nous utiliserons une nouvelle technologie de pointe, un système implantable intégrant un miniscope à fluorescence ultraminiaturisé permettant de visualiser simultanément l'activité de plusieurs centaines de neurones chez la souris lors de tâches d'apprentissage.

Cette technologie nous permettra de tester l'existence de ce phénomène lors d'un apprentissage ainsi que son implication dans l'association temporelle de souvenirs. Pour cela, nous étudierons alors l'activité de neurones de l'hippocampe afin de voir comment ils sont engagés dans 2 expériences différentes (environnements A et B) proches dans le temps. Pour tester l'existence et l'implication de la STC, nous nous appuierons sur l'enregistrement de ces neurones avec et sans inhibition de la STC (induite par inhibition de la synthèse protéique, grâce à l'administration préalable d'anisomycine, un antibiotique).

Pour cette expérimentation 96 souris (mâles et femelles) maximum seront utilisées.

Raffinement : les populations neuronales enregistrées par cette méthode sont ciblées à l'aide de promoteur génétique permettant d'enregistrer spécifiquement ces types de neurones (réduisant toutes possibilités d'erreur d'identification). Les conditions d'élevage des animaux seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu (cabanes plexiglass et cartons, tubes).

Les injections/implantations intracérébrales se feront sous anesthésie générale par des chercheurs formés et expérimentés. Les animaux recevront un traitement analgésique avant l'intervention, un traitement anti-inflammatoire après l'intervention et 24 heures après. Si nécessaire un traitement

antibiotique sera administré. Chaque animal est placé sur une couverture thermorégulée pour éviter toute hypothermie. Les cornées sont protégées de la déshydratation. L'anesthésie gazeuse est ici privilégiée pour mieux contrôler la profondeur d'anesthésie et pour une meilleure récupération post-opératoire. Une surveillance post-opératoire d'une semaine est réalisée pour suivre chaque souris et intervenir si nécessaire.

Remplacement : aucune méthode alternative in vitro n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée.

Réduction : Le protocole permet d'utiliser chaque animal comme son propre contrôle permettant de réduire les effectifs. Ceux-ci sont calculés de manière à permettre une réduction des effectifs optimisée permettant de suivre les recommandations éthiques d'obtenir une puissance statistique de 0.8 avec un minimum d'animaux.

18249 Les troubles du spectre autistique (TSA) sont caractérisés par des troubles de l'interaction sociale, des comportements répétitifs et stéréotypés. Plus récemment des troubles de la motricité ont été décrits comme étant des symptômes accompagnant aussi cette pathologie. Les tests utilisés couramment chez les rongeurs pour caractériser les TSA sont ceux de l'interactions courtes (quelques dizaines de minutes) entre 3 animaux mais ces tests ont des limites évidentes dans leur capacité de mettre en lumière des déficits qui sont transposables à l'homme. Des approches récentes utilisent la possibilité d'identifier des souris, grâce à des puces individuelles qui émettent un signal radio (rf-ID ou radio frequency identity), de les suivre en groupe (4 souris ou plus) pendant plusieurs jours, 24h/24h.

Les objectifs de ce projet est de déterminer les troubles sociaux en comparant les résultats obtenus par le la procédure dite Live Mouse Tracker (LMT), par rapport aux troubles identifiés par la procédure plus traditionnelle de test à 3 chambres (3-CT) dans un modèle murin des TSA, crée par injection d'acide valproïque (VPA) et.

Les objectifs du projet sont multiples: i) de comparer les paramètres d'interaction sociale détectés par le 3-CT et le LMT ii) d'évaluer le nombre de cellules de Purkinje au sein du cervelet dans le modèle de TSA ; iii) de comprendre l'implication des voies de la transmission synaptique au niveau moléculaire dans le modèle souris VPA en comparaison aux souris contrôles iv) d'identifier des marques épigénétiques spécifiques dans les neurones (ces marques correspondent à des modifications au niveau du génome sans modification du code génétique). Elles sont influencées par l'environnement, dont l'exposition in utero à certains médicaments, et ont un rôle particulièrement important au cours du développement.

Nous avons pris en considération la règle de 3Rs :

Remplacer : L'étude des bases comportementales, cellulaires et moléculaires dans les TSA nécessite la présence de réseaux neuronaux physiologiques et fonctionnels ; ceci est uniquement accessible dans des modèles d'animaux intègres. Il n'est donc pas possible d'utiliser des méthodes de substitution à l'animal entier dans le cadre de cette étude.

Réduire : ce projet nécessitera l'utilisation de 160 souris au maximum (40 mères et 120 descendants), assurant un nombre final d'au moins 30 souris mâles et 30 souris femelles par groupe (traité VPA; et non traité Saline) définit statistiquement pour permettre une analyse robuste de nos résultats expérimentaux.

Raffiner : Nous avons planifié ce projet en gardant à l'esprit la nécessité de réduire, sinon de soulager l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'anxiété des animaux, et dans le but d'obtenir plus d'informations pertinentes à moindre coût en terme de "mal être" animal. Le bien-être des animaux est pris en compte à chaque étape par une surveillance quotidienne des animaux, l'apport d'enrichissement spécifique aux rongeurs dans le milieu et le recours à l'anesthésie générale, additionnée d'une anesthésie locale en présence d'antalgiques.

Cette projet est innovant et a le potentiel de fournir des informations critiques pour la compréhension d'une voie thérapeutique sociétale prometteuse pour les patients atteints de TSA, résultats qui peuvent amener à un meilleur traitement de cette maladie chez l'homme.

18250 Dans les dernières décennies l'obésité a considérablement augmenté dans les pays industrialisés et est responsable de nombreuses pathologies (diabète, hypertension, atteintes vasculaires, . . .). L'homeostasie énergétique est une composante importante de cette affection, l'augmentation de l'apport énergétique et/ou la diminution de la dépense énergétique sont impliquées dans son développement. Certaines thérapeutiques actuelles visent à cibler le tissu adipeux et son rôle dans la dépense énergétique c'est pourquoi cette mesure est importante à effectuer lors d'études de nouveaux traitements contre l'obésité.

Les mesures de dépense énergétique se déroulent dans des cages d'hébergement individuelles, la souris n'est soumise à aucun stress particulier et évolue librement dans son environnement habituel. Un logiciel adapté permet de suivre la consommation en oxygène et la production de dioxyde de carbone, l'activité locomotrice, la prise de nourriture et d'eau. La procédure n'est donc pas contraignante pour l'animal, cependant la mesure requiert que l'animal soit placé seul dans une cage ce qui est un facteur de stress pour ce dernier. Notre étude vise à tester 2 paramètres qui pourraient améliorer le bien être des animaux lors de cette expérimentation:

1) Faire les mesures en mettant 3 animaux dans une même cage et comparer les résultats obtenus à ceux effectués lorsqu'il n'y a qu'un seul animal dans la cage.

2) Ajouter un enrichissement (nid ou refuge) dans la cage lorsque les animaux sont hébergés seuls et évaluer si ces accessoires peuvent avoir une influence sur les résultats, notamment sur les mesures d'échanges gazeux mais aussi de l'activité locomotrice par infra rouge.

- Remplacement:

L'utilisation de l'animal est indispensable car les interactions entre les différents organes impliqués dans le métabolisme ne peuvent être remplacées par des techniques in vitro. De plus, la souris étant l'espèce dans laquelle les mutations génétiques sont les mieux maîtrisées à l'heure actuelle, elle est le modèle de choix pour l'étude des gènes impliqués dans la dépense énergétique.

- Réduction:

Notre expérience a montré qu'en vue de la variabilité des mesures un nombre minimum de 8 souris par groupe est nécessaire pour une analyse statistique des données. Le nombre total de souris pour cette étude sera de 24 mâles et 24 femelles.

Afin de réduire le nombre d'animaux les mêmes souris seront utilisées pour les différentes expérimentations (isolées, isolée avec enrichissement, 3 par cages).

Raffinement:

L'équipement est constitué de cages de mesure de dépense énergétique par calorimétrie indirecte (mesure de la consommation d'oxygène et de la production de dioxyde de carbone). Afin de minimiser le stress des animaux, ces cages sont identiques aux cages d'hébergement. Dans les conditions de mesures habituelles, mis à part l'isolement de l'animal (1 animal / cage), la souris n'est soumise à aucun stress particulier et évolue librement dans son environnement habituel.

Par ailleurs les expériences qui seront réalisées visent justement à raffiner ces mesures par la suite en essayant de valider les mesures avec 3 animaux par cage et/ou en présence d'enrichissement.

18251 Le syndrome de Hutchinson-Gilford (HGPS), ou Progeria, est une maladie génétique rare conduisant à un vieillissement prématuré. Les enfants atteints par cette pathologie présentent des atteintes sévères du système cardiovasculaire responsables d'une mortalité précoce par infarctus du myocarde ou accident vasculaire vers l'âge de 13.5 ans. Cette pathologie est due à une mutation hétérozygote du gène LMNA (p. G608G) conduisant à la production d'une protéine toxique nommée la Progérine. A l'heure actuelle, aucun traitement n'est disponible pour traiter les patients.

Pour réfléchir à de nouvelles pistes thérapeutiques, nous nous intéressons aux liens entre l'accumulation de la progérine et la survenue de la fibrose artérielle conduisant au décès prématuré des enfants atteints de progeria. Nos travaux récents ont permis en particulier de démontrer que cette accumulation de Progérine conduit à des anomalies de la poly ADP-ribosylation (PARylation), une modification post-traductionnelle de certaines protéines consistant à leur adjoindre une ou plusieurs unités ADP-ribose. Nous avons donc mis en place un criblage à haut

débit visant à identifier des composés capables de moduler le métabolisme du NAD⁺, un co-substrat essentiel de la réaction de PARylation. Ce travail a permis d'identifier une molécule capable, in vitro, de restaurer partiellement les anomalies de PARylation dans des cellules issues de patients HGPS. Cet analogue nucléosidique de la thymidine est un antiviral et un antinéoplasique qui a reçu l'approbation en mars 2014 pour une utilisation clinique dans le traitement du cancer colorectal.

Avant de réaliser des tests d'efficacité in vivo et d'envisager un essai thérapeutique sur les patients, nous devons évaluer l'effet du fond génétique des souris LmnaG609G/G609G sur la tolérance à cette molécule et définir les doses maximales tolérées par les souris qui seront ensuite utilisées dans un test d'efficacité.

Pour cette étude, nous avons choisi d'utiliser des souris hétérozygotes LmnaG609G/+ pour la mutation du gène LMNA car elles ont le même fond génétique que les animaux sur lesquels l'efficacité sera testée sans présenter de phénotype de la pathologie ce qui rend leur manipulation plus simple. Au total 16 souris seront utilisées selon une procédure unique à savoir le traitement par voie orale (procédure légère) des animaux LmnaG609G/+ avec 4 doses différentes de la molécule candidate. Le traitement débutera sur des animaux âgés de 1 mois et durera 4 semaines

Les volumes administrés seront conformes aux recommandations actuelles (200 microlitres/20g par voie orale) et les animaux seront évalués quotidiennement jusqu'à deux semaines après la dernière administration puis mis à mort. L'apparition de signes cliniques définis dans nos points limites conduira à la mise à mort immédiate de l'animal concerné.

Cette étude sera réalisée dans un établissement utilisateur agréé et les souris seront manipulées et suivies par du personnel compétent. Les animaux seront hébergés dans des salles dont les paramètres d'ambiance sont contrôlés (température : 22-24°C ; renouvellement d'air : 15 fois/heure ; éclairage artificiel : 12h jour/12h nuit). Afin de respecter leur instinct grégaire, les souris seront stabulées par groupe de 3 à 5 animaux dans des cages dont l'environnement est enrichi à l'aide de maisonnettes en carton. Les animaux feront l'objet d'une surveillance quotidienne afin de détecter précocement les points limites de souffrance.

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

- Remplacer : notre projet se fera dans la continuité d'une étude in vitro. Le passage au modèle in vivo est une étape indispensable avant d'envisager un essai thérapeutique chez l'Homme.
- Réduire : Le nombre d'animaux a été limité au minimum nécessaire pour mettre en évidence une apparition d'effets secondaires liés à l'utilisation de notre molécule et obtenir des résultats de pharmacocinétique interprétables.
- Raffiner : afin d'améliorer le bien-être animal au cours de notre étude, les besoins physiologiques des animaux seront respectés (nourriture ad libitum, cages propres, enrichissement, stabulation en groupe). Des points limites clairs seront définis et les animaux seront euthanasiés lorsqu'ils atteindront les critères d'interruption.

18252 Le psoriasis est une maladie inflammatoire de la peau qui se caractérise par des plaques bien délimitées, rouges, en relief, et recouvertes de squames blanchâtres. Cette maladie chronique, non contagieuse, évolue par cycles, avec des périodes de rémission. L'étendue de la maladie varie considérablement d'une personne à l'autre et peut être très désagréable ou même douloureuse. Le psoriasis touche 2 à 3 % de la population mondiale. En France, 1. 5 à 3 millions de personnes seraient concernées.

Les causes de la maladie ne sont pas bien identifiées et son origine exacte reste inconnue. Le psoriasis est une maladie chronique qui ne se guérit pas, il est cependant possible de la contrôler, voire d'obtenir de longues périodes de rémission. C'est pourquoi l'étude de nouvelles molécules thérapeutiques est nécessaire.

La phase préclinique qui consiste à l'étude de l'action des agents pharmacologiques in vivo chez le rongeur est une étape essentielle dans le développement de médicaments. Ce projet a pour but de tester de nouveaux médicaments à visée anti-inflammatoire permettant de diminuer ou d'inhiber le développement de la maladie. Le psoriasis est induit par application cutanée d'une crème, l'Aldara®

contenant de l'Imiquimod (IMQ). Cette crème permet l'assèchement progressif de la peau, conduisant à un érythème puis à la desquamation de cette dernière. Les animaux vont ressentir un tiraillement au niveau de la peau ainsi qu'une légère démangeaison. Les animaux seront ensuite mis à mort au bout de 8 jours après induction de la maladie pour analyser différents paramètres immunologiques. Ceci permettra d'étudier l'efficacité des molécules testées sur le développement de la maladie (signes cliniques) et de l'inflammation. Les molécules à tester peuvent être sous forme liquide et administrées par voie orale, intrapéritonéale, intraveineuse, sous-cutanée ou cutanée, ou sous forme de crème administrée par voie cutanée. L'IMQ étant sous forme de crème, si le composé à tester est également une crème, elles seront étalées sur le dos et les oreilles des animaux avec 1 à 2h entre chaque application. Les molécules à tester pourront être administrées en préventif (1h à 15 jours avant induction de la maladie) ou en curatif (au moment ou après induction de la maladie). L'animal utilisé est la souris C57BL/6 ou BALB/c. L'application de la crème IMQ à l'animal se fait par voie cutanée. Ce modèle induit des prurits à l'animal, liées au développement de la pathologie. Une surveillance quotidienne des animaux est effectuée pendant la période d'acclimatation et d'expérimentation. Les animaux sont hébergés par 5 maximum dans des cages de 530 cm² à fond plein sur portoir ventilé (selon les normes d'hébergement détaillées dans l'annexe II de l'arrêté relatif à l'agrément des EU). Les animaux seront mis à mort selon la réglementation en vigueur.

Le projet représente un ensemble d'études types. Le nombre d'études réalisées durant la période de validité de l'autorisation dépendra du nombre de molécules à tester. Le projet pourra comporter jusqu'à 20 études comprenant 90 animaux, soit 1800 animaux maximum sur 5 ans.

A ce jour, l'animal de laboratoire reste le seul recours fiable et pertinent permettant de tester des nouvelles molécules thérapeutiques ciblant le psoriasis. Ce projet sera réalisé en respectant les principes fondamentaux de l'expérimentation animale :

Remplacement : le modèle animal est fondamental dans notre cas, puisque l'étude de l'inflammation et de la pathologie ne peut se faire que sur un organisme vivant entier.

Raffinement : les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être et d'éviter au maximum la douleur au moment de l'expérimentation grâce à l'utilisation d'une grille de score clinique comprenant des points limites prédictifs et adéquats tels qu'un point limite impliquant l'utilisation de doliprane pour les souris ne recevant pas la molécule à tester. Mais aussi l'utilisation d'anesthésique afin de ne pas stresser l'animal durant l'épilation.

Réduction : le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement pertinents et reproductibles, évitant ainsi de refaire plusieurs fois les mêmes expérimentations.

- 18253**
1. Intitulé du projet : Contribution des stocks de glycogène astrocytaires au soutien métabolique de l'activité neuronale dans le cerveau sain chez le rat (EU1/2 porteur)
 2. Durée du projet : 48 mois
 3. Mots-clés : métabolisme, glucose, lactate, neurone, cellule gliale
 4. Finalité du projet : recherche fondamentale
 5. Objectifs et bénéfices escomptés du projet

La compréhension du métabolisme énergétique du cerveau sain ou affecté par une pathologie est une priorité en recherche fondamentale. Ce projet vise à comprendre comment le cerveau dispose de ses réserves énergétiques pour entretenir l'activité de ses neurones. Une grande partie des réserves énergétiques de l'organisme se présente sous la forme de glycogène, un glucide complexe stocké principalement dans le foie et le muscle et qui peut être transformé rapidement en glucose en cas de demande énergétique. Le cerveau possède aussi des stocks de glycogène en quantité limitée, mais situés au plus près des neurones dans les cellules gliales, appelées astrocytes. La façon dont ces stocks sont mis en jeu pour soutenir l'activité neuronale est encore largement inconnue. Ce projet déterminera dans quelle mesure les stocks de glycogène sont recrutés pour alimenter l'activité neuronale dans deux conditions représentant une épreuve énergétique : le passage d'une vague de dépolarisation corticale et la stimulation électrique des neurones de

l'hippocampe. Dans une première procédure mise en oeuvre chez le rat anesthésié sans réveil, une vague de dépolarisation sera déclenchée au niveau du cortex et les concentrations de glucose, lactate et oxygène seront monitorées seconde par seconde en condition contrôle ou après blocage du recrutement des stocks de glycogène. Dans une deuxième procédure également sous anesthésie sans réveil, les niveaux de lactate seront monitorés au niveau de l'hippocampe pour déterminer l'effet d'une stimulation électrique avec et sans recrutement des stocks de glycogène. Notre hypothèse est que le cerveau puisera dans ses réserves de glycogène, conduisant ainsi les astrocytes à libérer du lactate. Ce lactate serait ensuite mis à disposition des neurones qui le transformeraient en pyruvate puis en dioxyde de carbone en consommant de l'oxygène. Cette hypothèse sera vérifiée grâce à des microélectrodes sensibles au lactate, au glucose ou à l'oxygène, implantées dans le cerveau de rats anesthésiés et chez qui l'activité des neurones sera stimulée expérimentalement. Ce projet permettra de mieux comprendre le métabolisme cérébral et notamment la gestion des ressources énergétiques lors de l'activation d'un groupe de neurones.

6. Nuisances prévues

Au total, 50 rats mâles et femelles seront utilisés dans ce projet pour monitorer les niveaux de glucose, lactate et oxygène dans le cerveau. Ils seront anesthésiés pendant 3-5h puis mis à mort à la fin de la procédure expérimentale sans qu'ils aient pu se réveiller. Les effets indésirables sur l'animal sont donc limités.

7. Application de la règle des «trois R»

7. 1. Réduction du nombre d'animaux : ce projet impliquera 50 rats adultes mâles et femelles. Le nombre d'animaux utilisés au cours du projet est maintenu à un niveau minimal permettant des analyses statistiques nécessaires à l'établissement de conclusions fiables.

7. 2. Raffinement du protocole expérimental : les animaux inclus dans ce protocole seront traités contre la douleur avec des analgésiques locaux et systémiques, les enregistrements seront réalisés sous anesthésie générale sans réveil. Pendant les jours précédant l'expérience, les animaux seront hébergés en groupe avec nourriture et boisson à volonté.

7. 3. Remplacement par des procédures in vitro : Le recours à l'animal ne peut pas être entièrement remplacé dans l'état actuel de nos connaissances. La régulation des stocks de glycogène et des niveaux de glucose, lactate et oxygène passe par une interaction entre le cerveau et le système vasculaire qui ne peut pas être modélisé sur des préparations in vitro, nécessitant ainsi le recours à l'animal.

18254 Contexte scientifique et objectifs de l'étude :

Ce projet de recherche d'envergure vise une étude de l'effet d'une espèce non-indigène envahissante, le silure glane, sur des populations de poissons indigènes sensibles, les migrateurs amphihalins du bassin de la Loire.

De nombreux partenaires et compétences de pointe seront mobilisés afin d'apporter un éclairage nouveau en termes de comportement, de physiologie, de métabolisme et d'écologie sur cette espèce mal connue, notamment sur son impact probable sur les populations de migrateurs amphihalins, dont de nombreuses espèces bénéficient d'un statut de protection. Cette étude fait suite à une demande expresse du cabinet du préfet, suite à l'observation ces dernières années d'une explosion du nombre de silures observés sur la zone. Même si des études précédentes ont déjà été réalisées sur d'autres bassins versants, notamment du sud de la France, de grandes différences dans les écosystèmes et les niveaux de population et d'assimilation des silures rendent impossibles les extrapolations des résultats issus de ces sites lointains. Ce projet de recherche devra découler sur des propositions concrètes de mesures de gestion, qui pourront intervenir sur les périodes, les lieux et les tactiques de prédation.

Cette étude sera décomposée en deux parties :

Dans la première partie, l'impact direct des silures sur les populations de migrateurs amphihalins sera étudié, à travers un suivi en télémétrie acoustique. Cet outil devient depuis quelques années l'outil de référence pour le suivi d'individu en milieu aquatique. Cet impact sera étudié sur une large

zone (plus de 40 km de linéaire), comprenant des zones d'habitats fonctionnels variés. Ce site d'étude comprendra aussi des zones plus ou moins anthropisées, avec un point focal sur trois barrages. Des marques acoustiques de type « prédation », capables de détecter des événements de prédation, seront utilisées, permettant de définir avec précision si et quand la prédation a eu lieu. Plusieurs espèces d'amphihalins seront marquées, en fonction des capacités d'approvisionnement et du niveau de recrutement au moment de l'étude (lamproies, anguilles, mulets). Les stades en migration (de reproduction ou trophique) seront sélectionnés car ce sont les plus sensibles en raison d'une perte de vigilance liée à leurs niveaux hormonaux et physiologiques. En tout, il est prévu de marquer 160 lamproies marines, 80 anguilles européennes au stade argenté et 40 mulets porc. Compte tenu des forts taux de prédation déjà observés sur d'autres bassins versants (80, voire parfois 100 % localement), cet effectif sera suffisant pour évaluer la prédation des amphihalins par les populations de silure.

La seconde partie de l'étude vise à améliorer les connaissances sur la population de silure glane de la Loire. Le comportement alimentaire des silures sera analysé afin d'estimer précisément de manière qualitative (quantité d'amphihalins consommé par silure) et quantitative (la répartition et la part des amphihalins dans le régime alimentaire des silures) la pression de prédation du silure sur les populations de migrateurs amphihalins. Les déplacements seront analysés via un suivi télémétrique sera effectué sur 40 silures adultes et 40 silures juvéniles. Ce suivi serait le premier sur cette espèce avec cette technologie, cet effectif sera donc suffisant pour donner des résultats significatifs. L'aspect trophique sera étudié pour définir le régime alimentaire du silure et sa composition quantitative afin en particulier d'estimer la contribution des amphihalins au régime alimentaire.

Balance dommages/bénéfice :

Le nombre total d'animaux utilisés dans le cadre de ce projet sera de 360 animaux. Aucun amphihalins ni silure ne sera sacrifié. Tous les poissons marqués seront immédiatement relâchés dans le milieu naturel, et notre expérience et les nombreuses études dans le domaine ont montré que les taux de mortalité post-opératoire sur ces espèces étaient quasiment nuls. De plus, tous les individus marqués seront des géniteurs semelpares, c'est à dire que même sans notre marquage ils seront destinés à mourir dans les jours / semaines / mois à venir. Il n'y a donc aucun dommage sur ces espèces, et le gain potentiel est considérable car des mesures de gestion concrètes découleront de cette étude.

Pour les silures, aucun animal ne sera sacrifié pendant l'étude. De plus, cette étude pourra entraîner des mesures de gestion visant à contrôler cette espèce.

Conformité avec la règle des 3 R :

Cette étude vise à étudier l'impact d'une espèce prédatrice sur d'autres espèces. Il faut donc travailler sur des individus sauvages, en milieu naturel. Il est donc impossible de les remplacer.

Nous avons déterminé la taille minimale des échantillons de chaque espèce en fonction des études précédentes, et du minimum requis pour pouvoir avoir des données fiables et robustes sur lesquelles nous pourrions nous appuyer.

Enfin, absolument toutes les mesures nécessaires seront prises afin de limiter au maximum la douleur et le stress chez nos individus, ce qui de toute façon compromettrait énormément cette étude comportementale. Une attention toute particulière sera aussi apportée à la prophylaxie afin d'éviter des pertes prématurées d'individus étudiés. Aucune mortalité n'a jamais été observée dans toutes les études précédentes avec la même méthodologie.

18255 Suite du dossier 01648 autorisé le 29/04/2015.

Ce projet présente la possibilité d'étudier in vivo l'allergénicité de préparations alimentaires pour personnes allergiques ou à risque d'allergie au lait chez des souris Balb/c rendues allergiques au lait. Il permet également de soutenir l'allégation de santé « réduction du risque d'allergie aux protéines de lait » régit par la directive européenne 2013/46/UE modifiant la directive 2006/141/CE, qui prévoit une étude chez l'animal pour tester l'allergénicité de préparations pour nourrissons.

De précédentes expériences nous ont permis d'optimiser notre protocole (Raffinement). Notre étude statistique nous indique qu'utiliser 96 souris (6/produit + 3/contrôle) est nécessaire et suffisant (Réduction). Au maximum, 96 souris seront engagées par protocole, à raison de 2 à 3 protocoles chaque année, 1440 souris maximum seront impliquées dans ce projet. Le dosage d'anticorps est possible in vitro, mais il ne renseigne que sur leur quantité et non sur leur fonctionnalité (Remplacement).

Toutes les souris seront identifiées par une bague à l'oreille. Plusieurs prélèvements sanguins seront effectués afin de récolter du sérum dans lequel se trouvent les anticorps. Les souris subiront des gavages afin de les sensibiliser aux allergènes. Les souris seront ensuite provoquées par voie intrapéritonéale afin de provoquer une allergie, durant cette période, les symptômes transitoires (grattements, piloérection, ventre rentré), la température corporelle et la fréquence respiratoire seront mesurés. Ces sont des paramètres visuels et mesurables, qui permettent de déterminer si la souris est effectivement allergique ou non. Ces symptômes sont temporaires, et s'estompent généralement en 1h après l'induction de l'allergie. Si de tels symptômes sont toujours présents après la provocation, la souris serait mise à mort selon une méthode éthique.

Les souris seront hébergées dans une cage adaptée et enrichie, elles auront accès à l'eau et à la nourriture. Elles seront maintenues dans un cycle jour/nuit de 12h, à une température et une hygrométrie comprise entre 20 et 24°C ; 35 et 75% d'humidité. Un contrôle visuel sera effectué quotidiennement. Un tableau de scoring a été déterminé. En cas d'observation d'un symptôme de score 3 tel que piloérection, étirements, prostration (hors provocation allergique), la souris serait mise à mort selon une méthode éthique.

18256 L'objectif de ce projet est de décrire tous les gestes techniques utilisés dans le cadre de formation et d'entraînement. Dans le but d'assurer une traçabilité complète de l'apprentissage des gestes techniques réalisés sur des animaux de réforme ou animaux commandés, le présent projet vise à décrire des méthodologies et des gestes techniques.

Les animaux ici utilisés seront des souris, rats et hamsters destinés à être euthanasiés car exclus d'autres études ou commandés spécifiquement pour la formation et l'entraînement. Ils suivront cependant le même processus de traçabilité que les animaux en étude. L'apprentissage se fera par encadrement d'une personne compétente et formée.

Dans ce projet, nous utiliserons des mâles à des âges variés.

Toutes les injections se feront avec des solutions injectables type sérum physiologique. Les volumes de prélèvements de sang seront effectués selon le poids de l'animal aux fréquences respectant sa physiologie et la réglementation. Les gestes techniques seront réalisés sur souris, rats et hamsters. L'utilisation de ces 3 espèces est essentielle car même si la méthodologie de la technique reste la même, la préhension, la contention, le comportement animal et sa manipulation varient pour l'expérimentateur. La fréquence des gestes sera réalisée en fonction des besoins de formation et en fonction de l'état des animaux (temps de récupération entre 2 prélèvements par exemple).

Ce projet comporte 5 procédures et va nécessiter sur 5 ans, l'utilisation de 2400 animaux (soit 1200 souris, 600 rats et 600 hamsters).

1) Administrations : par voie intra-péritonéale (abdomen), sous-cutanée, voie intraveineuse (caudale et rétro-orbitaire) et gavage

2) Prélèvements de sang : sinus rétro-orbitaire, mandibulaire, veine caudale, sublinguale, saphène (patte) et jugulaire

3) Implantation de pompes sous la peau

4) Pose de cathéter à demeure dans la veine fémorale et ou la veine jugulaire

5) Prélèvements terminaux de sang et d'organes

Ce projet s'inscrit dans la règle des 3Rs :

- Réduction : Le nombre d'animaux pour maîtriser une technique a été réduit au maximum. Il a été estimé en fonction du retour d'expérience et également du besoin par rapport à la technique à

maîtriser. Chaque animal ne subira pas l'intégralité des procédures décrites ci-dessus. Les animaux en procédures légères, si l'état clinique le permet, passeront en procédure 3 ou 4. En revanche, si leur état ne le permettait pas, ils seraient uniquement utilisés pour la procédure 5.

- Raffinement : Les procédures décrites dans ce projet sont choisies et réalisées de manière éthique afin de réduire ou supprimer la douleur des animaux. Tous les animaux sont hébergés dans des cages aux dimensions adaptées et complémentées d'enrichissement en accord avec la législation européenne. Les animaux sont suivis quotidiennement et pesés à minima une fois par semaine afin d'identifier au plus tôt un état clinique anormal. Le manque de maîtrise des techniques peut engendrer un stress ou une douleur et occasionner un biais dans les résultats. La reproductibilité des expérimentations permet de réduire le nombre d'animaux à utiliser pour valider certains modèles.

- Remplacement : il ne peut pas s'effectuer malgré l'existence d'animaux en plastique. En effet, il est nécessaire de s'entraîner en "conditions réelles" afin d'appréhender au mieux l'animal vivant (réaction, fausse route, poids et texture, etc.).

Le suivi du bien-être animal sera effectué quotidiennement par un personnel compétent. Les animaux sont pris en charge dès leur entrée par la Structure du Bien-Etre Animal et le vétérinaire référent au quotidien. Les points limites sont définis en fonction des procédures réalisées :

Pour les procédures 1 et 2 : hyperactivité, agressivité, saignements ou écoulements, perte de poids >20%, prostration et apathie.

Pour les procédures 3 et 4 : saignements très importants pendant la chirurgie, difficultés de réveil, problème de cicatrisation au niveau de l'incision, hyperactivité, agressivité, saignements ou écoulements, perte de poids, prostration et apathie.

Tout signe clinique sera signalé au vétérinaire référent qui prendra les décisions nécessaires sur le devenir des animaux.

18257 Cet enseignement pratique a pour objectif d'initier les étudiants à l'expérimentation animale, en leur apprenant les gestes de base tout en respectant le bien-être animal.

Pendant la séance de travaux pratiques (TP), les étudiants, étroitement encadrés par des enseignants, apprendront, tout d'abord, les techniques de contention sur rat vigile. Ensuite, après une démonstration réalisée par les enseignants, les étudiants s'initieront à la pose de canule/cathéters chez des rats anesthésiés : une canule sera insérée dans la trachée pour faciliter la respiration, un cathéter sera inséré dans une artère pour mesurer la pression artérielle et un autre cathéter sera inséré dans une veine, afin d'effectuer l'injection de produits. Au cours de cette étude, les animaux recevront successivement par voie intraveineuse 6 molécules agissant sur le système nerveux autonome (SNA) sympathique et 4 molécules sur le SNA parasympathique. Ces molécules sont très bien décrites et leur administration n'induit pas de phénotype dommageable. Ces expérimentations permettront aux étudiants de mettre en évidence les mécanismes d'action de ces substances et d'observer leurs effets sur la pression artérielle et la fréquence cardiaque, tout en respectant le bien-être animal.

Ce TP sera réalisé en respectant la règle des « 3R » (réduire, remplacer, raffiner).

Réduire : Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés, ce TP sera réalisé en binôme (1 rat pour 2 étudiants).

Raffiner : Les enseignants feront dans un premier temps une démonstration détaillée de tous les gestes que les étudiants devront acquérir et ensuite ils encadreront étroitement la réalisation de ces gestes par les étudiants. L'objectif étant que les étudiants acquièrent ces gestes de base et de les sensibiliser aux variations expérimentales, aux biais, ainsi qu'au stress induits chez l'animal par des gestes mal préparés et mal réalisés. Afin d'assurer le bien-être animal, l'analgésie et l'anesthésie seront contrôlées pendant toute l'expérimentation. La mise en place de points limites et l'observation du comportement des animaux permettront d'identifier toute souffrance et douleur, et d'entraîner une mise à mort anticipée, si nécessaire. Concernant l'hébergement, l'eau et la nourriture seront fournies à volonté.

Remplacer : L'objectif de ce TP étant d'initier les étudiants à l'expérimentation animale, en leur apprenant les gestes de base, il ne peut donc en aucun cas être remplacé par des modèles in vitro ou autres.

En 5 ans, cet enseignement pratique nécessitera l'utilisation de 281 rats.

18258 L'addiction à la cocaïne et à d'autres psychostimulants représente un enjeu de santé publique majeure. Le développement et la persistance de comportements de dépendance découlent d'une interaction complexe de gènes et de l'environnement. Au cours des dernières années, des études suggèrent que le microbiote intestinal pourrait avoir un impact considérable sur le neurocomportement via l'axe microbiote intestin-cerveau. Plus récemment des études mettent l'accent sur le rôle du microbiote sur les addictions aux drogues d'abus (principalement l'alcool). Nous souhaitons dans le cadre de ce projet caractériser le rôle du microbiote intestinal sur les effets addictifs de la cocaïne dans un modèle murin.

Cette étude utilise un modèle comportemental permettant de mimer chez le rat les effets positifs laissés par la drogue dans un environnement précis. Les études d'expression de gènes se feront dans une structure cérébrale de petite taille ce qui nous impose de travailler chez le rat afin d'avoir des quantités de matériel biologique suffisantes.

Nous satisferons aux exigences de la règle des «3R » (réduire, raffiner, remplacer). Réduire, en limitant strictement le nombre d'animaux à celui nécessaire à la validité statistique des résultats obtenus. Raffiner, en limitant au maximum le stress et la douleur des animaux au cours des expériences (définition de points limites au-delà desquels les animaux seront euthanasiés). Remplacement, à l'heure actuelle, il n'existe pas de méthode de remplacement permettant de reproduire in vitro la complexité du cerveau, ce qui rend l'utilisation d'un modèle animal indispensable à la réalisation de ce projet.

Notre projet est prévu pour durer 5 ans. Il nécessite 600 rats - repartis en 10 différents lots (un lot par probiotique testé). Les animaux recevront les probiotiques par voie orale et ensuite des administrations intrapéritonéales de la cocaïne pour suivre leur comportement dans le modèle d'addiction permettant d'associer les effets renforçants d'une drogue à un environnement. Les cerveaux seront prélevés après euthanasie pour des études moléculaires afin d'analyser l'impact du traitement aux probiotiques sur l'expression des gènes du cerveau.

À terme, les résultats de ces travaux nous permettront de mieux comprendre les liens comportement, gènes cérébraux et microbiote intestinal dans l'addiction à la cocaïne et de démontrer qu'une intervention sur le microbiote pourrait être une stratégie thérapeutique intéressante pour traiter les cocaïnomanes.

18259 La présence de caillots dans les prélèvements sanguins est un problème fréquemment rencontré en biologie médicale chez de nombreuses espèces animales domestiques et de laboratoire. La souris est une espèce particulièrement sensible au phénomène d'agrégation plaquettaire et la présence de caillots dans les spécimens sanguins est un problème récurrent dans les laboratoires. Diverses molécules anti-agrégantes ont été étudiées chez l'homme et chez l'animal et parmi elles, les prostaglandines se sont révélées prometteuses pour empêcher ou limiter la formation d'agrégats plaquettaires in vitro.

Dans le cadre d'une étude visant au raffinement d'une procédure (remplacement d'un myélogramme terminal par une prise de sang non terminale) chez la souris greffée avec des cellules cancéreuses humaines, nous avons été confrontés aux difficultés liées à la formation de nombreux caillots et agrégats plaquettaires dans les spécimens sanguins. Il nous a donc paru essentiel de standardiser les conditions d'obtention d'un échantillon sanguin de qualité sur la souris avant de les appliquer aux souris greffées en application de deux des trois principes des 3Rs: la réduction et le raffinement, le remplacement étant impossible dans ce cas. En effet, l'optimisation et la standardisation des prélèvements sanguins chez la souris constitue une bonne pratique de laboratoire qui permettra à terme d'éviter de futures expérimentations inutiles et donc de réduire le nombre d'animaux.

Une étude préliminaire visant à évaluer l'effet d'un analogue de la prostaglandine (Iloprost) sur l'agrégation plaquettaire dans le sang total lors d'un prélèvement terminal à la veine cave caudale chez la souris a montré des résultats décevants avec persistance d'agrégats plaquettaires in vitro. Il nous paraît donc adéquat d'associer cet analogue à un antagoniste plus puissant: l'eptifibatide (Integrilin ND).

Les objectifs de notre étude visent à évaluer l'effet de l'Iloprost et de l'Integrilin sur l'agrégation et l'activation plaquettaires dans le sang total lors d'un prélèvement terminal à la veine cave caudale chez la souris, lorsque le sang est prélevé sur trois anticoagulants différents: l'EDTA, l'hirudine et l'héparine. Un groupe de 64 souris, divisées en trois lots subiront un prélèvement sanguin sous anesthésie générale puis seront sacrifiées sans être réveillées, compte tenu du volume de sang prélevé, incompatible avec le réveil; Toutes les précautions seront prises afin de limiter au maximum l'anxiété des animaux, de leur hébergement à leur anesthésie et cette dernière sera l'assurance de l'absence totale de douleur liée aux prélèvements, en accord avec le principe du raffinement des procédures.

18260 La maîtrise de l'ovulation permet d'augmenter le succès reproductif lors de l'utilisation de l'insémination artificielle chez les animaux de rente. Chez les mammifères, certaines procédures couramment utilisés posent des problèmes d'efficacité et d'acceptabilité. Par exemple, la molécule (PMSG) produite avec des juments gestantes a lourdement fait débat dans les médias au cours de l'année 2019. Le b-NGF et la kisspeptine sont des possibles alternatifs à ces traitements mais leur utilisation telle quelle est trop contraignante et la recherche de molécule de cout de production moindre est essentiel. Nous avons sélectionné deux molécules qui pourraient s'inscrire dans ce cadre. Nous voulons i) vérifier si ces molécules sont capables d'induire l'ovulation, ii) tester si les effets b-NGF passent par l'étage hypothalamique et iii) quel récepteur transfère ses effets. Cette première étude nous permettra par la suite d'envisager le test de nos molécules chez des espèces de rente cible: le mouton et le cheval.

Le protocole proposé s'inscrit dans la règle des 3R :

Remplacer : Nous avons réalisé au préalable des études in vitro qui nous ont permis de déterminer les différentes doses à tester et l'étude du fonctionnement du déclenchement de l'ovulation ne peut se faire que dans un organisme entier.

Réduire: Notre nombre de souris par lots a été basé sur une de nos précédentes expériences qui nous a donnée des résultats tout à fait exploitables statistiquement. Ainsi 256 souris seront étudiés pour ce protocole. Ce nombre d'animaux a été calculé à l'aide d'outils statistiques permettant un calcul juste du nombre d'animaux a placé dans chaque lot.

Raffiner : les souris seront hébergées par quatre et le milieu sera enrichi par la présence d'igloos en carton (boîtes à œufs). Un massage local suivra chaque injection afin de faciliter la diffusion des produits et diminuer la sensation douloureuse. Nous prendrons soin à réaliser alternativement les injections intrapéritonéales à droite et à gauche afin d'éviter la sensibilisation des territoires cutanés concernés. Nous organiserons les injections de façon à stresser le moins possible les animaux en limitant leur sortie de la cage autant que faire se peut.

Avenant: 16 animaux seront requis pour ce protocole et divisé en 2 lots de 8. Ce test nous permettra de renforcer les résultats que nous pourrions obtenir dans le cadre de l'objectif ii et iii décrit précédemment. Le respect des 3R sera suivi de la même façon que précédemment exposé.

Avenant 03-21: L'avancée des expériences initialement décrite nous encourage à réorienter notre méthodologie vers des approches plus descriptive. 20 animaux sont réorientés vers ces approches pour nous permettre de mieux caractériser les systèmes biologiques reliés aux effets de nos molécules. Le respect des 3R sera effectué de la même façon que précédemment exposé.

18261 La fibrillation auriculaire (FA) est le plus commun des troubles du rythme cardiaque, affectant 1 à 2% de la population. En Europe, plus de 6 millions de personnes souffrent de cette arythmie, et sa prévalence devrait croître d'au moins 2. 5 fois dans les 50 prochaines années avec le vieillissement de la population. La FA augmente le risque d'accident cérébral de 5 fois, le risque d'insuffisance

cardiaque de 3 fois, de 2 à 3 fois la probabilité d'une hospitalisation et de 2 fois le taux de mortalité. La fibrillation auriculaire est principalement déclenchée par un dérèglement de l'activité électrique des cellules musculaires de la veine pulmonaire (VP), cette activité électrique pathologique provoque une excitation cardiaque anormale entraînant un défaut de contraction.

Suite au déclenchement des premiers épisodes de FA, des mécanismes complexes de remodelage se mettent en place et contribuent à l'installation progressive et définitive de la pathologie. A ce jour trois grands types de remodelage ont été identifiés sans que l'on sache si une synergie existe entre eux et si elle existe, est nécessaire à l'installation de la FA. Il s'agit des remodelages électrophysiologiques, métaboliques et structurels, dont le développement dans le tissu semble suivre une chronologie et accompagner la progression de la FA, c'est-à-dire le passage de trouble du rythme auriculaire occasionnel à permanent. Le remodelage électrophysiologique étant le premier à se mettre en place suivi du remodelage métabolique puis structurel qui s'accompagne chez le patient d'une FA persistante et difficilement curable. Par conséquent, le but principal du projet est de comprendre comment les différents types de remodelages influencent la progression de la FA. Un des objectifs cliniques étant d'identifier de nouvelles cibles pharmacologiques de la FA. Ce projet consiste à créer un modèle pathologique par l'implantation d'un stimulateur cardiaque chez la brebis afin d'induire la FA et la maintenir sur une période de 60 jours minimum. Ce modèle permettra d'analyser finement l'impact de la FA sur l'électrophysiologie, la fonction et la structure cardiaque (par de l'imagerie non invasive, échocardiographie et IRM) ainsi que sur le métabolisme général et organique. Les retombées scientifiques principales de ce projet seront (i) la caractérisation du remodelage structurel par IRM et histologie, (ii) l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques localisées au niveau sanguins et tissulaires, et (iii) l'identification de coopérations entre les différents remodelages permettant de mieux comprendre la progression de la FA. Pour répondre aux questions d'ordre clinique, des modèles animaux de pathologies humaines et des tissus animaux sont nécessaires, le REMPLACEMENT des animaux n'est actuellement pas possible. En effet, l'étude des mécanismes physiologiques complexes dans leur globalité nécessitent d'avoir recours à un modèle animal et il n'existe pas à ce jour de modèle de modélisation pour répondre aux objectifs. Nous avons fixé une limite maximale de 96 brebis au total. Il s'agit du nombre minimal d'animaux nécessaire à l'obtention de données de qualité exploitable et permettant une analyse statistique fiable, tout en REDUISANT le nombre d'animaux utilisés dans ce projet. Dans cet objectif de réduction, nous ferons en sorte que chaque brebis soit son propre contrôle.

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

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

18262 La fibrose rénale est une conséquence de la plupart des affections rénales chroniques, aboutissant à l'insuffisance rénale terminale. La fibrose rénale est due à une accumulation excessive de matrice extracellulaire dans le parenchyme rénal. Elle survient à la suite d'une lésion rénale, aiguë ou chronique, déstabilisant l'équilibre complexe entre cellules et protéines profibrosantes et antifibrosantes. Quelle que soit l'origine de l'agression tissulaire initiale, les lésions de fibrose s'aggravent en faveur d'un processus final commun responsable de la progression de la maladie. Les mécanismes précis régulant l'apparition de la fibrose ne sont qu'incomplètement élucidés à ce jour et il n'existe pas, pour l'instant, de traitement efficace de la fibrose permettant le retour à un parenchyme rénal normalement fonctionnel une fois que la maladie est installée. Parmi les différents facteurs favorisant le développement d'une fibrose rénale, l'ischémie-reperfusion (IR)

ainsi que l'utilisation de médicaments immunosuppresseurs (après une greffe d'organe par exemple) jouent un rôle important.

L'IR rénale se caractérise par une interruption du flux sanguin au niveau rénal puis une reperfusion. Ce phénomène peut se présenter en clinique lors d'un infarctus du myocarde, d'une occlusion des vaisseaux rénaux, d'un choc septique ou pendant une chirurgie vasculaire ou une transplantation rénale. Dans le cadre d'une chirurgie pour transplantation, il a été démontré que l'utilisation d'immunosuppresseurs aggrave la progression de pathologies rénales préexistantes et induit le développement de la fibrose, conduisant au cours du temps à une insuffisance rénale.

L'objectif de cette étude sera d'évaluer l'effet de candidats médicaments sur la fibrose et sur la perte de fonction rénale. Actuellement, les méthodes alternatives permettant une telle évaluation sont inexistantes et le recours à l'expérimentation animale reste incontournable. La fibrose rénale sera induite chez le rat par une néphrectomie unilatérale (N), une ischémie-reperfusion sur le rein restant (IR) et une administration journalière d'un immunosuppresseur pendant 28 jours (modèle NIRC).

Le nombre d'animaux nécessaire à ce projet sera de 300 rats à raison de 12 animaux par groupe (minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs). Durant toute la période d'expérimentation, l'état général des animaux sera observé tous les jours. Une attention particulière sera apportée lors des traitements des animaux par des candidats médicaments afin de déceler le plus rapidement possible l'apparition d'effets indésirables ou secondaires suite à ces administrations. De plus, si un animal avait des altérations de ces fonctions normales (impossibilité d'uriner, de se nourrir, de boire, de se déplacer), s'il présentait une souffrance/angoisse (vocalisation, prostration, poils hérissé), il serait isolé afin de le réhydrater et de le soigner. Si au-delà de 48 à 72 heures son état ne s'améliorait pas, il serait exclu de l'étude et mis à mort.

Nous avons établi une stratégie d'expérimentation permettant :

- 1) de réduire le nombre d'animaux utilisés, grâce à une méthode de mesure de la fonction rénale non invasive, afin de maintenir en vie les animaux pendant toute la durée de l'expérimentation ;
- 2) de raffiner : dès leur arrivée dans la zone d'exploration fonctionnelle, les animaux seront hébergés dans les conditions définies par la directive européenne 2010/63/UE et un enrichissement de l'hébergement (type play tunnel en polycarbonate, aspen brick) sera introduit auprès de ces derniers ; durant toute la période d'expérimentation, l'état général des animaux sera observé tous les jours par un personnel compétent ; les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie avec maintien de la température corporelle via l'utilisation de plaque chauffante thermostatée.

Aucune méthode de remplacement, permettant de mimer une ischémie – reperfusion rénale, n'existe malheureusement à ce jour in vitro.

Notre stratégie permettra donc de réaliser ce projet selon la règle des 3-R.

18263 Les troubles anxieux et de l'humeur associés au stress, tel que la dépression et le stress post-traumatique, sont parmi les premières causes d'invalidité dans le monde. Pour autant, les changements cérébraux qui précipitent l'apparition de ces pathologies sont loin d'être compris, et les cibles thérapeutiques actuelles insuffisantes. L'objectif de ce projet est de mettre en place au sein de notre laboratoire un modèle chez la souris permettant de recapituler les changements comportementaux associés aux expériences de stress chronique et facilitant l'utilisation d'outils biologiques afin de cartographier, d'enregistrer et de manipuler les circuits cérébraux impliqués dans ces changements comportementaux. Ce modèle devra être à la fois 1) très reproductible, 2) permettre d'étudier la variabilité inter-individuelle au stress, car tous les individus exposés au stress ne développent pas nécessairement de troubles mentaux, une qualité appelée résilience, 3) induire des effets comportementaux forts et durables dans le temps, 4) être flexible dans sa mise en place afin de pouvoir l'utiliser chez l'adulte mais aussi à un stade juvénile, afin d'étudier comment le stress précoce, qui est le plus grand facteur prédictif de la dépression, modifie durablement le cerveau et précipite l'apparition de troubles dépressifs et anxieux chez l'adulte. Pour ces raisons le modèle que nous souhaitons mettre en place sera le stress de défaite sociale (SDS), largement utilisé dans la littérature et remplissant ces différentes conditions. Ce modèle consiste à introduire une souris « test » dans la cage d'une souris plus agressive (en l'occurrence une souris CD1 adulte, une lignée

non consanguine qui est largement utilisée pour son comportement agressif), provoquant l'attaque et la défaite de l'individu « test », suivi par une période d'interaction sensorielle prolongée entre la souris « test » et l'agresseur, mais sans contact physique direct. Cette expérience de défaite sociale négative, renforcée par la répétition de contacts sociaux avec l'agresseur induit des changements comportementaux et neurobiologiques durables qui ont des points communs avec certains symptômes présents dans la dépression chez l'homme, notamment l'anhédonie, l'anxiété, l'aversion sociale, une suractivation du système neuroendocrinien du stress, etc. Par ailleurs, sur la base du comportement d'évitement social qui est induit par ce modèle, il est facile de séparer les individus dits susceptibles au modèle, c'est-à-dire qui présentent une diminution du comportement d'interaction social, des individus dits « résilients », qui eux ne montrent pas de modification comportementale à la suite du modèle. Si ce modèle a été largement utilisé chez des souris mâles, son utilisation chez la femelle est marginale de par la sporadicité des comportements agressifs des souris mâles envers une femelle, ou de comportements agressifs d'une femelle envers une autre femelle. Cependant les maladies psychiatriques liées au stress, en particulier la dépression, étant plus observées chez les femmes, ce projet visera à implémenter le modèle de SDS à la fois chez les mâles et les femelles. Cela nous permettra à long terme d'étudier les dimorphismes sexuels des bases neurobiologiques de la dépression et de son traitement.

Cette étude nécessitera au total 280 souris.

Concernant l'application de la règle des 3 R dans notre étude :

Remplacement : aucune méthode alternative *in vitro* n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée. Le stress chez l'animal, comme modèle de pathologie psychiatrique humaine, repose sur l'observation du comportement de l'animal vivant. La souris est par ailleurs un choix pertinent de par les homologies structurelles qui existent avec l'homme dans l'organisation des zones cérébrales impliquées dans la réponse au stress et les émotions.

Réduction : les effectifs sont optimisés pour prendre en compte qu'une partie des animaux (~15 à 30% selon les études) sera résiliente au protocole de SDS, ces effectifs sont donc nécessaires pour pouvoir comparer statistiquement les groupes expérimentaux pour les différentes variables comportementales (témoins, SDS susceptibles, SDS résilients). Il est par ailleurs essentiel de pouvoir identifier des CD1 agressives, ce qui est un prérequis à l'étude. Finalement, les CD1 agressives sélectionnées peuvent être réutilisées par la suite en tant qu'agresseurs au cours de nouveaux protocoles de SD

Raffinement : Les conditions d'élevage des animaux seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu (cabanos plexiglass et cartons, tubes). Les animaux en SDS seront suivis quotidiennement, dans l'heure suivant l'épisode de défaite sociale, avec une attention particulière portée à l'état général, l'état de chair et aux plaies cutanées potentielles des animaux tests, ce qui sera facilité par des formulaires de santé précis pour chaque souris. Des points limites énoncés plus bas seront mis en place avant intervention ou exclusion du protocole.

18264 Les herpèsvirus équins 1 et 4 (EHV-1 et 4) sont responsables chez les chevaux de formes respiratoires (forme principale de la maladie), mais aussi de complications secondaires plus graves (avortement infectieux, atteintes neurologiques (encéphalomyélopathies)). Les herpèsvirus équins représentent donc un problème majeur en termes de santé équine et d'impact économique. S'il existe des vaccins efficaces contre la forme respiratoire de la maladie, les réponses induites par ces vaccins ne protègent peu ou pas les chevaux contre les formes les plus graves. Des outils de mesures de la réponse vaccinale étant la problématique, la vaccination contre les EHV-1 et 4 offre un contexte unique pour évaluer de nouveaux adjuvants vaccinaux. Le virus de la grippe équine est un des virus respiratoire d'importance chez le cheval. Le suivi de la réponse immunitaire présente l'avantage, pour ce virus, de pouvoir être mesuré avec des corrélats de protections bien définis. Le développement de nouveaux adjuvants est devenu un enjeu majeur en santé humaine et vétérinaire. L'objectif de ce projet de thèse est d'évaluer 3 nouveaux adjuvants et de caractériser leurs mécanismes immunostimulateurs *in vitro* chez l'espèce cible (équidés) (i. e. action 1 du projet). Ces adjuvants seront ensuite évalués dans le contexte de la vaccination contre la grippe équine ainsi que la rhinopneumonie (herpèsvirus 1/4; i. e. action 2), excellents modèles vaccinaux chez

l'espèce cible, qui permettra d'améliorer la prévention contre ces maladies tout en s'inscrivant dans le concept One-Health. Notre approche prend en compte les obligations réglementaires. 1- Remplacer : Ce projet a pour but d'évaluer les propriétés adjuvantes de molécules/composés chez l'espèce cible (les équidés). Au regard de la complexité des réponses immunitaires qui vont être mesurées et dans le but d'observer, de comprendre et de quantifier ces réponses, le recours aux chevaux est incontournable. Il n'existe pas, à ce jour, de modèle *in vitro* permettant de mesurer ces effets de manière pertinente. La réponse vaccinale est complexe et nécessite d'avoir recours à l'animal. De plus, il est admis que les autres modèles (souris, hamsters) ne constituent pas de bons modèles pour les études de la réponse immunitaire chez les équidés. 2-Réduire : Nous avons prévu de mener cette étude sur 20 chevaux, nombre minimal pour observer au moins 30% de différences avec l'ajout d'un immunostimulateur (Zylexis). Cette approche a été validée par un test statistique (online sample size calculator ; <https://www.sphanalytics.com/sample-size-calculator-using-average-values/>) utilisant des données chiffrées de la littérature scientifique. 3-Raffiner : La co-injection sera réalisé par du personnel compétent sur des chevaux entraînés pour recevoir des prises de sang et des injections sans nécessité de contention. L'accès à une population de chevaux permettra de réaliser l'étude *in vivo* de ce projet : i. e. analyse *in vivo* de la réponse immunitaire dans le cadre d'une co-injection (dans un premier temps) du vaccin de la grippe équine avec le Zylexis en tant qu'immunostimulant et du vaccin rhinopneumonie EHV1-4 avec le Zylexis (dans un deuxième temps).

18265 Pour pouvoir établir un diagnostic précoce et fiable et réaliser un suivi thérapeutique adapté en utilisant l'imagerie médicale dans certaines maladies neurologiques, particulièrement les maladies neurodégénératives (comme la maladie d'Alzheimer, Parkinson, ...) il est nécessaire de développer des radiotraceurs spécifiques des cibles des pathologies d'intérêt. Le développement d'un radiotraceur, petite molécule marquée par un isotope radioactif, est un long processus qui nécessite différentes phases de validation dans différents modèles d'étude précliniques avant de pouvoir le tester chez l'Homme. L'objectif de ce projet est de caractériser grâce au modèle primate non-humain (PNH) dix nouveaux radiotraceurs pour une utilisation en imagerie cérébrale chez l'humain. L'utilisation du modèle PNH se justifie par les similarités anatomiques et fonctionnelles du cerveau par rapport à celui de l'humain. La taille et la structure du cerveau, en rapport avec la résolution des équipements d'imagerie précliniques, permettent des analyses anatomiques et fonctionnelles équivalentes à celles réalisées dans les mêmes conditions chez les patients.

Concernant la caractérisation des radiotraceurs, ce processus inclut l'analyse de différents paramètres évalués, d'abord *in vitro*, et ensuite *in vivo*. L'étude de la vitesse de distribution du radiotraceur du sang vers les tissus, l'étude de la stabilité de la molécule et la spécificité du radiotraceur par rapport à sa cible d'intérêt dans le tissu, nécessitent une application *in vivo* avec des prélèvements sanguins d'un volume suffisant. Chez l'homme, la pose de cathéter artériel pour une prise de sang régulière requiert une logistique considérable en milieu hospitalier difficilement réalisable. Cela justifie le recours au modèle PNH pour réaliser une sélection optimale des radiotraceurs d'intérêt pour une évaluation en essai clinique. En effet, les mesures sanguines avancées permettent de mettre en place des méthodes simplifiées de quantification de fixation du radiotraceur sur sa cible, ce qui permettra une application chez l'humain.

Pour ce projet, nous prévoyons d'utiliser, sur une durée de cinq ans, 35 animaux, avec un nombre de maximum sept animaux par radiotraceur à évaluer, et la possibilité qu'un animal puisse participer à la validation de deux ligands avec l'accord du vétérinaire. Le nombre d'animaux est réduit au minimum nécessaire pour permettre une interprétation statistique fiable des résultats. Seuls les radiotraceurs à visée clinique, qui ont été évalués avec succès *in vitro* et *in vivo* chez le modèle murin, seront testés pour ce projet. Le suivi par imagerie se fera sous anesthésie générale pour réduire tout stress de l'animal lié à l'expérience. Pendant l'imagerie les paramètres physiologiques (rythme cardiaque, respiration, tension artérielle) seront rigoureusement suivis. Les radiotraceurs seront injectés par voie intraveineuse, à des doses qui n'induisent pas d'effet physiologique ou toxique sur l'animal (doses qui ont été déterminées d'après la littérature, et qui seront ensuite appliquées chez l'humain). Des points limites ont été définis à plusieurs niveaux afin d'éviter au

maximum la douleur éventuelle des animaux, et afin d'éviter une éventuelle dégradation de la condition physique de l'animal. Ainsi, l'imagerie sera arrêtée et l'animal sera réveillé si les paramètres physiologiques (rythme cardiaque, respiration, tension artérielle) pendant l'examen dévient des critères prédéfinis ; d'autres mesures physiologiques, comme le poids de l'animal et l'hémoglobininémie, sont suivis après l'imagerie afin de valider ou prolonger la période de repos; enfin, l'observation au quotidien de l'animal assurera un suivi de changements comportementaux.

18266 La détection d'une tumeur à un temps précoce permet de mettre en place rapidement un processus thérapeutique et ainsi favoriser la guérison des patients. Le diagnostic très précoce d'un cancer est donc la plupart du temps associé à un meilleur pronostic pour les patients. Dans cette optique, il est donc indispensable de développer des nouvelles molécules permettant de mettre en évidence la présence de tumeurs à des temps toujours plus précoces. Le projet proposé porte sur le développement d'une molécule ciblant préférentiellement les cellules tumorales indépendamment du type tumoral. Cette molécule innovante, brevetée et sous couvert de confidentialité, permettrait de cibler les cellules tumorales et si elle est associée à une sonde révélatrice (atome radioactif, fluorescence, etc) elle permettrait de diagnostiquer les patients atteints de tumeurs à des stades très précoces et de façon universelle. Dans ce but, la molécule a déjà démontré une grande affinité pour les cellules tumorales de différentes origines (carcinome, mélanome, ...) et une faible affinité pour les cellules non tumorales. Afin de continuer son développement, il est nécessaire de mettre en évidence cette affinité sur un système complexe qu'est un organisme.

Ce projet porte donc sur la distribution de cette molécule dans des souris préalablement greffées avec différents types tumoraux validés in vitro. Pour ce faire, après son injection, la fixation de cette molécule innovante sera mise en évidence par l'injection d'une seconde molécule spécifique de la molécule d'intérêt mais portant un atome radioactif permettant d'imager les souris par imagerie PET-CT. Ce type d'imagerie a été sélectionné car il permet une quantification précise de la fixation de la molécule d'intérêt dans les différents organes et tumeurs.

La plus grande affinité de cette molécule pour les cellules tumorales plutôt que pour les cellules saines a déjà été démontrée in vitro. Ainsi, toutes les expérimentations in vitro possible ont été réalisées avec des résultats prometteurs. Pour aller plus loin dans le développement de cette molécule, il est donc nécessaire d'étudier de façon rationnelle la biodistribution de cette molécule innovante dans un système biologique complexe. Le modèle murin a donc été choisi pour mimer la croissance tumorale humaine dans un organisme complexe.

Pour l'ensemble du projet nous avons prévu un nombre de 96 animaux sur une durée de 1 an. L'imagerie permet une réduction maximale du nombre d'animaux puisque les mêmes souris seront imagées plusieurs fois après injection de la molécule radioactive. Une étude similaire par analyse conventionnelle de la biodistribution nécessiterait un nombre beaucoup plus important d'animaux puisqu'à chaque temps d'analyse, les souris seraient sacrifiées.

Afin de raffiner notre méthodologie, les souris feront l'objet d'une surveillance journalière pour éviter tout signe de souffrance et les paramètres comme le poids des souris ainsi que la taille des tumeurs seront suivis au minimum trois fois par semaine. De plus, le milieu sera enrichi à l'aide de carrés de cellulose à grignoter. L'imagerie PET-CT nécessitant l'anesthésie des animaux, il a été préféré une anesthésie par insufflation de gaz anesthésiant plutôt que par injection pour réduire au maximum le nombre d'injections et permettre un réveil plus rapide des souris.

18267 Il a été démontré et publié que, en cancérologie, plus de 45% des candidats médicaments testés favorablement pour leur efficacité chez les rongeurs, par les méthodes classiques, donnent des résultats décevants chez l'Homme, dès la phase I des essais cliniques.

Les entreprises du médicament se tournent vers notre expertise afin d'avoir accès à des modèles innovants de cancers permettant d'obtenir des données consolidées au-delà des données générées en interne ou obtenues sur d'autres modèles précliniques. L'étude de ces candidats médicaments permettra de définir leur efficacité antitumorale ainsi que les informations nécessaires pour choisir leur posologie en vue de leur utilisation future en clinique.

Chaque étude de pharmacologie expérimentale sur modèle établis de xénogreffe de tumeur dérivée de patient ou PDX, impose de disposer d'animaux donneurs de tumeurs. La qualité de ces tumeurs et des fragments (ou greffons) qui en sont extrait ont un impact important sur le taux d'inclusion en étude, donc sur la quantité d'animaux nécessaire à la réalisation de l'étude.

L'objectif de ce projet est de décongeler et entretenir des modèles de PDX en vue de leur utilisation dans des études de pharmacologie expérimentale.

Les modèles de tumeurs développés peuvent être congelés sous forme dite « revivifiable » afin d'éviter de devoir les maintenir au cours du temps sur animaux et ainsi réduire l'utilisation d'animaux au minimum.

La planification d'une étude nécessite la décongélation du modèle sélectionné pour sa réalisation et sa greffe sur des animaux receveurs. Le nombre d'animaux nécessaire est réduit au minimum nécessaire grâce à une planification rigoureuse des décongélations des PDX.

Le nombre d'animaux utilisés à cette étape est strictement adapté, modèle par modèle afin d'obtenir au minimum 2 tumeurs en croissance après la décongélation. L'ensemble des données historiques recueillies sur de nombreuses années ainsi que la connaissance de nos modèles nous permettent d'anticiper le nombre d'animaux nécessaire à utiliser. Le taux de prise de greffe à cette étape de décongélation est en général inférieur au taux de prise de greffe observé lors d'une greffe à partir d'une tumeur juste décongelée et défini lors du développement du modèle.

Les fragments de tumeurs extraits de ces animaux seront utilisés pour amplifier le modèle sur de nouveaux animaux receveurs. Le nombre d'animaux utilisés sera de nouveau strictement adapté, modèle par modèle, afin d'obtenir le nombre de tumeurs palpables et en croissance nécessaires à la réalisation de l'étude planifiée.

Pour résumer 2 étapes sont nécessaires à l'obtention de greffons en vue d'une étude :

Une première phase de décongélation-croissance tumorale.

Une deuxième phase d'amplification-croissance tumorale qui permettra d'obtenir le bon nombre de fragments de qualité nécessaires.

Concernant la règle des 3Rs, ces études ne peuvent pas être réalisées in vitro. Il est essentiel d'avoir recours à des animaux receveurs au risque de faire dériver les PDX et en perdre la pertinence scientifique. A ce jour, l'utilisation de l'animal ne peut pas être Remplacée.

Les modèles utilisés sont parfaitement maîtrisés et permettent de n'utiliser que le nombre juste d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats pertinents.

Les conditions d'hébergement, permettent également de réduire au maximum l'hétérogénéité de croissance ainsi que tout facteur pouvant perturber la croissance des modèles entre les animaux et donc obtenir des échantillons de qualité optimale en fin de projet.

Le projet de maintien des modèles de xénogreffes nécessitera 12480 animaux sur 5 ans.

18268 Le cancer représente la deuxième cause de mortalité dans les pays développés. En dépit de l'amélioration constante de la prise en charge des patients, de nombreux progrès restent à faire et de nombreux travaux sont actuellement menés afin de mettre sur le marché de nouveaux traitements thérapeutiques anti-tumoraux.

Tout nouveau traitement entrant en essai clinique chez l'Homme, doit au préalable avoir démontré son efficacité thérapeutique potentielle lors d'études précliniques.

Cette preuve de concept expérimentale permet de mettre en place un rationnel scientifique solide et nécessite des preuves de concept in vitro mais également in vivo.

Notre expertise permet aux développeurs de médicaments afin d'avoir accès à des modèles innovants de cancers permettant d'obtenir des données fiables et reproductibles en complément des données générées en interne ou obtenues sur d'autres modèles précliniques.

L'objectif de ce projet est de déterminer in vivo les propriétés anti-tumorales de traitements innovants (petite molécule et/ou biothérapie) afin d'identifier ceux potentiellement efficaces en clinique. L'évaluation de ces traitements innovants permettra de définir leur efficacité anti-tumorale

ainsi que les informations nécessaires pour choisir leur posologie en vue de leur utilisation future en clinique.

Ce projet se base sur l'utilisation de modèles de tumeurs humaines greffées sur souris ou PDX pour Patient Derived tumor Xenografts. Ces modèles développés au cours des dernières années sont donc des souris porteuses d'une tumeur humaine. Ce sont actuellement les seuls qui permettent de reconstituer sur animal la complexité des tumeurs humaines. Les résultats obtenus sur ces modèles permettent ainsi une réelle extrapolation en médecine humaine. Nous disposons actuellement d'une collection de plus de 160 PDX différentes représentatives des tumeurs solides.

Concernant la règle des 3Rs,

Remplacement : Il est essentiel, avant toute administration à l'Homme, de valider le potentiel thérapeutique de chaque traitement innovant dans des modèles permettant d'étudier tous les paramètres observables, depuis l'administration jusqu'à l'élimination des composés administrés tout en prenant en compte les interactions possibles avec les cellules non-tumorales de l'organisme. Ces études in vivo constituent une des nombreuses étapes du développement préclinique d'un médicament mais ce travail sur animal ne peut être remplacé.

Réduction : Les modèles de PDX utilisés sont parfaitement maîtrisés et permettent de n'utiliser que le nombre strictement nécessaire d'animaux pour obtenir des résultats pertinents. Les traitements retenus pour ce projet auront été sélectionnés au préalable lors d'études in vitro permettant la réduction du nombre de groupe à tester. Il sera, de plus, possible d'évaluer plusieurs traitements au sein d'une même étude, sur un même modèle tumoral (1 seul groupe contrôle pour plusieurs traitements différents) et ainsi réduire le nombre total d'animaux inclus dans le projet.

Toujours d'après les résultats in vitro, seuls les traitements démontrant les meilleurs effets anticancéreux seront testés in vivo permettant au mieux de réduire le recours aux études in vivo aux traitements ayant le meilleur potentiel thérapeutique anticipé.

Raffinement : Nous utiliserons toutes les données compilées préalablement dans le cadre du développement préclinique du traitement à évaluer. Ceci permettra de prédéfinir les doses potentiellement efficaces et minimisant les effets secondaires. Nous pourrons ainsi raffiner l'étude en étant certain de travailler à des doses permettant d'évaluer l'efficacité des traitements et non leur toxicité, en minimisant ou supprimant tout effet secondaire indésirable pouvant masquer l'objet de l'étude.

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

Le projet dont la durée sera de 5 années sera constitué de 100 études visant à évaluer différents traitements innovants sur différents modèles de PDX. Les études comprendront chacune 150 animaux au maximum, soit un total de 15000 animaux au maximum.

18269 Le recours à l'animal est une réalité de la recherche : les personnes qui doivent expérimenter avec des animaux doivent être formées : licences professionnelles, master, formation continue... Dans le cadre de cette formation professionnelle, nous voulons qu'une part de cette formation soit faite de façon centralisée avec des bonnes pratiques, en complément du compagnonnage qui, utilisé exclusivement, cloisonne le savoir et fait perdurer localement les habitudes – bonnes ou mauvaises. En licence et master non professionnels, le confinement dû à la COVID19 a mis en évidence l'intérêt fondamental de l'enseignement présentiel en effectifs réduit. Dans les TD, « celui qui sait » formalise le concept à transmettre à l'apprenant qui reste passif. Les TP apportent une démarche active, la confrontation à la réalité, un aspect méthodologique et sollicitent chez l'apprenant d'autres vecteurs que le son ou l'image. Nos TP comportent également, selon leur niveau, la sensibilisation aux règles d'éthique en expérimentation animale, au bien-être animal, aux conditions d'hébergement et de

manipulation des animaux, aux choix des modèles, aux méthodes alternatives et à la rationalisation des groupes expérimentaux.

Raffinement :

Seuls les TP destinés à la formation réglementaire à la chirurgie expérimentale mettent en œuvre une procédure expérimentale de gravité modérée. Cela concerne une dizaine d'animaux par an, avec une prise en charge de la douleur identique à celle pratiquée en médecine humaine ou vétérinaire. Les autres travaux pratiques impliquent des contraintes légères ou sans réveil. Dans certains cas, ces contraintes résultent uniquement du stress de la manipulation d'animaux par des personnels en cours de formation mais sous supervision ; réalisées par des personnels compétents, ces manipulations ne génèreraient qu'un stress évalué sous le seuil réglementaire et ne feraient donc pas l'objet de procédures expérimentales. Dans plusieurs TP nous avons remplacé les mammifères par des amphibiens ou des poissons.

Remplacer :

L'immense majorité de l'enseignement est délivrée par des cours, des travaux dirigés et des démonstrations. Les TP de chirurgie sont précédés de TD pour pratiquer des sutures sur matériaux inertes. La physiologie, l'anatomie sont d'abord abordés en cours, en TD, en TP sur invertébrés ou sur plantes. Nous montrons pour chaque procédure en quoi le recours à l'animal est pédagogiquement indispensable.

Réduire

Le nombre de TP proposés en licence (un chaque année alors que ces personnes ont déjà fait le choix de la biologie parmi d'autres parcours) est selon nous le minimum pour que les étudiants puissent décider de la suite de leur avenir professionnel en toute connaissance de cause. Les autres TP interviennent dans des cursus avec des effectifs réduits et ciblés. Comme les procédures antérieures sont de classe « légère », certains rongeurs sont réutilisés d'une séance de TP à l'autre, au sein de ce projet, ou à la suite d'autres enseignements, et certains sont d'ancien reproducteurs réformés.

Le nombre d'animaux impliqués sur 5 ans est de 2025 pour l'ensemble de notre campus universitaire (plus de 10000 étudiants) : 460 souris (0 si nous continuons à réutiliser depuis un autre établissement), 1285 rats (1085 si nous parvenons toujours à réutiliser 40 rats par an, réutilisations que nous chercherons à augmenter) et 280 vairons.

18270 Chaque étude de ce projet a pour objectif principal d'étudier la stabilité et le devenir d'une molécule, candidat-médicament, dans le tractus gastro-intestinal après administration chez le miniporc. Le devenir de cette molécule et le potentiel immunogénique peuvent être étudiés dans différents tissus ou liquides biologiques. Dans le cadre de ce projet, un suivi de la molécule dans le contenu intestinal, dans les selles et dans le sang sera réalisé.

Pour suivre l'évolution de la molécule testée au cours du processus de digestion dans le tractus intestinal, son élimination dans les selles au cours du temps et les propriétés immunogéniques, des recueils de contenu intestinal et de selles seront réalisés chez le miniporc pendant une ou plusieurs périodes après l'administration du candidat-médicament.

Ces recueils seront ensuite traités et analysés pour mesurer la stabilité, la diffusion et l'élimination du candidat-médicament administré et/ou de ses métabolites et la production d'anticorps. Plusieurs administrations pourront être effectuées sur un même animal en respectant une durée minimale de 7 jours de récupération entre 2 administrations, ce qui permet de raffiner l'expérience.

Le nombre prévisionnel maximum d'animaux est de 100 miniporcs sur 5 ans.

La conception de ce projet prend en compte la règle des 3R.

Remplacement : Dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le miniporc car il n'existe pas de méthode de substitution (in vitro ou in silico) pour évaluer le devenir d'une molécule dans le tractus gastro intestinal et son potentiel immunogénique. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité, la toxicité et la pharmacocinétique d'un candidat médicament. A ce jour, le miniporc est

l'une des espèces de non-rongeurs qui est la plus adaptée à ce type de modèle d'étude car, de par ses nombreuses similitudes physiologiques et anatomiques avec l'homme et son régime alimentaire omnivore, les propriétés du tractus digestif du miniporc sont proches de celles de l'homme.

Réduction : Un nombre minimal et suffisant d'animaux par groupe est utilisé afin d'analyser de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et d'effectuer des analyses statistiques.

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

- le recours à des procédures les moins invasives possibles
- le suivi d'éventuels signes cliniques par une surveillance accrue des animaux
- la détermination des points limites
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire
- un protocole analgésique adapté pour la chirurgie et la période post-opératoire et un suivi post-opératoire de l'état de santé des animaux avec des soins et un enrichissement adaptés afin de permettre une bonne récupération des animaux
- la réduction du volume sanguin prélevé grâce à l'amélioration de la sensibilité des méthodes d'analyse
- la familiarisation des animaux aux procédures expérimentales.

18271 Les poissons petits pélagiques représentent à la fois des espèces clefs de voûte de l'écosystème de par leur place centrale dans le réseau trophique mais aussi un enjeu économique très important pour les pêcheries méditerranéennes. Depuis 2008, les stocks de sardines (*Sardina pilchardus*) du Golfe du Lion ont subi des changements drastiques avec une perte de biomasse et une évolution brutale dans la structure en âge et en taille de la population, entraînant une diminution très nette des captures françaises. Cette diminution de la biomasse résulterait d'une baisse conjointe de la croissance et de la condition corporelle des sardines, et non d'une baisse du nombre de poissons. Ce changement semble pointer vers un défaut de prise énergétique et donc d'alimentation, qui se traduirait par une surmortalité préférentielle des classes d'âges les plus élevées. Cette surmortalité ne semble liée ni à la pêche, ni à une pression de prédation importante que ce soit de la part des thons rouges ou des mammifères marins. Il en résulte que le stock de sardines du Golfe du Lion est maintenant reconnu en déséquilibre écologique. Le présent projet vise à comparer les dépenses énergétiques des individus en fonction de leur stratégie alimentaire (filtration vs. chasse) et d'estimer la compétition interindividuelle associée. Ces informations vont permettre de quantifier le déficit énergétique lié à la stratégie alimentaire et ainsi de mieux comprendre les processus physiologiques ayant mené à la crise des petits pélagiques. Le projet impliquera des mesures d'échanges gazeux, par respirométrie sur des groupes de sardines en bassin, afin d'évaluer les dépenses énergétiques avant, pendant et après le repas. En parallèle, une identification externe de certains individus permettra un suivi individuel dans le but d'étudier leur activité au cours de la journée et la compétition entre les individus à l'aide d'une analyse vidéo. Cette étude sera réalisée à deux températures différentes (15°C et 20°C) afin d'évaluer l'impact du réchauffement de l'eau dans un contexte de changement global.

Les protocoles considèrent la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner):

- Remplacer: Ces études, qui impliquent la mesure des échanges gazeux, doivent être réalisées sur des animaux. Les individus, sur lesquels le travail sera réalisé, proviennent de pêches professionnelles à caractère scientifique, réalisées dans le Golfe du Lion à l'aide d'une seine tournante coulissante.

- Réduire: Le nombre d'individus utilisé ($n = 2000$ animaux) permettra la création de 8 lots de 250 poissons dans chaque bassin pour la respirométrie. Ce nombre permettra un comportement social 'de banc' dans les bassins avec une biomasse suffisante pour mesurer avec précision les échanges gazeux dans le volume d'eau du bassin. Le nombre de bassins ($n = 8$) est le minimum nécessaire afin de permettre des tests statistiques appropriés aux objectifs. Le nombre d'individus marqués ($n = 160$, 8% du stock utilisé) permettra un suivi individuel de 20 poissons par bassin, un minimum indispensable pour étudier la compétition entre les individus et pour la réalisation des analyses

statistiques. Comme lors d'une précédente étude, le placement des individus sera proposé aux aquariums de la région à la fin de cette expérience.

- Raffiner: Les protocoles d'analyse des échanges gazeux dans les bassins qui abritent les poissons sont bien établis chez les poissons. L'objectif des protocoles est de limiter au minimum la souffrance et le stress des animaux, avec protection des poissons de toute nuisance visuelle et sonore pendant les expériences. Cela permet d'obtenir des mesures physiologiques valides et fiables, qui ne sont pas influencées par un état de stress ou d'agitation de l'animal. De même, l'utilisation de marques externes est une méthode souvent utilisée chez les poissons afin de suivre leur déplacement et n'implique pas de modification de leur comportement. Pour finir, le changement de température sera fait progressivement sur plusieurs jours afin de limiter au maximum le stress des individus.

18272 Les maladies neurodégénératives (Parkinson, Alzheimer, Huntington) et les autres altérations cérébrales liées à l'âge sont une préoccupation croissante en santé publique. Ces pathologies sont toutes liées à l'apparition d'une atrophie cérébrale massive et à des altérations fonctionnelles des réseaux neuronaux. La compréhension des mécanismes en jeu dans ces phénomènes est donc très importante pour permettre une meilleure prise en charge des patients. L'atrophie et de nombreuses autres atteintes cérébrales liées à l'âge peuvent être suivies de façon non-invasive grâce à des nouveaux outils diagnostiques tels que l'imagerie par résonance magnétique (IRM).

Des marqueurs sanguins peuvent également être détectés lors du vieillissement. Par exemple, la protéine amyloïde qui est présente en grande quantité (anormale) dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, est aussi détectable dans le sang. Les relations entre atrophie cérébrale, atteintes cérébrales fonctionnelles et marqueurs sanguins sont encore mal connues. Les lésions cérébrales à l'origine de ces altérations sont également mal connues. Chez l'humain, il est très difficile de réaliser des évaluations post-mortem du cerveau de sujets ayant reçus des examens IRM et sanguins pendant toute leur vie.

L'objectif de ce projet est de suivre, sur des modèles animaux, l'évolution de l'atrophie cérébrale et d'autres atteintes cérébrales liées à l'âge ; par exemple, les altérations fonctionnelles des réseaux neuronaux, grâce à l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Des analyses sanguines permettront de corrélérer les atteintes cérébrales avec des paramètres biologiques tels que l'amyloïde plasmatique et/ou l'urémie. Des études post-mortem de cerveaux des animaux permettront de comprendre l'origine des modifications des paramètres mesurés par IRM ou prises de sang.

Nous utiliserons un modèle de primate non humain (PNH) présentant un vieillissement cérébral très proche de celui de l'être humain : il présente une atrophie cérébrale liée à l'âge et est le premier PNH chez qui l'atrophie a été corrélée aux atteintes cognitives. Ces modèles animaux âgés présentent aussi des modifications sanguines pouvant refléter des altérations précoces retrouvées chez les patients Alzheimer.

Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet sont nés et élevés dans des élevages agréés. Le projet prévoit l'utilisation de 20 PNH. Il s'agit d'une cohorte déjà suivie depuis plusieurs années. Ces effectifs ont été réduits au minimum nécessaire pour garantir la validité statistique des résultats. Le recours à l'animal est nécessaire car aucun milieu de culture ou système synthétique ne permet aujourd'hui de reproduire la complexité architecturale des cellules du cerveau, en particulier les interactions structurelles et fonctionnelles de ces cellules.

Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés depuis de nombreuses années, et validés par un vétérinaire. L'application de critères d'arrêts standards en élevage et le suivi quotidien des animaux, hébergés en groupe dans un milieu enrichi, garantissent leur bien-être.

18273 Les cyathostomes ou petits strongles sont les principaux parasites intestinaux des équidés du fait de la prévalence d'infestation et de leur pathogénicité.

Chez les équidés, le contrôle des cyathostomes repose essentiellement sur l'utilisation de vermifuges, souvent de manière systématique et sans évaluation préalable du risque parasitaire. Cette sur-utilisation des vermifuges a conduit à l'émergence de populations de parasites résistants à ces vermifuges.

Face à ce constat, il est urgent de limiter l'usage des vermifuges afin de préserver leur efficacité et donc la santé des équidés à long terme. Il est conseillé de ne traiter que les lots d'animaux pendant une période à fort risque d'infestation (vermifugation ciblée) et/ou les individus fortement parasités et/ou souffrant de ce parasitisme (vermifugation sélective), l'idéal étant de combiner ces deux stratégies.

Chez les équidés, la vermifugation sélective des seuls équidés excréant un grand nombre d'œufs de parasites est prônée par les parasitologues depuis de nombreuses années. Malheureusement, celle-ci a du mal à se généraliser, le temps de travail nécessaire au prélèvement des crottins et le coût des analyses représentant des freins non négligeables. Aucune stratégie de vermifugation ciblée n'a en revanche été mise au point.

Chez les bovins, un système expert, Parasit'Sim, a été développé en 2002 pour apporter aux éleveurs un outil d'aide à la décision permettant d'identifier les périodes à risque parasitaire au strongle *Ostertagia ostertagi*, chez un lot d'animaux en pâture. A chaque identification d'une période à risque, un traitement du lot peut être déclenché pour éviter des conséquences zootechniques et médicales.

Cet outil se base sur deux règles principales :

1. l'installation de l'immunité :
2. la succession des générations parasitaires sur les pâtures :

Parasit'Sim prend en compte l'ensemble de ces paramètres et les traduit en probabilité de risque sur la base d'un

paramétrage prudent, validé à partir de suivis de troupeaux, en confrontant les prévisions de risque du système avec des indicateurs d'infestation mesurés chez les animaux et sur les parcelles.

L'objectif de ce projet est d'adapter ce système aux équidés (Parasit'SimEq). Cet outil sera directement utilisable par les vétérinaires sur le terrain et aura plusieurs intérêts : les aider à cibler l'usage des vermifuges sur les périodes à risque d'infestation parasitaire pouvant engendrer des conséquences négatives sur la santé des équidés ; les aider à recommander aux éleveurs la mise en place de conduites de pâturage réduisant le risque parasitaire en simulant différentes modifications afin de choisir les plus faciles à mettre en œuvre et/ou les plus adaptées aux problématiques rencontrées.

L'objectif final est de limiter l'usage des vermifuges chez les équidés afin, d'une part de réduire le risque d'apparition de nouvelles résistances et d'autre part, de limiter le coût économique lié à la gestion du parasitisme, ainsi que préserver la santé des équidés à moyen et long terme.

En 2020, l'outil Parasit'SimEq sera développé sur la base du système bovin, par étapes successives :

- A partir des données bibliographiques, modélisation de la durée de développement des œufs en larves L3 des cyathostomes en fonction de la température et de la durée de développement des larves en adultes ;
- écriture explicite des règles de décision et des paramètres pris en compte ;
- calcul des temps de génération larvaire en interaction avec la température et le système de pâturage ;
- traduction en niveau de risque.

Une fois la première version de Parasit'SimEq développé, son paramétrage sera calibré dans différents lots regroupant chacun 15 à 20 équidés ayant accès à des pâtures et présentant des conduites variées :

- en 2020, 2021 et 2022, dans 3 stations expérimentales ;
- en 2021 et 2022, au minimum 15 et 10 lots seront respectivement suivis dans des structures privées.

Dans chaque lot, entre mars et octobre, un enregistrement continu des conduites d'élevage sera réalisé et les périodes à risque, identifiées par Parasit'SimEq, seront confrontées aux indicateurs d'infestation parasitaire mesurés chez les équidés (examens coproscopiques individuels mensuels)

et sur les parcelles (comptage des larves) et également à des indicateurs zootechniques (note d'état corporel) et cliniques (note consistance des crottins).

Cette DAP ne concerne que 3 lots d'équidés de la station expérimentale, comprenant 62 juments. Ces 3 lots seront suivis en 2020 et 2021 et selon les résultats obtenus en 2021, éventuellement en 2022.

1) Remplacer

Le premier volet du projet (Adaptation du système expert Parasit'Sim chez les équidés) sera réalisé à partir des données bibliographiques. Seule la validation de l'outil nécessite une validation par le suivi de lots d'animaux. Cette confrontation entre le modèle théorique et les données de terrain est indispensable afin de pouvoir ensuite utiliser l'outil sur le terrain en toute confiance.

Le suivi de l'excrétion des animaux est indispensable à la validation de l'outil. Nous pourrions suivre uniquement la dynamique d'infestation des parcelles. Cependant, ces données seraient parcellaires puisque même sur une pâture fortement infestée, les équidés mangeront peu de larves infestantes s'ils sont complétés en fourrages par exemple. De plus, certains équidés sont plus résistants que d'autres à l'infestation parasitaire (pas de possibilité de remplacer).

2) Réduire :

En 2020 et 2021 :

- les prélèvements seront mensuels, pour avoir une vision précise de la dynamique d'infestation des équidés.
- 3 lots seront suivis, leur composition restera inchangée.

En 2022 :

- le protocole sera allégé : prélèvements aux périodes identifiées à risque par l'outil ou,
- ces lots ne seront pas suivis.

La validation de l'outil ne se base pas sur des tests statistiques mais sur une confrontation des données du modèle mathématique avec celles de terrain.

3) Raffiner :

Seules les palpations transrectales représentent un caractère invasif.

- Les juments seront placées dans des barres de contention.
- La palpation sera réalisée par un vétérinaire à l'aide d'un gant de fouille lubrifié, dans la partie postérieure du rectum, si possible.

Après chaque prélèvement, le gant de fouille sera visualisé et la présence de sang recherchée. En cas de suspicion de lacération rectale, une surveillance accrue de la jument sera mise en place.

18274 Les capacités respiratoires sont essentielles chez le cheval notamment pour l'athlète. Par conséquent, toute affection respiratoire peut avoir des effets sur la performance sportive de l'animal et conduire à des pertes économiques. Les pathogènes viraux et des bactéries comme l'agent de la gourme ou de la rhodococcose sont largement étudiés. Peu d'investigations sont menées sur les mycoplasmes pourtant retrouvés par amplification génique dans 20% des lavages broncho-alvéolaires (LBA) et trachéaux (LT) équins reçus pour analyse dans un laboratoire. Contrairement aux mycoplasmes impliqués chez l'homme, les ruminants et la volaille, ceux de la filière équine sont très peu étudiés. Les seules études disponibles, au niveau international, identifient *Mycoplasma* (*M.*) *felis* et *M. equirhinis* comme les deux espèces majoritaires responsables d'affection respiratoire chez le cheval. Cependant, à ce jour, aucune donnée n'existe sur le sujet en France. Il est essentiel pour la filière équine d'avoir une meilleure connaissance de la prévalence des mycoplasmes.

Les 3 objectifs scientifiques du projet MYCOPAB sont donc de i) développer des outils de détection et d'identification des mycoplasmes équins, ii) déterminer leur profil de résistance aux antibiotiques et les mécanismes moléculaires sous-jacents, iii) évaluer leur prévalence comparée en pathologie versus portage et cartographier le type de souches circulant.

La présente demande d'utilisation d'animaux intervient dans le cadre du 3ème objectif. Il est important de cartographier la nature, quantité et identité des souches de mycoplasmes présentes en pathologie versus celles résidentes dans les voies respiratoires hors clinique. Pour le volet « pathologie », les LBA et LT seront ceux reçus pour diagnostic dans un laboratoire. L'exploration exhaustive des voies respiratoires nécessitent les deux types de prélèvements. La trachée est l'endroit où se récoltent les sécrétions provenant de voies respiratoires environnantes (trachée, bronches et voies respiratoires profondes). Le lavage bronchoalvéolaire donne des informations sur les voies respiratoires profondes (petites bronches, bronchioles, alvéoles).

C'est afin d'établir une cartographie des mycoplasmes commensaux que les 60 juments non gestantes de la station expérimentale seront prélevées par un vétérinaire habilité.

Pour prélever l'ensemble de l'effectif envisagé, une session de 5 jours à raison de 12 juments par jour sera programmé. Après un examen général, chaque jument sera maintenue dans un travail ou un box et tranquilisée avec une association de Romifidine (0,03 mg/kg IV) puis butorphanol (0,01 mg/kg IV). Le vétérinaire réalisera alors sous endoscopie un LT suivi d'un LBA. Chaque jument prélevée sera ensuite placée dans un paddock en sable (à proximité de congénères) et surveillée jusqu'à absence d'effet visible de la sédation (locomotion normale, réactivité face au test de clignement à la menace). De plus, afin d'anticiper d'éventuels problèmes de déglutition, les chevaux ne recevront pas de ration alimentaire dans les 2 heures suivant le prélèvement. Si aucun problème n'est rencontré, les juments retourneront ensuite en pâture en groupe. En cas de problème sur un équidé, une surveillance accrue de ce dernier sera mise en place. Les volumes collectés et les aspects macroscopiques des prélèvements seront évalués (couleur, transparence, présence de flocculats de mucus). Ces données seront enregistrées dans une base de données dédiée. Les prélèvements seront acheminés au laboratoire pour y être analysés et mettre en évidence des colonies caractéristiques des mycoplasmes. Une fois isolées, ces colonies seront typées pour déterminer la sous-espèce à laquelle elles appartiennent et leur profil de résistance aux antibiotiques.

Notre protocole d'utilisation des chevaux est construit dans le respect des 3R.

Concernant la réduction, tout sera mis en œuvre pour limiter à son strict minimum le nombre de chevaux à inclure dans le groupe « portage ». Cependant, en l'absence de données de prévalence disponibles concernant ce portage, il est difficile d'estimer la taille de l'échantillonnage idéal. L'analyse statistique des données issues des prélèvements cliniques (en cours) devrait nous donner une image préalable et permettre éventuellement de réduire la taille de la population témoin tout en garantissant une puissance statistique suffisante. Chaque cheval inclus ne sera prélevé qu'une fois. En effet, la répétition des prélèvements est inutile pour atteindre notre objectif. Tous les échantillons seront conservés en bio-banques et pourront être utilisés dans d'autres travaux réduisant le besoin d'effectuer de nouveaux prélèvements biologiques.

Concernant le raffinement, notre protocole a été conçu pour réduire, soulager l'inconfort, la douleur et l'angoisse subie par les animaux. Ce souci de raffinement sera une préoccupation permanente pendant les différentes étapes du protocole expérimental. La période de réalisation des prélèvements sera planifiée avec les responsables de la station expérimentale de façon à éviter toutes perturbations pour les animaux et en fonction de la disponibilité des locaux, du personnel et du matériel. Pendant l'expérimentation, la faible tranquillisation envisagée est nécessaire pour protéger à la fois le praticien et le cheval contre tout mouvement brusque non maîtrisé. Cependant, seul le vétérinaire jugera de son utilisation en fonction de l'examen clinique et du niveau d'angoisse de l'animal. Les prélèvements seront réalisés en utilisant un endoscope ce qui présente l'avantage d'être plus rapide, de permettre la visualisation de l'endroit du prélèvement et de présenter moins de risque de complications. Le nettoyage et la désinfection scrupuleuse de l'endoscope et de la sonde entre chaque cheval garantira l'absence de contaminations croisées. Après l'expérimentation, les résultats obtenus vis-à-vis de la prévalence des mycoplasmes en condition de portage seront exploités et valorisés sous forme de publications et communications afin de ne pas avoir à reproduire cette expérimentation.

Les seuls critères d'exclusion d'une jument de la session de prélèvement seront l'observation de signes cliniques caractéristiques d'affection respiratoire lors de son examen pré-prélèvements. Les

prélèvements seront interrompus si le cheval présente des réactions inhabituelles aux tranquillisants et si son niveau de stress n'est pas canalisé par une complétion de la sédation.

Concernant le remplacement, la comparaison des résultats obtenus sur les prélèvements (LBA vs LT) et les méthodes de diagnostic (bactériologie vs PCR) devrait aboutir à l'identification d'un prélèvement le plus appropriés et à une méthode la plus sensible pour le diagnostic des mycoplasmes équins (identification de l'espèce et résistance aux antibiotiques) pour une interprétation clinique réaliste des résultats diagnostiques.

18275 Nous avons eu une autorisation pour 5 ans à partir d'octobre 2015, pour des projets d'immunisation pour le développement d'anticorps (référéncé sous le numéro 03949. 02). Nous souhaitons renouveler notre demande.

Notre entreprise développe des anticorps monoclonaux à visée diagnostique (pour laboratoires pharmaceutiques ou vétérinaires) et recherche (laboratoires de recherche publique ou privée). Cela nécessite l'utilisation de souris ou de rats pour les immunisations.

Les antigènes injectés aux animaux sont des molécules de classe 1 (non pathogènes) ou 2 (agents biologiques pouvant provoquer une maladie chez l'homme). Pour ces derniers, notre animalerie possède une zone de niveau 2.

Plusieurs injections (entre 3 et 8) sont réalisées dans un délai de 2 semaines à 3 mois selon le protocole utilisé. Les immunisations sont effectuées en présence d'adjuvant afin d'augmenter la réponse immunitaire.

Les injections peuvent se faire en intrapéritonéale, sous-cutanée, intradermique, intramusculaire ou intraveineuse.

La règle des 3R est appliquée :

1) Remplacer : Il n'existe pas de méthodes alternatives à l'immunisation d'animaux pour l'obtention d'anticorps de haute affinité, les techniques de criblage de banques naïves ne permettent pas d'obtenir les affinités escomptées ainsi qu'une diversité suffisante d'anticorps.

2) Réduire : il n'est utilisé que le nombre d'animaux strictement nécessaire : il est recommandé d'utiliser 3 à 5 souris et 2 à 3 rats par projet de façon à pallier au risque d'une réponse immunitaire trop faible sur un animal ou à l'extrême au décès d'un animal en cours d'expérimentation, ce qui pourrait compromettre le projet.

Afin d'éviter de sacrifier inutilement un trop grand nombre d'animaux, un maximum de 3 souris ou de 2 rats sont utilisés pour la plupart des projets.

3) Raffiner : Les souris et les rats sont hébergés selon les normes en vigueur. Les souris sont logées à 3 à 5 par cage et les rats à 2 par cage. Afin d'améliorer le bien-être des animaux, du papier essuie-tout est introduit dans chaque cage.

Ils sont anesthésiés lorsque nécessaire et euthanasiés si le point limite de souffrance est atteint.

Les doses injectées d'immunogène + adjuvant sont diminuées à un minimum établi par le comité d'éthique.

A la fin du projet tous les animaux sont euthanasiés. La rate ou les ganglions lymphatiques de celui (ou ceux) dont la réponse immunitaire est la meilleure sont alors prélevés.

Environ 300 souris par an ont été utilisées depuis 5 ans, soit 1485 souris entre 2015 et 2020. L'activité étant en augmentation, ce nombre devrait être plus élevé au cours des 5 prochaines années. Nous nous basons sur un maximum de 1910 souris.

Peu de rats sont généralement utilisés : nous prévoyons un maximum de 90 rats. Soit un maximum de 2000 animaux au total (1910 souris + 90 rats).

18276 La fragmentation des habitats induite par l'anthropisation des terres, en particulier avec la construction d'infrastructures linéaires de transports comme les routes, est l'une des causes majeures reconnues de l'érosion de la biodiversité. La construction de routes est habituellement couplée à la construction de bassins d'orage captant les eaux de ruissellement afin de les contenir,

les stocker et les dépolluer avant leur éventuelle évacuation dans l'environnement. Bien qu'il soit reconnu que l'eau des bassins d'orage est polluée, il a été démontré à plusieurs reprises que ces bassins peuvent être colonisés par la flore et la faune, et notamment par les amphibiens. Ce taxon est l'un des plus menacés au niveau mondial et la totalité des espèces présentes sur le territoire français est protégée.

Aujourd'hui, les gestionnaires de voirie mettent en œuvre des mesures visant à empêcher les amphibiens de rentrer dans les bassins, mais celles-ci sont inefficaces. Le but de notre projet de recherche à long-terme est de vérifier si une fermeture efficace de ces zones humides artificielles et réputées dangereuses pour la survie des amphibiens aurait un effet positif ou négatif pour la viabilité et la dynamique des populations d'amphibiens présentes dans la zone d'étude. En effet, la pollution est supposée avoir (1) un effet délétère à court terme sur le phénotype et la survie individuels, au stades larvaires ou même adultes, mais par ailleurs ces bassins pourraient (2) jouer un rôle relai pour connecter les mares favorables à la reproduction, qui sont maintenant en trop faible densité et trop dispersées dans la zone d'étude.

Afin d'étudier cela, nous avons en 2020 réalisé une étude in situ sur les têtards du Crapaud vert (*Bufotes viridis*), espèce menacée, dans des bassins d'orage routiers (BO) et des mares semi-naturelles plus favorables, que l'on dénommera ici 'sites contrôles' (SC). Nos résultats montrent que la survie des têtards est nettement plus faible dans les BO. En revanche il reste à élucider quelles sont les variables responsables de cette faible survie au stade têtard afin de permettre une amélioration des BO, ou si nécessaire envisager des mesures d'exclusion enfin efficace. Mais dans un premier temps, nous devons essayer de mieux cerner les facteurs ayant entraîné cette surmortalité. Deux de ces variables ont été identifiées comme ayant une action significative :

- La pollution du sédiment (e. g. métaux lourds), 8 fois plus importante dans les BO que dans les SC, alors que la pollution de l'eau libre n'était pas différente, et faible ;
- La présence systématique d'au moins une espèce de sangsues identifiée (*Helobdella stagnalis*) dans les BO, parasitant la majorité des têtards, mais jamais observée dans les sites contrôles.

Le but de la présente sous-étude est de clarifier l'action respective de ces deux variables en conditions contrôlées de laboratoire, en utilisant des têtards du Crapaud vert. Pour ce faire, nous allons exposer des têtards de crapaud vert à différentes conditions pendant tout leur développement jusqu'à la métamorphose. Il n'est en effet pas possible de vérifier nos hypothèses sur un autre modèle (remplacement). Des fragments de cinq pontes différentes seront prélevés le même jour dans un site où la survie était la plus importante en 2020 afin de réduire l'impact sur la nouvelle cohorte (i. e. 70% de survie en zone favorable). Le nombre de têtards utilisés ($N_{total}=480$) semble important mais est le minimum nécessaire (réduction) afin de séparer statistiquement les scores de survie dans les différentes conditions. Notons que chaque ponte est composée d'environ 10 000 œufs, donnant naissance à des milliers de têtards et que notre prélèvement de 480 d'entre eux aura un impact absolument négligeable sur ces cinq pontes et sur cette sous-population saine.

Le protocole va consister, après prélèvement des pontes et éclosion en aquarium dans les conditions contrôlées et optimales du laboratoire, à sélectionner aléatoirement 480 têtards (les autres étant rendus à la vie sauvage) et les répartir dans des bassins expérimentaux où les conditions seront différentes (4 conditions et 3 réplicats, soit 12 bassins de 40 têtards chacun). Ces quatre conditions correspondront respectivement à (1) un 'lot contrôle', avec présence d'eau pure du robinet et d'un sédiment propre acheté en animalerie ; (2) un 'lot sédiment pollué', le sédiment provenant de 3 bassins d'orage de l'étude préliminaire ; (3) un 'lot sangsues' qui diffère du lot contrôle par la présence de sangsues de l'espèce présente dans les bassins d'orage ; et enfin (4) un 'lot sédiment pollué et sangsues', contenant de l'eau propre mais le même sédiment pollué que le lot 2 et les mêmes sangsues que le lot 3.

Tout au long de l'expérimentation, des comptages et des photos seront prises quotidiennement afin d'estimer le taux de survie et de croissance des têtards. Des mesures de raffinement seront mises en place (e. g. contrôle de la qualité de l'eau, suivi plus régulier à l'approche de la métamorphose pour éviter la noyade. .). À la fin de l'expérimentation, l'ensemble des post-larves (jeunes crapauds juste après leur métamorphose) seront relâchées sur le lieu de prélèvement.

18277 Le psoriasis est une maladie inflammatoire chronique touchant environ 2 à 3 % de la population mondiale et 1.5 à 2 millions de personnes en France. Elle présente des points communs avec les maladies auto immunes et est de plus en plus considérée comme telle. Cette pathologie se manifeste par des lésions de la peau : érythèmes multiples sur différentes parties du corps, dont la sévérité dépend de la surface atteinte. Il n'existe pas de traitement permettant de guérir du psoriasis mais seulement des moyens de contrôler la maladie voire d'obtenir de longues périodes de rémission. Cette maladie constitue ainsi un fardeau à la fois physique et psychologique dans la vie quotidienne des patients qui en sont atteints. Ce projet vise à mieux comprendre les processus moléculaires impliqués dans la maladie en vue de l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

Des travaux récents ont montré qu'un complexe constitué de plusieurs protéines, appelé inflammasome, impliqué dans la réponse immunitaire, pourrait aussi être impliqué dans le développement du Psoriasis. En utilisant un modèle mimant le psoriasis chez la souris via l'application d'une crème, nous souhaitons étudier le rôle de cet inflammasome. Pour cela, sur des souris ayant reçu une application locale de cette crème et présentant donc un psoriasis, nous testerons l'effet de molécules chimiques ciblant ces protéines, sur la disparition éventuelle des lésions de la peau.

Pour ce projet, nous utiliserons un maximum de 144 souris, dans 1 procédure, chaque expérience étant réalisée 3 fois. Cependant, dans un souci de réduction, si après deux séries nous obtenions des résultats statistiquement significatifs, la 3ème série ne serait pas effectuée et nous pourrions n'utiliser alors que 96 animaux. Dans un souci de remplacement, les inhibiteurs utilisés ont déjà été testés et leur effet vérifié in vitro. L'étude de leur effet in vivo est donc maintenant nécessaire. En termes de raffinement et afin de garantir le bien-être des souris, celles-ci seront hébergées (5 souris par cage) dans un environnement enrichi (igloo et baguette en papier). D'autre part, les expériences ne dureront pas plus de 8 jours au cours desquels les animaux seront surveillés tous les jours, et l'application de points limites précis permettra de détecter toute apparition de signes de souffrance durables. Le cas échéant, les animaux concernés seraient immédiatement euthanasiés.

Ce projet devrait permettre l'identification de cibles potentielles permettant la mise au point de nouvelles thérapies pour une meilleure prise en charge du psoriasis.

18278 Ce protocole vient en complément d'un protocole d'expérimentation animale déjà approuvé par le ministère. La réparation tissulaire d'une lésion peut conduire à l'activation de deux processus : la régénération qui correspond à la restauration de la structure du tissu et de sa fonction, ou la cicatrisation qui est caractérisée par un dépôt excessif de matrice extracellulaire affectant l'architecture globale du tissu et sa fonction. La faculté de régénérer certains membres ou organes est retrouvée chez les vertébrés non mammifères ou chez des organismes inférieurs tels que la salamandre, le poisson zèbre ou encore le planaire. En revanche, chez les mammifères, les capacités régénératrices sont restreintes à une courte période périnatale. Cette perte de capacités régénératrices post-natales chez les mammifères adultes suggère la mise en place de mécanismes inhibant la régénération au profit des processus cicatriciels. La compréhension de ces mécanismes pourrait permettre d'améliorer la réparation tissulaire chez le mammifère adulte afin de rétablir les fonctions tissulaires après lésion.

Notre projet consiste à étudier comment les propriétés mécaniques de la matrice extracellulaire contrôlent les processus de régénération chez les mammifères. Cette question sera étudiée dans des modèles de lésion du tissu adipeux chez la souris. Aucun modèle de remplacement n'existe pour étudier le retour à l'intégrité d'un tissu après la lésion. Ainsi, nous avons développé au laboratoire des modèles originaux de régénération et de cicatrisation spontanés ou induits du TA sous-cutané en utilisant différentes souches de souris. Dans ce projet, nous réaliserons une étude comparative de ces modèles en cinétique à différents temps post-lésion et par différentes techniques afin d'identifier les paramètres clés de la régénération. Pour ce projet, afin d'obtenir des résultats statistiquement exploitables, nous avons évalué à 3420, le nombre de souris nécessaires (voir détail en section 3.4.10).

L'ensemble des fondements de la règle des 3R est appliqué dans ce projet :

- Les conditions d'expérimentation font l'objet d'un travail de raffinement continu dans le but d'aboutir à des procédures de travail définies, et avec une procédure de suivi du bien-être animal adaptée aux expériences. En effet, les animaux ne seront jamais seuls en cage afin de respecter le caractère grégaire de la souris. Nous proposons aussi d'enrichir l'environnement des souris, favorisant le bien-être de l'animal.

- Chaque étude est discutée avec l'ensemble de l'équipe de recherche afin de garantir la pertinence de chaque expérience et d'établir un protocole d'étude adapté à l'obtention de résultats fiables permettant d'atteindre l'objectif, en utilisant le minimum d'animaux, et en évitant la répétition des groupes contrôles indispensable à la validation des résultats.

-Même si l'étude de la régénération d'un organe ne peut se faire qu'en utilisant des animaux vivants, de nombreuses hypothèses sont au préalable testées in vitro et in silico. Le recours à l'animal est donc restreint uniquement aux expériences indispensables

L'expérimentation fait l'objet d'une procédure de suivi du bien-être des animaux, adaptée à l'expérience et aux potentiels effets indésirables des procédures, sur l'état global de santé des animaux. Les protocoles sont réfléchis afin d'être le moins douloureux possible pour l'animal (mode et volume d'injection, durée du traitement...) et les études antérieures nous ont permis de mieux appréhender les points limites pour le bien-être des animaux. La surveillance des souris sera réalisée tous les jours. Ceci permettra de proposer des soins adaptés, de sortir de l'étude, ou bien d'euthanasier les animaux en cas de comportements anormaux ou de souffrance (points limite : perte de poids, prostration, poil hirsute).

18279 Mots clés : cancer, modèles tumoraux d'ostéosarcomes, sensibilité au traitement, nouveaux traitements, combinaisons de traitements

La majorité des ostéosarcomes (70%) surviennent chez les adolescents et les jeunes adultes. Les ostéosarcomes ont une dissémination métastatique souvent précoce avec un envahissement fréquent des poumons, ce qui rend ce type de cancer extrêmement complexe à soigner. La chimiothérapie et la chirurgie conservatrice sont aujourd'hui les traitements préconisés mais avec des séquelles qui peuvent être importantes, c'est pourquoi il est important de trouver de nouvelles combinaisons prometteuses. Pour ce faire des modèles d'ostéosarcomes implantés en orthotopique (càd situé à son emplacement anatomique habituel) à savoir en intra-tibial ont été développés, afin de suivre le développement tumoral chez la souris. En effet, l'étude de modèle in vivo en orthotopique permet de mimer au mieux la maladie existante chez l'homme, en impliquant l'organe concerné, plutôt que d'implanter le modèle en sous-cutané. Au cours de cette étude, le contexte des immunothérapies rend nécessaire l'utilisation de souris immunocompétentes (dont le système immunitaire est intact) dans une situation qui prend en compte l'organe impliqué. Au cours du précédent protocole le développement des lignées cellulaires d'ostéosarcomes lors d'implantation orthotopique dans un organisme vivant entier (lignées cellulaires K7/M2 et MOS-J) a été déterminé, afin d'appréhender au mieux les points limites associés à la procédure d'implantation. Ce second projet vise maintenant à tester l'effet de molécules anticancéreuses dans ces modèles tumoraux.

Retombées attendues : Cette étude permettra de mettre au point de nouveaux traitements contre l'ostéosarcome, en combinaison ou non, impliquant le système immunitaire.

Cette étude sera réalisée sur souris immunocompétentes avec un effectif total prévu de 912 souris

Prise en compte des 3 R a) Remplacement : cette étude cherche à étudier la croissance tumorale afin de déterminer l'effet du système immunitaire sur la tumeur. Cette étude doit donc être réalisée sur un organisme entier possédant un système immunitaire complet nécessitant ainsi l'utilisation du modèle animal; b) Réduction : la mise au point du modèle a été réalisée, conformément à la saisine précédente, au cours de laquelle la validation de la tumorigénèse a bien été observée. Sur la base de ces résultats, cette étude sera réalisée sur un nombre minimal d'animaux permettant de conclure de façon fiable statistiquement; c) Raffinement : A la suite de l'implantation, de la nourriture mouillée sera déposée dans les cages afin d'éviter trop d'effort aux souris pour se nourrir. Les animaux seront observés quotidiennement la semaine (5 fois par semaine) et seront pesés et mesurés 2 fois par

semaines durant la durée de l'expérience afin de pouvoir réduire, supprimer ou soulager leur douleur ou leur détresse et ainsi améliorer leur bien-être ; toutes les précautions nécessaires seront prises pour détecter et minimiser la souffrance des animaux dans ce cadre, l'implantation tumorale sera effectuée sous anesthésie et un analgésique sera également utilisé dans les procédures de chirurgie afin d'enrayer la douleur chez l'animal. Si les tumeurs deviennent rouges, nous placerons les souris dans une litière type cellulose pour limiter l'irritation et l'apparition éventuelle de nécrose.

18280 Dans le processus de développement des médicaments, après avoir démontré l'efficacité des molécules candidates sur des modèles *in vitro*, il convient de préparer au mieux le passage aux études chez l'Homme. Pour ce faire, la molécule doit être caractérisée et son métabolisme défini. Si bon nombre de métabolites peuvent être identifiés dans des modèles cellulaires, leur quantification passe souvent par des modèles animaux plus représentatifs de la physiologie. Par ailleurs, la cinétique et l'élimination du produit et/ou de ses métabolites doivent être caractérisées pour anticiper au mieux les doses et formulations à administrer aux futurs patients. Ces résultats permettent donc de comparer l'intérêt et le potentiel des différents candidats d'un même projet et de choisir au mieux l'espèce animale la plus représentative du métabolisme humain pour l'utiliser dans le développement préclinique, puis de faciliter l'extrapolation des doses actives et toxiques avant passage en phases cliniques. Le choix de l'espèce reste conditionné par le mécanisme d'action de la substance étudiée.

Le principe de toutes ces études est l'enchaînement d'une phase d'administration d'un produit (ou d'une association de produits) et d'une phase de prélèvements choisis en fonction des matrices et tissus où le produit ou ses métabolites doivent être détectés et dosés. Les administrations sont ajustées selon celles prévues chez l'Homme (le plus souvent voie orale, intraveineuse ou sous-cutanée) et peuvent être multiples et utilisées en parallèle pour déterminer la biodisponibilité du produit ou celle la plus à même d'assurer une bonne exposition au produit d'étude. Les prélèvements répondent aux besoins d'analyse et sont le plus souvent des prélèvements sanguins, mais d'autres matrices comme le liquide céphalo-rachidien ou la peau peuvent être nécessaires. Pour ces prélèvements et selon les espèces ou besoins particuliers, l'implantation de cathéters transitoires ou permanents peut être nécessaire, et sera alors conduite dans les conditions appropriées d'anesthésie, d'analgésie et d'asepsie.

Les doses de produits sont estimées pour développer les effets pharmacologiques des produits et ne sont pas censées induire de toxicité. Les pratiques de prélèvements sont encadrées par les directives du comité d'éthique et soumises au suivi de la structure en charge du bien-être animal. Enfin, les éventuelles implantations de cathéters sont pratiquées en conformité avec les bonnes pratiques chirurgicales.

L'effectif global utilisé dans ce projet ne dépassera pas 3700 animaux sur 5 ans soit :

- 160 chiens,
- 90 miniporcs,
- 450 primates non-humains,
- 1500 rats
- 1500 souris

Lors de la réalisation des études de pharmacocinétique, la diminution du nombre d'animaux testés passe par l'utilisation de ceux-ci à plusieurs reprises dans la même étude et/ou dans des études différentes, mais aussi par la mise en place de méthodes de dosage plus spécifiques permettant de prélever des volumes sanguins plus faibles et de limiter les interactions entre les produits administrés, contribuant ainsi à une diminution du nombre d'animaux utilisés.

De plus, le contenu de ces études intègre les impératifs éthiques tels que la maîtrise des modalités d'administration et de prélèvement, le respect des standards d'hébergement et d'enrichissement du milieu spécifique à chaque espèce étudiée mais aussi la prévention de toute douleur, détresse ou inconfort chez l'animal.

Les expérimentateurs sont formés et habilités aux gestes techniques impliquant l'utilisation des animaux et à l'observation des signes cliniques relatifs au bien-être de l'animal. Enfin, une attention particulière est portée à la réutilisation d'animaux issus d'autres projets, et au possible placement dans le cadre de nos procédures internes et après approbation vétérinaire contribuant ainsi à l'application de la règle des 3R : remplacement, réduction et raffinement.

18281 Des études épidémiologiques ont montré que certains vaccins, comme le vaccin contre la tuberculose (le BCG), le vaccin contre la rougeole, le vaccin antipoliomyélitique oral vivant, ou encore l'ancien vaccin contre la variole (le virus de la vaccine) protègent au-delà de la maladie qu'ils ciblent, qu'ils protègent contre d'autres causes de morbidité et de mortalité.

Des études précliniques principalement chez la souris, et plus récemment des essais cliniques chez l'humain, ont par la suite mis en évidence que, dans le cas du BCG, la protection étendue au-delà de la tuberculose est médiée par des cellules innées aux fonctions de défenses immunitaires améliorées, y compris longtemps après la vaccination. Le terme d'immunité entraînée, aussi appelée mémoire immunitaire innée, décrit ce nouveau paradigme. Cette mémoire immunitaire innée induite par le BCG diffère de la mémoire immunitaire « classique » acquise qui est portée par les acteurs spécifiques de l'immunité (lymphocytes B, anticorps (Ac) et lymphocytes T) pour ses caractéristiques et ses mécanismes. En particulier, la mémoire innée n'est pas spécifique d'un agent infectieux et elle persiste moins longtemps. Elle modifie les cellules souches et progénitrices hématopoïétiques de la moelle osseuse, et cette éducation est transmise à leurs cellules filles qui sont les cellules immunitaires innées effectrices retrouvées dans le sang et les tissus et qui assurent une première ligne de défense immunitaire contre les infections. L'induction d'une mémoire immunitaire innée locale, indépendante de l'hématopoïèse (qui assure la formation des cellules sanguines) a également été démontrée dans le cas des macrophages des poumons après une infection respiratoire.

Le but de ce projet est d'identifier les vaccins et les pathogènes capables d'induire cette mémoire immunitaire innée et d'élucider les mécanismes sous-jacents, de façon à pouvoir exploiter la mémoire immunitaire innée pour optimiser les vaccins.

Il est aujourd'hui impossible de reproduire in vitro ou in silico la complexité d'une vaccination ou d'une infection virale et d'une réponse immunitaire de l'organisme. Le recours à un modèle animal est donc nécessaire pour apporter un maximum de connaissances et de compréhension avant la réalisation d'essais cliniques chez l'humain. Le modèle primate non-humain, par sa proximité génétique avec l'être humain, est le modèle le plus pertinent pour étudier les réponses immunitaires.

Dans ce projet, nous comparerons plusieurs vaccins et adjuvants commerciaux ou en cours de développement, ainsi que des pathogènes qui provoquent des infections aiguës ou chroniques pour leur capacité à modifier le système immunitaire inné à long terme.

Sur une durée de 5 ans, nous estimons que cela reviendra à tester une dizaine de formulations différentes. Pour cela, il est prévu d'utiliser au maximum 60 animaux (soit une moyenne de 12 animaux par an) nés et élevés en captivité dans un établissement agréé. Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux sera réduit au minimum nécessaire permettant une interprétation statistique fiable des résultats. Les méthodes expérimentales (comme les prélèvements sanguins et tissulaires) ont été définies de manière à éviter toute souffrance des animaux lors des interventions (par exemple limitation des volumes sanguins prélevés ; expositions aux virus et injections des vaccins réalisées sous anesthésie générale, pose de puces électroniques pour le suivi de la température). Les critères d'arrêt sont prévus dans le projet en cas d'éventuels effets inattendus d'un vaccin ou adjuvant ou de progression de la maladie. Les vétérinaires de l'installation seront alertés et mettront en œuvre des traitements en adéquation avec la situation. Les animaux seront hébergés en groupe lors des phases d'immunisation et en individuel dans des modules contigus permettant des interactions sociales lors de la phase initiale de l'infection (qui dure une quinzaine de jours). Ils bénéficieront d'un programme défini par la cellule « bien-être animal » de l'établissement pour l'enrichissement de leur milieu de vie et qui sera renforcé lors des phases d'hébergement individuel.

18282 La myopathie myotubulaire est une maladie congénitale très sévère des muscles squelettiques. Cette pathologie affecte 1 garçon sur 50 000, n'a aucun traitement mis sur le marché et conduit dans la majorité des cas au décès prématuré du patient. Elle est due à des mutations dans le gène MTM1 qui code pour la myotubularine, une protéine impliquée dans le contrôle des membranes de la cellule. Dans la pathologie, les membranes cellulaires sont anormales.

Actuellement, un traitement de thérapie génique est en cours d'essai clinique chez l'Homme. Dans cet essai, il est injecté par voie intraveineuse un vecteur de type AAV (dérivé de virus associés à l'adénovirus) qui permet d'introduire le gène humain MTM1 dans les muscles des patients. Ce produit avait été testé au préalable dans des modèles animaux (souris et chiens) et a permis d'obtenir une disparition des symptômes observés. Cependant, les enfants traités actuellement dans l'essai clinique sont âgés de moins de 5 ans. Leurs muscles vont se développer en grandissant avec de nouvelles cellules qui n'auront pas été traitées par le vecteur AAV. Il y a un risque donc de dilution de la protéine MTM1 et donc de diminution de l'efficacité de cette thérapie génique au cours du temps. De plus, pour des raisons de réponse immunitaire, il n'est actuellement pas possible de réaliser une deuxième injection du vecteur de thérapie génique. Ainsi, le but du projet est de proposer un produit qui pourrait être associé au vecteur de thérapie génique dans le cas d'une perte d'efficacité à moyen ou long terme.

Pour cela, nous souhaitons utiliser le modèle murin Mtm1-KO qui reproduit plusieurs symptômes de la myopathie myotubulaire. Nous allons injecter chez ce modèle une dose inférieure à la dose thérapeutique du vecteur AAV-MTM1 afin de simuler une perte d'efficacité du vecteur, c'est-à-dire une perte de la force musculaire, pouvant éventuellement mener à une diminution de l'espérance de vie. Puis nous injecterons une molécule ciblant la dynamine 2.

La dynamine 2 est une protéine anormalement élevée dans le contexte de la myopathie myotubulaire. Il a été montré récemment que la réduction de ce niveau excessif de dynamine 2 pouvait corriger les symptômes de la maladie dans le modèle murin.

En tenant compte du bien-être des animaux, nous avons conçu les procédures expérimentales en respectant les 3R.

Remplacement : il n'existe pas de moyen de remplacer l'utilisation d'animaux pour l'étude de cette pathologie, car bien qu'un modèle cellulaire existe (Lawlor, Alexander et al. 2012), il ne permet pas d'étudier certains défauts majeurs observés dans la maladie, notamment les défauts de structure de la fibre ou la perte de force musculaire. Le modèle murin utilisé ici présente une espérance de vie réduite avec la manifestation des premiers symptômes à l'âge de 3 semaines. Les souris présentent alors une faiblesse musculaire, une réduction du poids corporel et de la surface des fibres musculaires. La diminution de la force musculaire de ces souris est l'un des symptômes majeurs influant sur l'espérance de vie puisque l'animal malade souffrant de faiblesse musculaire présentera des difficultés à se déplacer pour se nourrir, donc une perte de poids pouvant mener à une mort prématurée. Nous pourrions donc évaluer l'efficacité des approches que nous souhaitons tester en établissant une courbe de survie et de poids sur une période de 3 mois et en mesurant la force musculaire et la surface des fibres.

Réduction : Certaines souris issues des croisements mais ne présentant pas de pathologie seront utilisées pour les croisements nécessaires au maintien de la lignée. Afin de limiter le nombre d'animaux, le nombre de souris nécessaire a été estimé à 12 souris par groupe par une étude statistique prédictive (test paramétrique de comparaison de moyenne).

Raffinement : les souris seront surveillées par observation de l'état général et pesées à raison de 3 fois minimum par semaine, afin de détecter toute dégradation de l'état général de l'animal et d'anticiper une mort prématurée, grâce à l'établissement de points limites. La douleur générée par l'injection intraveineuse caudale est légère et les injections répétées dans le sinus rétro-orbitaire se feront sous anesthésie générale. La douleur générée par les injections intramusculaires sera prévenue par une injection intrapéritonéale d'un mélange de deux anesthésiques: kétamine (aux propriétés anesthésiques et analgésiques) et xylazine (aux propriétés anesthésiques, sédatives, myorelaxantes et analgésiques). Pour les animaux malades présentant un défaut de motricité, un aliment spécifique hydratant et nourrissant sera placé au sol de la cage afin de leur faciliter l'accès.

Lors des analyses qui permettront de vérifier que nos traitements améliorent la fonction du muscle, c'est-à-dire la force musculaire, l'animal recevra une injection de kétamine et xylazine, suivie d'une injection d'analgésique de type morphinique ce qui évitera les douleurs intenses éventuelles générées par la procédure. L'animal sera également disposé sur un tapis chauffant tout au long de l'anesthésie lors de ces mesures.

Notre projet durera 3 ans et nécessitera l'utilisation totale de 204 souris.

18283 La fragmentation des habitats induite par l'anthropisation des terres, en particulier avec la construction d'infrastructures linéaires de transports, dont les routes, est l'une des causes majeures reconnues de l'érosion de la biodiversité. Si toutes les espèces sont impactées par la fragmentation des habitats, certaines le sont plus que d'autres.

Les amphibiens font partie des animaux les plus menacés au niveau mondial (Stuart et al. 2004). Ils possèdent un cycle de vie complexe, composé d'une phase terrestre importante et d'une phase aquatique (i. e. reproduction et stade larvaire). Cette dernière est très étudiée, et bien connue par la communauté scientifique chez une grande majorité d'espèces. Les connaissances sur la phase terrestre sont en revanche limitées, du fait de la difficulté de suivre les individus en déplacement à terre comparé à l'observation et à l'écoute dans, ou près des mares. Néanmoins, la phase terrestre joue un rôle important dans la vie d'un amphibien et constitue la plus grande partie de son cycle de vie (e. g. zone de chasse, zone d'estivage, zone d'hivernage). Pour les espèces protégées comme les amphibiens, il est pourtant primordial de connaître la totalité de leur habitat, qu'il soit aquatique ou terrestre afin d'éviter sa destruction.

Aujourd'hui, les avancées techniques permettent de suivre très finement les déplacements d'individus en phase terrestre sur le court terme (e. g. pigments fluorescents), mais également sur le long terme (e. g. radiotélémetrie). La radiotélémetrie permet, à l'aide d'une antenne manuelle, de suivre sur de longues distances les déplacements d'individus équipés d'un émetteur radio avec une précision telle qu'il est possible de les retrouver individuellement afin de pointer leur position par un GPS manuel. Ces techniques ont déjà été validées pour étudier le déplacement en phase terrestre chez certains amphibiens (e. g. Grenouille rousse ; Crapaud calamite ; Pélobate brun).

L'habitat terrestre n'a jamais été étudié chez le Crapaud vert (*Bufo viridis*), espèce en danger d'extinction. Cette étude vise à caractériser les déplacements fins en phase terrestre du Crapaud vert, supposé pouvoir parcourir de longues distances. Le but est d'apporter de nouvelles connaissances, afin de comprendre et de protéger la totalité de l'habitat de cette espèce en danger d'extinction.

Nous proposons d'étudier les déplacements de 50 individus au total, 30 individus adultes (15 mâles et 15 femelles) en phase terrestre durant la période de reproduction (i. e. d'avril à août) et 20 individus adultes (10 mâles et 10 femelles) en période hivernale (i. e. d'octobre à février). Chaque animal sera sexé, mesuré, pesé, identifié à l'aide d'une puce RFID et équipé d'un émetteur radio (masse finale 1,9 g ; autonomie moyenne 6 mois, implanté dans la cavité péritonéale). L'implantation sera préférée au déploiement externe par harnais car cette méthode permet de suivre des individus sur de longues périodes tout en limitant la perte du matériel et de mortalité des animaux équipés ; ce qui permettra par ailleurs de limiter l'effectif (réduction). En effet l'implantation présente des taux de mortalité et de blessures inférieurs au déploiement par harnais chez les amphibiens; qui plus est l'implantation d'émetteurs radio sur des Crapauds verts a déjà été effectué sans mortalité sur 20 individus.

Cette étude s'intéresse uniquement au Crapaud vert, et il ne peut donc être remplacé par une autre espèce, ou un quelconque modèle *in silico* (remplacement). Toutefois, l'effectif des individus testés est réduit à son minimum pour avoir une puissance de test statistique satisfaisante tout en réduisant le nombre d'animaux impliqués dans l'expérience. De plus, des alternatives de raffinement ont été mises en place (manipulation courte limitant le stress, phase de repos après chirurgie, mesures de prophylaxie. . .) afin d'améliorer le bien-être et la santé des animaux utilisés dans le cadre de cette expérimentation.

18284 La néphronophtise est une maladie rénale chronique. Bien que cette maladie soit rare, touchant 1/100 000-1/50 000 personnes, elle représente cependant la cause principale d'insuffisance rénale terminale pendant l'enfance. Une vingtaine de gènes responsables de la maladie ont été identifiés, cependant chez 50% des patients la cause génétique n'est pas encore déterminée. Une mutation responsable de la maladie chez l'homme a été identifiée récemment dans un nouveau gène, ANKS3. Les analyses in vitro à l'aide de modèles cellulaires ont permis d'identifier des partenaires d'ANKS3 impliqués dans les processus de stress et de fibrose. Pour analyser plus en détails les mécanismes d'action conduisant à cette pathologie, des rats portant la mutation humaine dans Anks3 ont été produits en 2017. L'intérêt de ce projet est d'étudier l'impact de la mutation humaine dans ANKS3 dans développement dans la phase aigüe (ou s'effectuent des processus de stress) et la phase de réparation (apparition de la fibrose) du modèle d'ischémie-reperfusion et du modèle d'uniphrectomie.

Pour étudier les différentes étapes de la maladie rénale chronique telles que les lésions fibrosantes, les expériences ne peuvent être réalisées in vitro. En effet, le rein est constitué de plusieurs compartiments types cellulaires qui peuvent agir en synergie lors de la progression de maladies rénales. Cela étant dit, nous effectuons la plupart des expériences de signalisation sur des cultures primaires ou de lignées de cellules rénales en complément des protocoles animaux.

Le travail à l'aide des modèles cellulaires a permis de valider la pertinence du modèle animal choisi et ainsi de réduire le nombre estimé d'animaux pour ce projet dans les 3 années à venir (150 rats) afin de respecter la règle des 3R. Avant la chirurgie, les animaux sont acclimatés pendant une semaine après leur arrivée au laboratoire. Ils sont hébergés en portoir ventilés. La pièce est éclairée de 7h à 19h l'hygrométrie est de 45% et la température est de 18 à 22°C. Les rats sont au nombre de 2 maximum par cage. Ils ont un accès libre à l'eau et à la nourriture sous forme de croquettes. La litière à base de cellulose est composée de différents éléments, de taille différente (matière compacte initialement, décompactée par les animaux) et est enrichie de bûchettes en peuplier de taille moyenne, sans traitement chimique et autoclavables (les animaux les rongent, les déplacent et montent dessus). Grâce à l'expérience de notre unité dans ce type de pathologie dans un souci de respect du bien-être des animaux, nous utilisons des anesthésiques pendant la procédure expérimentale et des analgésiques en périopératoire, puis 3 fois par jour après la chirurgie pendant 48h. Nous avons aussi prévu de mettre en place des critères d'interruption des procédures expérimentales basés sur des paramètres mesurables non-invasifs tels que la variation du poids corporel, la mesure de la pression artérielle ou encore la surveillance du comportement des rats. Ainsi, nous pourrions éviter des souffrances inutiles.

Enfin, ce modèle apportera des nouvelles connaissances de la néphronophtise et permettra de faire un pas supplémentaire vers le développement de stratégies thérapeutiques ciblant tout particulièrement ANKS3.

18285 *Salmonella enterica* est un genre de bactérie composé de 4 souches majeures : *Salmonella* Enteritidis, Typhimurium, Paratyphi A et Typhi. Les deux premières causent des gastroentérites et les autres déclenchent des fièvres typhoïdes. *Salmonella* infecte différentes espèces dont l'Homme, sauf *S. Typhi* qui est exclusif à l'Homme. La principale cause d'infection se fait par l'ingestion d'aliments infectés. Les infections à *Salmonella* sont un problème de santé majeur dans les pays en développement et elles réémergent dans les pays développés, entraînant plus de 200 000 décès par an. Du fait de la diminution de l'efficacité des traitements antimicrobiens à cause de l'apparition de souches multi résistantes, la création d'un vaccin efficace contre les 4 souches de *Salmonella* serait une alternative à la lutte contre *Salmonella*.

Les muqueuses représentent la voie principale d'entrée de *Salmonella*. La vaccination muqueuse permet l'induction de réponses immunitaires au niveau de ces muqueuses mais reste à ce jour inefficace.

Dans ce projet, nous souhaitons évaluer l'efficacité d'une nouvelle stratégie de vaccination basée sur un ciblage vaccinal des muqueuses à l'aide d'anticorps. Nous souhaitons en particulier étudier les réponses immunitaires induites par cette stratégie vaccinale chez la souris.

Ces études commenceront par la vérification des hypothèses in vitro mais nécessiteront une confirmation in vivo pour suivre l'activation physiologique du système immunitaire de l'animal après immunisation par voie orale.

Le modèle murin est le modèle de référence pour évaluer la réponse humorale et la protection, notamment dans le cas d'infection à Salmonella. Le nombre d'animaux a été réduit au maximum sans entraver l'interprétation des résultats et leur significativité au plan statistique

Etant donné les expériences nécessaires à la mise en place du projet, un nombre minimal de souris a été fixé permettant une bonne analyse des résultats. Ainsi, un maximum de 1068 souris sera nécessaire pour une étude scientifique pertinente.

Chaque animal bénéficiera d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. Par ailleurs, ils seront hébergés en groupes dans un environnement enrichi (copeaux, matériel de nidification, bâtonnets à ronger). Enfin, l'eau et la nourriture sont mises à disposition en permanence.

18286 La cachexie cancéreuse est un syndrome multifactoriel auquel est exposée la majorité des patients souffrant d'un cancer. Elle conduit à une perte massive de masse musculaire associée ou non à une perte de masse grasse. Cela affecte de façon importante la réponse aux traitements anti-cancéreux, la qualité de vie, l'autonomie et l'espérance de vie des patients. Il est donc indispensable d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans la cachexie cancéreuse pour élaborer des stratégies visant à améliorer le quotidien des malades et leur survie. Ainsi, notre premier objectif est d'identifier les mécanismes conduisant aux altérations musculaires dans un modèle murin de cancer du pancréas. L'activité physique, connue pour améliorer les fonctions musculaires pourrait contrecarrer ces altérations. Notre second objectif est donc d'évaluer l'impact de différentes modalités d'activité physique (AP) sur la cachexie cancéreuse. Pour se faire, nous aurons quatre groupes d'animaux. Un groupe de souris saines (n=15), un groupe de souris cancer (n=15), un groupe de souris cancer qui réalise un entraînement sur tapis roulant (n=15) et un groupe de souris cancer qui réalise de l'activité physique spontanée sur roue d'activité (n=15).

Ce projet de recherche a été pensé en respectant au mieux la règle des 3R. Remplacement: ce modèle expérimental in vivo ne peut pas être remplacé par un modèle in vitro car il résulte d'un dialogue entre la tumeur, le sang et le muscle. Réduction: Le nombre d'animaux a été déterminé afin d'obtenir des valeurs statistiquement significatives et scientifiquement irréprochables pour valider les données obtenues à la fin de la procédure. Dans notre étude, 60 souris mâles seront utilisées pour répondre à ces exigences statistiques. Raffinement: les animaux seront hébergés dans une structure agréée qui tient compte de l'éthique animale. L'hébergement se fait dans des cages munies de jouets afin de minimiser le stress induit par l'hébergement. Le raffinement est complété par une surveillance journalière des animaux pour s'assurer que les conditions de bien-être sont respectées. En cas de souffrance constatée, toutes les mesures nécessaires pour réduire la souffrance seront mises en place (anesthésie, analgésie et/ou sortie du protocole).

18287 Au cours de la mise en place de l'obésité, l'information en provenance du tube digestif et plus particulièrement de l'absorption des substances nutritives n'est pas correctement traduite. Elle ne parvient plus au cerveau qui ne peut plus interpréter les données produites par l'organisme après le repas. Nous avons montré que le dysfonctionnement provient d'une modification d'un système qui joue normalement le rôle d'intermédiaire. Notre étude vise à tenter de rétablir le fonctionnement correct de ce système et donc de tenter de combattre les effets de l'obésité chez l'homme. Ceci sera réalisé en fournissant de façon continue plusieurs molécules qui ont déjà montré une efficacité in vitro. Cependant, le système qui est ciblé par notre solution est enfoui profondément au niveau de l'abdomen ce qui rend difficile son accès par ces molécules. C'est pourquoi, nous positionnerons d'abord un système permettant l'accès à cette zone au moyen d'une méthode chirurgicale minimalement invasive classiquement utilisée maintenant chez l'homme pour réduire la douleur post-opératoire: la coelioscopie. Le geste de l'opérateur sera guidé par un logiciel de navigation lui-même aidé par l'imagerie du système visé. Après deux semaines qui sont nécessaires pour rétablir

la fonction du système de détection, nous réaliserons une seconde imagerie non invasive pour mesurer le degré de restauration du système de détection. Nous espérons que cette étude conduira à la création d'une nouvelle thérapeutique destinée au patient obèse pour prévenir les plus graves complications de cette maladie.

L'utilisation des animaux est nécessaire car nous devons démontrer que l'efficacité des substances testées *in vitro* se double d'une efficacité *in vivo* au niveau d'une structure difficile d'accès. Nous devons également vérifier l'absence d'effets secondaires négatifs sur le métabolisme général de l'animal.

Notre étude utilisera 18 porcs miniatures rendus obèses par un régime alimentaire fourni en quantité importante. Six animaux seront affectés à l'une des trois substances à tester. Le groupe contrôle sera obtenu grâce à la ré-utilisation de données expérimentales déjà acquises de façon à limiter le nombre d'animaux utilisés. Ce nombre est le minimum nécessaire vis à vis de la variation du paramètre que nous désirons mesurer - la réactivation du système de détection des informations après le repas.

L'objectif de remplacement défini dans la règle des 3R n'est pas accessible car l'imagerie fonctionnelle, du fait de sa faible résolution spatiale, exige un abdomen de taille importante. De même, la mise en place par coelioscopie du dispositif ne peut se réaliser que chez un animal de taille proche de l'homme. Ces deux particularités conduisent à l'utilisation de l'espèce porcine comme modèle animal. Notre programme fait appel à de nombreuses méthodes dites non ou minimalement invasives afin de respecter les objectifs de réduction et de raffinement de la règle des 3R. En effet, toutes les méthodes employées constituent l'état de l'art en la matière. Elles sont également minimalement invasives de façon à limiter le nombre d'animaux soumis au volet chirurgical qui est lui-même réalisé par coelioscopie, une méthode qui limite la douleur post-opératoire et qui favorise une récupération rapide.

18288 L'objectif de ce travail est d'évaluer le potentiel thérapeutique de 4 molécules dans un modèle génétique murin du Syndrome de l'X Fragile (SXF). Le SXF est une maladie génétique qui est à l'origine de troubles mentaux et d'un syndrome de type autistique. Les patients atteints par cette syndrome présentent plusieurs altérations comportementales, tels que l'hyperactivité, l'anxiété, des déficits du comportement social et de mémoire, et de la perception acoustique. Nous avons largement contribué à la caractérisation de ce modèle murin de SXF sur le plan comportemental à la fois au niveau moteur, émotionnel, cognitif et social et nous pensons qu'il constitue un excellent modèle pour évaluer les effets de molécules potentiellement thérapeutiques. Pour cela nous déterminerons le phénotype comportemental en réponse à un traitement à l'aide de 4 molécules dont le mode d'action nous permet de penser qu'elles pourraient atténuer les troubles comportementaux du syndrome de l'X fragile. Le traitement sera préalablement réalisé sur des souris non génétiquement modifiées, afin de choisir la meilleure dose. En nous basant sur les données de la littérature, 3 doses par molécules seront utilisées. Ces trois doses seront étudiées simultanément pour n'avoir qu'un seul groupe contrôle. Une fois la dose utile déterminée, l'effet de chaque molécule à la dose sélectionnée sera étudié sur le modèle murin du SXF. Enfin, nous évaluerons les effets de traitements chroniques de chaque molécule au niveau comportemental et du cerveau.

Le REMPLACEMENT de l'utilisation d'animaux ne peut pas être envisagé dans le cadre de nos études, car il n'est pas possible de remplacer les essais *in-vivo* pour tester l'efficacité des nouveaux traitements pharmacologiques. Seule l'utilisation d'animaux est possible lorsque l'on veut étudier les effets comportementaux liés à une pathologie et à l'action de molécules susceptibles d'atténuer les perturbations comportementales. Le nombre d'animaux total prévu est de 500, ce qui est le minimum pour réaliser ces études. Étant donné la variabilité interindividuelle existante dans le comportement des souris un effectif par groupe de 10 animaux est nécessaire. En plus, les mêmes animaux seront utilisés pour plusieurs tests dans la limite possible du bien-être de l'animal. Le nombre défini est donc REDUIT au minimum pour pouvoir répondre aux objectifs du projet. Tout au long de la réalisation des expérimentations, toutes les mesures seront prises pour répondre au bien-être des animaux par des mesures de RAFFINEMENT, notamment par la qualité d'accueil et

d'hébergement des animaux, des méthodes de tests comportementaux non-invasives, et le sacrifice par des méthodes non traumatiques. Des points limites sont définis tout au long du projet et seront suivis de manière rigoureuse par du personnel compétent et soucieux du bien-être animal. Le traitement sera réalisé chez des souris adultes (4 à 5 mois) sauvages et mutantes chez lesquelles les perturbations sont installées depuis longtemps. Afin de limiter au maximum le stress des animaux, une habitude à l'expérimentateur par manipulation quotidienne légère est réalisée. Un seul expérimentateur manipule les animaux pendant toute la durée de l'expérience. La majorité des tests comportementaux n'est pas invasif, douloureux ou ne nécessite pas de privation alimentaire ou hydrique. Néanmoins, les animaux sont habitués à la pièce expérimentale et au dispositif. Tout ceci diminue le stress des animaux et améliore la fiabilité des tests comportementaux.

18289 La sérotonine (5HT) est une molécule sécrétée par certains types de neurones et intervient dans de multiples phénomènes physiologiques. Certaines tumeurs sont à l'origine d'une production en excès de sérotonine. L'exposition des valves cardiaques à la 5HT, sécrétée par des tumeurs du foie, est à l'origine de la survenue d'une atteinte cardiaque dite carcinoïde, pathologie associée à un taux de mortalité élevé chez l'homme. La 5HT tumorale va entraîner des modifications majeures de la structure des valves cardiaques. A ce jour, il n'existe aucun traitement pharmacologique efficace pour traiter cette atteinte carcinoïde cardiaque, et le seul traitement est le remplacement de la valve lors d'une chirurgie cardiaque. La création d'un modèle expérimental murin ayant une atteinte cardiaque carcinoïde, non développé à ce jour, permettra d'évaluer l'efficacité de traitements pharmacologiques, avant de les tester chez l'homme. Une demande APAFiS, acceptée par le comité d'éthique local, a déjà été effectuée pour la création du modèle murin de cardiopathie carcinoïde, ayant permis de faire des expériences préliminaires. Des tumeurs ont été implantées au niveau du foie des souris révélant une bonne tolérance des animaux avec une survie à moyen terme suffisante pour une analyse de l'évolution de l'atteinte cardiaque sur plusieurs semaines.

Cette demande d'autorisation expérimentation animale a pour objectif de détailler les procédures d'imagerie in vivo réalisées chez ces animaux. Les animaux sont imagés à l'aide d'une TEP-IRM (Tomographie par Emission de Positons-Imagerie par Résonance Magnétique) dédiée au petit animal. Dans une première partie du projet et en vue de mettre au point et optimiser les paramètres d'acquisition des données d'imagerie, un nombre restreint d'animaux seront imagés puis euthanasiés. Des prélèvements d'organe sont effectués et le calcul de la radioactivité restant par organe est effectué par compteur gamma. Ainsi il sera possible de corréler les données d'imagerie in vivo avec les mesures ex vivo. Ceci permettra la détermination du temps d'imagerie post-injection optimal. Dans ce projet, la mise en place du modèle est réalisée dans un autre établissement utilisateur (APAFiS validée). Les locaux de l'équipe dans lequel le modèle animal est produit sont sur le même site que le lieu de l'imagerie. Le jour de l'expérimentation, les animaux sont amenés le matin sur le site de réalisation des imageries permettant leur acclimatation entre le transport et l'expérimentation. L'acquisition des données d'imagerie est réalisée l'après-midi. A la suite l'imagerie, et ce pendant 24 heures, les animaux sont maintenus sur place, dans une armoire ventilée, thermorégulée, avec un cycle jour-nuit en adéquation avec le cycle de l'animalerie de départ des animaux pour permettre la décroissance radioactive. Le lendemain, après contrôle de la décroissance radioactive, les animaux sont ramenés à leur animalerie d'accueil.

L'imagerie est divisée en deux phases, une première séquence d'IRM permet d'acquérir des données morphologiques (acquisition : 10min) suivi d'une séquence TEP (acquisition : 10min) pour les données fonctionnelles des tumeurs et métastases. Une fois, le protocole d'imagerie optimisé, les imageries seront effectuées sur 4 semaines (1 fois par semaine), 4 semaines après implantation tumorale. L'ensemble de la procédure d'imagerie est réalisé sous anesthésie gazeuse à l'isoflurane. Les animaux sont placés dans un lit dédié dans lequel un flux d'air chaud permet un maintien de la température pendant l'anesthésie. Pendant l'ensemble de la procédure d'imagerie, la fonction respiratoire est surveillée avec un ballonnet placé sous l'animal qui permet de juger à la fois de la fréquence respiratoire et à la fois de l'amplitude des phases inspiration/expiration. A la suite de l'imagerie, les animaux sont placés dans une cage dédiée pour leur réveil. Une fois, le réveil validé, l'animal est replacé dans sa cage de départ.

Dans ce projet, la règle des 3R, remplacement, réduction et raffinement sera respectée.

Remplacement. La valvulopathie carcinoïde est un processus complexe faisant intervenir plusieurs organes et types cellulaires, et l'étude de l'impact sur les valves de la production excessive de 5HT ne peut donc se faire que sur des organismes vivants et ne permet pas le remplacement par des études in vitro. En complément de l'expérimentation animale, une analyse d'échantillons prélevés chez l'homme est développée. Cette approche est néanmoins observationnelle et ne permettra pas de répondre à la question de l'efficacité de traitements pharmacologiques sur le traitement de la valvulopathie carcinoïde. Ce projet s'inscrit dans une perspective de développement clinique chez l'homme, et il est donc indispensable d'avoir des données préliminaires avec un modèle animal.

Réduction. Pour cette étude nous utiliserons 74 souris sur 5 ans. Ce nombre minimal a été établi au regard des résultats préliminaires et permettra de réaliser avec un nombre minimal de souris pour les investigations requises. L'imagerie in vivo permet un suivi longitudinal et donc un maintien des animaux après l'expérimentation, réduisant le nombre d'animaux utilisés. Les animaux utilisés lors des premières phases de mise en place de protocole seront maintenus dans l'étude afin de limiter le nombre d'animaux utilisés. 4 groupes d'animaux composés de mâles et de femelles seront étudiés: un groupe de C57Bl6 contrôle, un groupe de C57Bl6 implantées avec des cellules tumorales non modifiées (B16F0, non excrétrices de 5HT), un groupe de C57Bl6 implantées avec des cellules mélanocytaires modifiées (B16F0 TPH1, excrétrices de 5HT) et un groupe de C57Bl6 implantées avec des cellules mélanocytaires modifiées chez lesquelles un traitement médicamenteux (Ganciclovir) permet de stopper la production de 5HT par la tumeur. La mise en place du modèle animal est réalisée dans un autre EU. L'implantation tumorale est réalisée 4 semaines avant la première série d'imagerie à 8 semaines d'âge. L'expérience du groupe de recherche responsable de la chirurgie montre qu'aucun signe de souffrance n'est détecté 4 semaines après chirurgie. A la suite de la dernière séance d'imagerie, l'animal est retourné dans son site de départ.

Raffinement. Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées vont permettre de réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux (anesthésie adaptée pour l'imagerie, points limites spécifiques surveillés avant transport sur le site de réalisation des imageries). Les animaux sont hébergés dans un environnement enrichi par du coton ou des nids en carton et en leur permettant de vivre en groupe de 2 à 5 souris. Des points limites ont été établis pour ce projet pour éviter toute souffrance de l'animal, l'atteinte des points limites entrainera l'euthanasie de l'animal. L'euthanasie des animaux sera réalisée selon les méthodes approuvées par une personne compétente de l'établissement utilisateur.

18290 Les composés alkyl perfluorés (PFC) sont des substances chimiques synthétiques utilisées depuis la fin des années 40, dans une large gamme de produits industriels et de biens de consommation courants. L'exposition humaine aux PFC a lieu via l'eau potable, l'alimentation, les produits de consommation, la poussière et l'air. En raison de la capacité très limitée d'élimination de ces composés par les organismes vivants, les PFC s'accumulent dans les organismes vivants, dont l'homme.

Ces composés sont suspectés d'être à l'origine de troubles métaboliques chez l'homme, ce qui a conduit les autorités sanitaires européennes à les remplacer. Ainsi, plus de 4000 PFC différents sont utilisés dans des produits à usage commercial alors que leurs propriétés toxicologiques et leur devenir dans l'organisme sont peu connus. En raison des effets potentiels perturbateurs métaboliques des PFC chez l'homme, la réduction de l'exposition humaine aux PFC est un véritable enjeu de santé publique.

Dans ce contexte, l'objectif de notre projet est d'identifier des stratégies pour augmenter l'élimination corporelle des PFC, réduire leur accumulation et prévenir ainsi leurs effets toxiques. Pour cela, il est nécessaire d'identifier les mécanismes d'élimination des PFC et de comprendre quels sont les facteurs limitant cette élimination.

Tout d'abord, la contribution des reins, du foie et des intestins à l'élimination des PFC sera évaluée chez deux espèces : le rat comme espèce de référence en toxicologie et le lapin. Chez cette dernière espèce, comme chez l'homme et contrairement au rat, l'élimination des molécules par voie rénale est plus importante que l'élimination par voie biliaire. A ce titre, le lapin représenterait un meilleur modèle pour l'homme.

Quarante-deux animaux seront utilisés pour la réalisation de ce projet, soit 16 rats et 26 lapins.

Les concentrations en PFC dans le plasma, le sérum, les urines, les feces et la bile seront évaluées régulièrement au cours des 120 jours suivant l'administration par voie intraveineuse d'un mélange de 8 PFC représentatifs des différentes catégories de PFC. Cette approche dite « cocktail » permettra d'analyser simultanément le devenir des 8 PFC sur les mêmes animaux et de réduire ainsi d'un facteur 8 le nombre d'animaux qui auraient été nécessaires si les PFC avaient été administrés séparément. Nous n'utiliserons alors au total que 16 rats et 8 lapins. Par rapport aux méthodes d'analyse classique qui nécessitent d'évaluer sur le même animal la totalité des concentrations plasmatiques obtenue après l'administration, l'analyse des données qui sera mise en œuvre permettra également d'analyser simultanément les données des concentrations en PFC obtenues à partir d'un nombre limité de prélèvements par animal (3 prélèvements sanguins par rat et 6 prélèvements sanguins par lapin pour 16 temps de prélèvement au total) et permettra ainsi de réduire considérablement le volume de sang à prélevé par animal (6*3 mL soit 18 mL au lieu de 16*3 mL soit 48 mL pour les lapins, et 3*300 µL soit 900 µL au lieu 16*300 µL soit 4.8 mL pour les rats). Cette approche, qui permet d'analyser des données des concentrations urinaires obtenues avec des animaux différents, permettra également de limiter le temps passé en cage à métabolisme par chaque animal pour le recueil des urines et des feces (24h seulement par rat et 3*24h seulement par lapin 1 jour, 7 jours et 14 jours après administration des 8 PFC).

De plus, l'élimination rénale jouerait a priori un rôle majeur dans l'élimination des PFC et il est important de comprendre pourquoi elle est si faible. L'identification des mécanismes d'élimination rénale des PFC sera donc, dans un deuxième temps, basée sur des manipulations pharmacologiques visant à renforcer la diurèse ou à inhiber le transport des anions organiques rénaux suspectés d'être responsables de la réabsorption quasi-totale des PFC au niveau rénal. Le lapin sera utilisé pour cette deuxième partie du projet car il représente un meilleur modèle pour l'homme que le rat pour évaluer les mécanismes d'élimination. Les lapins seront répartis en trois lots de 6 lapins soit un lot contrôle, un lot traité au mannitol pour forcer la diurèse, et un lot traité au DBSP inhibiteur de certains transporteurs anioniques. Cette approche constituera les bases de l'élaboration de stratégies de remédiation visant, soit à limiter l'accumulation, soit à augmenter l'élimination corporelle des PFC déjà accumulés.

Pour les deux parties du projet, il n'est pas possible de se passer d'animaux car le devenir d'une molécule dans un organisme (pharmacocinétique) n'est pas prévisible par des études in vitro compte-tenu de la complexité des mécanismes (absorption, destruction par la flore intestinale, métabolisme hépatique, diffusion tissulaire, élimination rénale, ...).

Les rats et les lapins seront hébergés dans des milieux enrichis: tunnels et papier pour faire des nids pour les rats, bois à ronger pour les lapins. Excepté lors de l'hébergement en cage à métabolisme, les animaux seront hébergés en groupe. Les animaux seront observés deux fois par jour au cours de l'étude et au moins une fois par jour les weekend et jours fériés.

18291 Les myopathies sont des maladies affectant les muscles et les nerfs associés, se traduisant par une dégénérescence ou une destruction des tissus entraînant de graves conséquences fonctionnelles. Elles se manifestent par l'incapacité à se déplacer, à respirer, ou au muscle cardiaque de fonctionner, entraînant la mort. Les myopathies peuvent avoir des origines environnementales (eg. provoquées par une infection) ou génétiques. La plus fréquente des maladies génétiques du muscle est la myopathie de Duchenne, qui est causée par une mutation dans le gène de la dystrophine. Il n'existe pas de traitement curatif de cette maladie, et la plupart des individus atteints décèdent avant l'âge de 30 ans. La vitesse de développement ainsi que la gravité de la maladie peuvent être très variables entre des individus porteurs d'une même mutation de la dystrophine, ce qui indique que des causes extérieures non génétiques ont un impact sur le

développement de la maladie. Des perturbations de la flore bactérienne naturellement présente chez tous les individus peuvent impacter la maintenance des muscles. Des études publiées montrent qu'en l'absence de flore microbienne des souris ont une masse musculaire réduite comparativement aux contrôles, et que l'administration de composés produits par certaines souches bactériennes peuvent restaurer cette masse musculaire.

Le but de ce projet est de mesurer l'impact de la flore microbienne sur l'établissement de la maladie de Duchenne dans un modèle préclinique. Des modèles de souris modifiées génétiquement en introduisant une version mutée du gène de la dystrophine ont été établis et permettent des études précliniques de cette maladie. Contrairement aux enfants touchés par une déficience du gène de la dystrophine, les jeunes souris ont une régénération musculaire efficace, ne développent pas de fibrose grave ni de pathologie cardiaque. L'évaluation du niveau de régénération musculaire chez ces animaux est une approche utilisée depuis plus de 20 ans pour évaluer les conséquences d'un déficit fonctionnel de la dystrophine. Ce modèle murin est par ailleurs particulièrement intéressant dans la mesure où le rôle du microbiote sur la maintenance musculaire n'a encore été montré que chez la souris. L'utilisation d'antibiotiques à large spectre permet de réduire considérablement l'ensemble de la flore microbienne et son activité biologique au sein des organismes, indépendamment de leur origine environnementale. L'administration d'antibiotiques à des animaux contrôles et mutés permettra d'évaluer l'impact de la flore bactérienne sur la maintenance musculaire, et de mieux comprendre comment des facteurs non génétiques peuvent aggraver et accélérer la maladie de Duchenne chez les patients. Ce projet ayant pour but d'évaluer l'interaction complexe entre la flore microbienne et les fonctions physiologiques de l'hôte, il n'est pas possible de le substituer à des approches expérimentales alternatives n'utilisant pas d'animaux, un remplacement n'est pas possible.

Le présent projet est une étude pilote qui a pour objet de contrôler l'efficacité et la bonne tolérance du traitement antibiotique chez la souris, ainsi que son impact sur la maintenance musculaire, dans une démarche de raffinement des procédures expérimentales et de réduction du nombre d'animaux. Des traitements antibiotiques expérimentaux sont classiquement utilisés en expérimentation pour perturber le microbiote des animaux. Nous utiliserons des spécialités avec autorisation de mise sur le marché pour usage vétérinaire et en santé humaine, à des doses réduites comparativement à la littérature, plus proche des posologies utilisées chez l'homme afin de maximiser le confort de l'animal dans une démarche de raffinement des procédures. Le traitement sera réalisé sur une durée de 4 semaines, avec un nombre réduit à 5 animaux par groupe pour un total de 30 animaux, plus petit nombre possible permettant de s'assurer statistiquement de la reproductibilité des observations, ce qui permet de réduire à son minimum le nombre d'animaux utilisés. La durée du protocole étant de 8 semaines, les conséquences attendues du modèle sur les animaux jeunes sont une perte modérée de la masse musculaire avec une augmentation de la régénération des fibres caractérisable histologiquement. Une mauvaise tolérance au traitement sera identifiée par une perte anormale de poids des animaux, une réduction de la prise d'eau ou de nourriture, une apathie, ou un toilettage absent ou excessif. Une grille de scoring et des points limites seront mis en place. Les animaux seront élevés en groupes, avec des enrichissements environnementaux, et suivis quotidiennement par des zootechniciens spécialisés pour s'assurer de la bonne tolérance au traitement. A l'issue de la procédure expérimentale, et s'ils sont apte à voyager, les animaux seront expédiés dans un autre établissement en vue de réaliser des analyses.

18292 Cette demande d'autorisation concerne la réalisation d'essais de toxicité à court terme aux stades de l'embryon et de l'alevin sur poissons (TG212) pour répondre à des exigences réglementaires. Les données générées, à partir de ces essais, sont essentiellement utilisées pour évaluer le danger pour l'environnement des substances chimiques et éventuellement contribuer à l'établissement du classement correspondant. Les valeurs obtenues peuvent également servir de données d'entrée pour la démarche d'évaluation des risques liés à l'utilisation de ces substances chimiques.

La mise en oeuvre de ces essais dépend à la fois des informations mises à disposition de l'établissement utilisateur par le donneur d'ordre et également de l'objectif spécifique de réalisation. Dans le cadre de l'enregistrement de substances chimiques selon le règlement REACH

(Enregistrement, Evaluation, Autorisation et Restriction des Produits Chimiques), la stratégie expérimentale qui est proposée est conforme aux recommandations de l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Économiques), reprises par l'ECHA (Agence Européenne des Produits Chimiques).

Du fait du caractère répétable de ces essais, la présente demande d'autorisation s'inscrit dans un cadre générique et a pour objet de couvrir 25 essais (1 substance / essai) de toxicité à court terme sur poisson zèbre qui seront réalisés pendant une période de 5 ans et qui vont nécessiter un nombre total de 5250 poissons. La réalisation d'un essai complet nécessite 6 lots de 30 œufs pour une gamme de cinq concentrations et un lot supplémentaire de 30 œufs dans le cas de l'utilisation d'un solvant. Pour réduire le nombre d'animaux, cet effectif minimal a été retenu dans la ligne directrice de l'OCDE 212 pour répondre aux critères statistiques pour la détermination des valeurs de toxicité. La vérification de données disponibles sur la substance soumise à essai sera effectuée, au préalable, et notamment la disponibilité de résultats d'un essai de mortalité en 96h, afin de sélectionner les concentrations d'essais et de ne réaliser que les essais strictement nécessaires. Raffinement : des observations quotidiennes du comportement et des effets sont également réalisées sur les œufs et les larves après éclosion. Dès le 8ème jour une observation des animaux sera faite de manière encore plus précise sur l'état du sac vitellin (source nutritive pour les larves de poisson). Dès que celui-ci a totalement été consommé, même sur un seul des poissons de l'essai, l'arrêt de l'essai est anticipé avant le 10ème jour afin d'éviter toute souffrance inutile.

18293 Le projet : La maladie d'Alzheimer (MA) est une pathologie incurable, diagnostiquée des années après son début. Comprendre les altérations pathologiques cliniquement silencieuses au stade latent de la maladie (c'est-à-dire avant les premiers déficits de mémoire et la neurodégénérescence irréversible) est essentiel pour identifier de nouvelles cibles pour un traitement précoce et probablement plus efficace. L'altération de l'activité synaptique survient dès le stade pré-symptomatique de la MA et est associée à une hyperexcitabilité neuronale et une altération des phénomènes moléculaires impliqués dans la formation et le stockage de la mémoire.

Depuis quelques années, le microbiote intestinal est reconnu comme un important acteur en santé humaine. Des dysbioses (altérations quantitatives, qualitatives et fonctionnelles) ont été décrites dans de nombreuses pathologies intestinales mais également dans de nombreuses maladies psychiatriques (autisme, anxiété, dépression) et neurodégénératives (MA, maladie de Parkinson). Cependant, le lien entre microbiote intestinal et santé humaine est encore majoritairement basé sur des corrélations, et des études fonctionnelles sont nécessaires afin de mieux comprendre ce lien et de pouvoir proposer des thérapies efficaces et potentiellement personnalisées, ciblant le microbiote intestinal.

Dans le cas de la MA, la composition du microbiote des patients au stade déclaré de la maladie est modifiée avec une augmentation des bactéries pro-inflammatoires et une diminution des bactéries anti-inflammatoires. De plus au stade avancé de la pathologie, le microbiote des souris transgéniques modélisant la MA diffère de celui des souris sauvages. La modulation du microbiote peut ralentir la pathologie de la MA et améliorer les performances cognitives chez la souris transgénique. La modulation du microbiote chez des rats âgés modélisant certains aspects de la MA peut également restaurer certains phénomènes moléculaires impliqués dans le processus de mémorisation. Cependant, il n'existe actuellement aucune donnée sur l'impact de la modulation du microbiote sur les altérations de l'activité des synapses au cours de la MA pré-symptomatique.

L'objectif principal de notre projet est donc d'évaluer l'impact de la modification du microbiote par un traitement antibiotique sur l'activité neuronale de l'hippocampe, site initial de la formation et du stockage de la mémoire. La stratégie expérimentale est basée sur l'utilisation de la lignée de souris transgéniques modélisant la MA et sur laquelle la fonction neuronale sera évaluée au stade pré-symptomatique.

A terme, ce projet devrait permettre de mieux comprendre des aspects émergents de la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer, et ouvrir de nouvelles pistes dans le développement de stratégies innovantes pour le traitement de cette maladie neurodégénérative.

Les animaux :

* Type : Souris transgéniques APP PS1 modélisant la MA et souris contrôles C57BL/6j.

* Nombre : Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 480 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

La conformité au principe des 3R :

*Remplacement : Un système vivant intégré est nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu dans le développement de la MA. A l'heure actuelle il n'est pas possible de recréer in vitro la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires rentrant en jeu dans les pathologies liées au vieillissement et dysfonctionnement cognitif de type MA.

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

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

18294 Selon l'OMS, en 2017, les maladies infectieuses sont responsables dans le monde de 17 millions de décès par an, soit un tiers de la mortalité et 43 % des décès dans les pays en voie de développement (contre 1 % dans les pays industrialisés).

Les maladies infectieuses recouvrent un large spectre de pathologies bénignes comme le rhume ou l'angine, mais également très graves comme l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine, les hépatites, le paludisme ou la tuberculose. Si la recherche a permis l'éradication de certaines d'entre elles grâce à la mise au point de vaccins spécifiques et des antibiotiques, il reste encore beaucoup de chemin à parcourir pour que toutes ces pathologies soient traitées.

Dans le cas du développement d'un vaccin anti-infectieux, il convient de s'assurer que le candidat vaccinal permet d'induire une réaction immunitaire spécifique chez l'animal sain après injection, permettant le développement d'anticorps spécifiques contre la pathologie visée, avant la réalisation d'études d'efficacité (challenge vaccinal). Il n'existe pas de méthode alternative à l'heure actuelle permettant de modéliser de manière fiable l'immunogénicité d'un produit injecté dans un organisme vivant. Le recours à l'expérimentation animale est donc nécessaire à l'objectif de ce projet.

Ce projet a pour objectif de caractériser l'immunogénicité de candidats vaccinaux après administration chez la souris, le rat, le hamster, le cobaye, la gerbille, le lapin ou le furet.

En fonction des espèces et des candidats vaccinaux, un nombre différent d'animaux par groupe et par étude sera prévu :

- Souris : 900 individus au total sont prévus dans ce projet, ce qui correspond à 90 individus par étude, avec 6 groupes de 15 individus, et 10 études au cours des 5 années.

- Rat : 900 individus au total sont prévus dans ce projet, ce qui correspond à 90 individus par étude, avec 6 groupes de 15 individus, et 10 études au cours des 5 années.

- Hamster : 900 individus au total sont prévus dans ce projet, ce qui correspond à 90 individus par étude, avec 6 groupes de 15 individus, et 10 études au cours des 5 années.

- Gerbille : 900 individus au total sont prévus dans ce projet, ce qui correspond à 90 individus par étude, avec 6 groupes de 15 individus, et 10 études au cours des 5 années.

- Cobaye : 600 individus au total sont prévus dans ce projet, ce qui correspond à 60 individus par étude, avec 6 groupes de 10 individus, et 10 études au cours des 5 années
- Lapin : 600 individus au total sont prévus dans ce projet, ce qui correspond à 60 individus par étude, avec 6 groupes de 10 individus, et 10 études au cours des 5 années.
- Furet : 600 individus au total sont prévus dans ce projet, ce qui correspond à 60 individus par étude, avec 6 groupes de 10 individus, et 10 études au cours des 5 années.

Pour un total de 5400 animaux en tout.

Dans la mesure du possible, les animaux seront hébergés en groupes en cage ou en enclos pour une plus grande liberté de mouvement et pour favoriser leur comportement naturel exploratoire et social.

Des points limites ont été définis afin de préserver le bien-être des animaux. Un suivi quotidien des animaux sera réalisé afin de détecter tout signe clinique anormal.

Des méthodes permettant de prévenir l'apparition de ces points limites et des soins seront apportés aux animaux lorsque nécessaire (désinfections des plaies, réchauffement, réhydratation, etc).

Ce projet permettra de sélectionner de nouveaux candidats vaccins à visée anti-infectieuse pour les phases d'efficacité, et à terme, pour la mise sur le marché de nouveaux vaccins.

18295 La leptine est une hormone sécrétée par le tissu adipeux dont la fonction principale chez l'adulte est de contrôler la prise alimentaire et le métabolisme énergétique. Cependant cette fonction anorexigène n'est pas présente chez les nouveau-nés. De nombreuses études montrent que la leptine a une fonction neurotrophique aux stades précoces du développement. En effet, des taux optimaux de leptine sont nécessaires pour un développement correct du cerveau. Il a été montré sur des modèles animaux, qu'un déficit de leptine ou au contraire un excès de leptine, en modifiant le développement cérébral, favoriseraient l'émergence de différents troubles métaboliques (obésité, diabète) mais également neuronaux tels que les troubles du spectre autistique.

Le syndrome de Rett est une maladie d'origine génétique, liée au chromosome X, qui altère le développement du système nerveux central et se manifeste par l'apparition de troubles moteurs et intellectuels graves. Il n'existe aucun traitement contre cette maladie. Des études cliniques montrent que les patients souffrant de troubles autistiques ou du Syndrome de Rett présentent des taux anormalement élevés de leptine dans le sang. Les mêmes observations ont été faites sur des modèles animaux de ces pathologies.

Nous souhaitons analyser et comprendre le rôle de la leptine dans la pathogenèse du Syndrome de Rett.

Pour ce projet nous utiliserons un modèle murin du syndrome de Rett : les souris génétiquement modifiées pour inactiver le gène *Mecp2* (*Mecp2*-null). Ces souris récapitulent les symptômes et troubles décrits chez les patients, et ont donc un phénotype dommageable. En effet, ces souris présentent des difficultés respiratoires sévères, des problèmes de locomotion, ainsi qu'une perte de poids (à partir de 30 jours postnatal (P30) pour les mâles et P180 pour les femelles).

Nous utiliserons 596 animaux. Ce projet a été planifié pour appliquer au mieux la règle des 3R, c'est-à-dire la réduction et le raffinement permettant de limiter le nombre d'animaux utilisés. Concernant le remplacement, les études que nous proposons se focalisent sur l'organisation des réseaux neuronaux, lesquelles ne peuvent être reproduites dans des modèles de cultures neuronales ou lignées cellulaires in vitro. De plus, les souris transgéniques permettent de réaliser des expériences sur des modèles de maladies comme les troubles du spectre autistique. Pour réduire le nombre d'animaux utilisés, lorsque cela sera possible, chaque animal servira à plusieurs évaluations comportementales et/ou électrophysiologiques ou biochimiques ou histologiques. Pour optimiser et réduire le nombre d'animaux, trois chercheurs seront mobilisés pour les sessions d'enregistrements électrophysiologiques. Pour les analyses biochimiques et histologiques plusieurs protéines et/ou ARN seront étudiés par animal.

Nous envisageons d'appliquer plusieurs protocoles par expérience afin de minimiser le nombre d'animaux utilisés. Nos études précédentes montrent que pour atteindre une puissance statistique

conséquente, des groupes de 3 à 13 animaux sont nécessaires. Il convient d'utiliser des groupes de 13 animaux pour les expériences de comportement, de 7 animaux pour les expériences d'électrophysiologie, de 3 animaux pour les expériences de biochimie et d'histologie.

Pour les expériences de comportements, les animaux seront habitués à la salle d'expérimentation dans leur propre cage et à la manipulation par l'expérimentateur.

Le bien-être des animaux sera surveillé quotidiennement via la mesure de leurs poids et l'observation de leur aspect physique et comportement. Les animaux seront hébergés en groupe social adéquate. Les cages seront enrichies en tunnels ou dome-home et en matériaux de nidification.

18296 La radiologie interventionnelle est une spécialité médicale consistant à réaliser des interventions guidées par imagerie. Le développement des différents outils, des modalités de guidage et le caractère peu invasif de cette technique comparativement à une chirurgie conventionnelle ont conduit à un essor majeur de cette spécialité. Pour certaines situations aucune alternative efficace ne peut être proposée : l'absence d'opérateur formé et compétent se traduit directement par une perte de chance pour les patients et une augmentation des taux de complication. La sévérité des pathologies impliquées, la fragilité des malades concernés et l'urgence des situations rencontrées rendent difficile son enseignement pratique. Il a maintenant été clairement établi que l'enseignement conventionnel par transmission du savoir technique de l'enseignant à l'élève en cours d'intervention s'accompagne d'une augmentation du taux de complications pour le patient.

A côtés d'enseignements théoriques, nous avons développé des temps de mutualisation d'expérience, de préparation et de suivi des interventions. Si d'un point de vue pédagogique l'enseignement pratique est indispensable, son organisation en cours d'intervention est éthiquement difficilement concevable. Aussi des formations pratiques en dehors des patients ont été organisées. Le développement de modèle de flux synthétique ou cadavérique permettent de se familiariser avec les outils simples. Néanmoins l'implication psychologique et la réalité des éléments restent un frein à leur utilisation exclusive. Des simulateurs informatiques permettent une exposition à des scénarios complexes, mais leur développement est encore insuffisant. L'utilisation d'un modèle vivant permet une immersion totale de l'étudiant et la confrontation à l'ensemble des situations auxquelles il sera exposé par la suite en pratique.

L'anatomie vasculaire comparée et la physiologie artérielle des modèles porcins a permis de développer des situations pédagogiques de mise en œuvre simple pour illustrer les situations de revascularisation, embolisation et thrombectomie pour couvrir le spectre des pathologies rencontrées. Le nombre de médecins à former s'échelonnant en 60 et 90 par période de 24 à 36 mois, un total de 180 cochons sur 5 ans est nécessaire à la réalisation de 2 passages par thématiques pour chaque étudiants (revascularisation, embolisation et thrombectomie cérébrale) à raison de 4 stagiaires par animaux.

La salle de radiologie interventionnelle complète l'installation disponible en simulation et enseignement de la coelioscopie dans notre centre permettant de mutualiser les ressources nécessaires à l'organisation de ces sessions. La mise en place d'un livret de formation électronique national permet le suivi des enseignements et acquisitions.

Ce projet est mené dans le respect de l'éthique animal :

- remplacement des modèles animaux à partir d'un programme de formation associant les différentes techniques pédagogiques et restreignant l'utilisation de modèles vivants aux seules situations n'étant pas accessibles par des modèles synthétiques ou informatiques (en parallèle nous procédons à la mise en place d'un centre national de simulation);

- réduction du nombre d'animaux utilisés : en optimisant le nombre de stagiaires par animaux et en réservant la formation aux médecins avancés ;

- raffinement : en réalisant les interventions sous anesthésie générale dans un centre rompu à la pédagogie par simulation, par des opérateurs référents en cathétérisme animal.

18297 Le bâillement est un comportement retrouvé chez un grand nombre de vertébrés, notamment les poissons, les oiseaux et les mammifères. Chez certaines espèces de mammifères, dont l'humain, ce comportement peut se diffuser d'un individu à l'autre, et l'on parle alors de contagion.

La contagion des bâillements n'a pour le moment été mise en évidence que chez deux espèces de singes non-hominoïdes, les babouins geladas et les macaques à face rouge. L'objectif de la présente étude est de tester l'existence de ce phénomène chez un groupe de catarrhiniens encore peu étudié, en s'intéressant aux mangabés à collier.

Une précédente étude a permis de décrire différents types de bâillements chez les mangabés à collier. Nous cherchons à savoir si ces bâillements sont contagieux chez cette espèce, et si oui à déterminer les potentiels facteurs influençant ce phénomène, en particulier la proximité sociale et phylogénétique entre les individus. Les résultats générés par la présente étude apporteront des éléments de compréhension sur la contagion des bâillements chez les mammifères, notamment sur les déterminants de ce phénomène (comme la socialité de l'espèce) et sur les mécanismes sous-jacents (empathie, « effet caméléon » ou simple contagion).

Onze individus mâles captifs seront testés individuellement. Le paradigme expérimental impliquera la diffusion de vidéos « test » d'individus produisant des bâillements, ou de vidéos « contrôles » d'individus ayant la bouche fermée. Si les sujets testés produisent plus de bâillements face aux vidéos « test », l'existence d'une contagion des bâillements sera mise en évidence. Les résultats générés par cette expérience pourront être discutés au regard de la socialité de cette espèce (groupes multimâles multifemelles, soumis à des dynamiques de fission-fusion, avec des liens affiliatifs complexes).

Afin de tester l'effet de la proximité sociale et phylogénétique entre individus sur la potentielle contagion des bâillements, différentes conditions expérimentales seront prévues dans lesquelles les sujets seront exposés à des vidéos de congénères familiers ou non familiers, mais aussi à des individus d'autres espèces : des babouins hamadryas, et des humains familiers ou non familiers.

Cette expérience nécessitera l'isolement partiel des individus étudiés durant toutes les sessions expérimentales. Cet isolement, d'une durée de dix minutes pour chaque session, se fera dans l'un des compartiments du lieu de vie habituel des sujets. Les singes testés seront toutefois en contact visuel et sonore avec leurs congénères, présents dans les compartiments adjacents. Un individu donné ne sera jamais testé plus d'une fois par jour.

REMPLACEMENT : L'objectif du projet étant de caractériser des comportements, il est obligatoire de travailler sur des animaux vivants.

REDUCTION : L'effectif total envisagé est un minimum pour représenter cette population captive de mangabés mâles, en terme d'âge et de composition de groupe social.

RAFFINEMENT : La procédure expérimentale prévue est non invasive. Les tests auront lieu dans le lieu de vie habituel des singes étudiés. L'isolement partiel des individus, nécessaire à la mise en place de l'expérience, sera de durée limitée et n'impliquera pas de manipulation directe. Les animaux étudiés sont déjà familiers avec cette procédure d'isolement non forcée.

18298 Ce projet constitue une étude pilote pour valider la méthodologie d'excision dermique qui sera utilisée dans d'autres études pour tester un nouveau pansement.

Les brûlures constituent un important problème de santé publique, avec près de 11 millions de personnes dans le monde subissant annuellement des brûlures suffisamment graves pour nécessiter des soins médicaux. Ce problème de santé publique est particulièrement important chez les enfants, qui représentent près de 50 % des brûlés, et pour lesquels le chirurgien décide le plus souvent d'effectuer une autogreffe de peau.

Le nouveau biomatériau testé, en accélérant la cicatrisation et diminuant les risques d'infection et de douleur, pourra permettre la régénération de la peau. Ce nouveau biomatériau a été mis au point après de nombreux tests *in vitro* pour identifier de nouvelles molécules et de nouveaux mécanismes de régénération. Ces tests ont été réalisés par 4 unités de recherches qui réaliseront aussi les analyses lors des futurs projets.

La présente étude va nous permettre de caractériser le processus d'excision (site donneur de greffe), de brûlure puis de cicatrisation sur 4 animaux, des mini-porcs de race Yucatan. Ces animaux ont une peau très proche des humains. Cette étude est une étude pilote qui constituera la méthodologie validée pour 2 expérimentations futures, à but statistique qui démontreront les performances de ce biomatériau sur le site donneur de greffe et dans le cadre des brûlures du second degré profond. L'étude compte 2 répétitions de 2 animaux. Sur le premier animal, 2 excisions seront faites sur les flancs pour le 1er essai et sur le dos pour le 2nd essai créant un site donneur de greffe de peau d'épaisseur totale. Sur le deuxième animal 2 brûlures du second degré profond seront faites. Ces excisions dermiques pourront induire de la douleur chez l'animal. Des médicaments antalgiques seront donnés aux animaux pour soulager cette douleur.

Notre projet s'inscrit dans le respect de la règle des 3R : Remplacer : Ce type de vérification de biocompatibilité et d'efficacité sur un tissu aussi complexe que la peau doit réglementairement être réalisé sur des modèles animaux avant tout essai clinique chez l'Homme et a été préalablement testé in vitro. Réduire : Pour ne pas utiliser un protocole non valide sur les animaux des futures études, cette pré étude nous permettra de définir le meilleur protocole pour les études à but statistique démontrant les performances de notre biomatériau qui suivront. Raffiner : Les excisions chirurgicales ou thermiques seront faites sur un animal anesthésié. Les animaux feront l'objet d'une surveillance quotidienne jusqu'à cicatrisation totale des plaies et des traitements antalgiques par voie générale leur seront administrés.

18299 Ce projet est déposé afin de supporter des tests in vivo effectués dans le cadre de titrage de vaccins. Le « Titrage de l'activité in vivo du vaccin poliomyélitique inactivé » sera déroulé selon les requis de la Pharmacopée Européenne (2. 7. 20). Cette procédure est nécessaire pour vérifier l'activité du vaccin poliomyélitique inactivé. L'espèce utilisée pour le déroulé du test est le rat.

Mise en place des 3Rs durant le projet :

•Remplacer

L'ensemble des tests décrits dans ce projet sont réglementaires et définis dans des Pharmacopées (exemple : Pharmacopée Européenne).

•Réduire

Le nombre d'animaux dépend du « nombre d'animaux par projet » qui est multiplié par le nombre de lots à tester (estimation donnée par le scientifique commanditaire).

A noter que le « nombre d'animaux par projet » est indiqué dans les pharmacopées. Ce nombre peut, néanmoins, être révisé par le scientifique de l'étude basé sur une évaluation statistique.

Pour la procédure « Titrage de l'activité in vivo du vaccin poliomyélitique inactivé » qui se déroule selon les requis de la Pharmacopée Européenne (2. 7. 20) :

le nombre d'animaux utilisé dans le cadre est estimé à 55 rats par lot, 10 lots maximums par an soit 550 rats, soit 2750 rats pour la durée totale du projet.

•Raffiner :

Lors de cet essai :

-Les animaux seront hébergés dans un environnement adapté à l'espèce, au nombre d'individus et à l'âge de ceux-ci,

-Le milieu d'hébergement sera enrichi avec des moyens adaptés à l'espèce,

-Des points limites sont définis et appliqués durant l'étude,

-Une observation journalière des animaux est réalisée dès leur réception jusqu'à la fin de l'étude afin de garantir leur bien-être et identifier au plus tôt l'apparition de potentiels points limites.

18300 Le cancer du sein est constitué de plusieurs sous-types qui diffèrent notamment selon leurs altérations génétiques. Les cancers du sein dont le gène HER2/Neu est amplifié sont très agressifs, mais bénéficient d'une thérapie ciblée qui a permis une augmentation considérable de la survie des patients. Cependant, certains patients ne répondent pas ou deviennent résistants au traitement,

démontrant l'importance d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. L'immunothérapie (qui cible les cellules du système immunitaire) a récemment démontré des résultats spectaculaires dans le cancer du poumon et le mélanome. Des résultats récents ont mis en évidence la présence de cellules immunitaires dans les tumeurs mammaires chez la souris et chez l'Homme, suggérant que leur ciblage pourrait être une option thérapeutique. Notre projet de recherche a pour objectif d'identifier les mécanismes de surveillance des cellules tumorales mammaires par les cellules immunitaires, en utilisant un modèle pré-clinique murin, afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et permettre ainsi de soigner des patient(e)s atteints de cancer du sein réfractaires aux traitements actuels.

Afin d'identifier les mécanismes de surveillance des cellules tumorales par les cellules immunitaires, les souris recevront des injections intra-péritonéales quotidiennes d'anticorps déplétants à un stade de développement précoce (5 à 10 semaines) et la croissance tumorale sera suivie par échographie une fois par semaine. À un stade tardif de développement (20 à 25 semaines), la croissance tumorale sera suivie par une mesure au pied à coulisse. Lors de la mise à mort des souris à des fins expérimentales, les organes seront prélevés pour des analyses de biologie moléculaire et cellulaire. Dans toutes les procédures, l'apparition d'un phénotype dommageable et/ou l'atteinte d'un point limite entrainera la mise à mort immédiate de la souris.

L'absence de diagnostic précoce des tumeurs mammaires chez l'Homme rend indispensable l'utilisation d'un modèle pré-clinique murin pour comprendre le rôle des cellules immunitaires au stade précoce de la tumorigenèse mammaire. De plus, les approches d'injections d'anticorps déplétants proposées dans ce projet ne sont pas envisageables chez l'Homme. Le nombre maximal de souris utilisées dans ce projet (nombre total de 278 souris) a été réduit au minimum nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et reproductibles. Une définition précise des points limites, une utilisation d'un anesthésiant local (tétracaïne) et d'un anesthésiant général (isoflurane), ainsi qu'une surveillance adaptée du bien-être des animaux par des personnels compétents et expérimentés permettra de limiter au maximum toute souffrance animale.

18301 L'objectif de l'étude est de valider la pertinence d'une stratégie thérapeutique reposant sur les propriétés neuro-protectrices d'une molécule, dans le traitement de la maladie de Parkinson. La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative débutant généralement entre 45 et 70 ans et caractérisée par l'apparition progressive de troubles moteurs qui peuvent être très invalidant. En effet, deuxième maladie neurodégénérative après la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson est la première cause de handicap chez les personnes âgées. A ce jour, il n'existe pas de traitement permettant de freiner la progression de la maladie. Compte-tenu du vieillissement général de la population, traiter la maladie de Parkinson constitue un enjeu socio-économique et de santé publique majeure. L'objectif de l'étude est d'aboutir à un outil thérapeutique modulateur de la maladie de Parkinson qui permettrait de ralentir, arrêter voire inverser le cours de la pathologie. D'un point de vue scientifique, cette étude permettra d'apporter des connaissances supplémentaires sur la fonction biologique de cette molécule dans le cerveau adulte, en particulier dans le maintien, la fonction ou la survie de certains types de neurones.

Ce projet fait suite à des études préalablement menées in vitro et in vivo sur une molécule ayant un fort effet neuroprotecteur. Une autres molécule très similaire a également montré une efficacité neuro-protectrice dans des cultures de cellules in vitro. Pour mieux confirmer cet effet in vivo dans d'autres modèles de la maladie de Parkinson et envisager un usage thérapeutique, des modèles rongeurs extrêmement référencés dans la littérature scientifique sont nécessaires.

Dans ce projet qui durera 5 ans, au maximum 865 animaux (40 souris et 825 rats) seront utilisées et répartis dans 5 procédures. La première procédure est une étude visant à déterminer la sensibilité neuronale de souris transgéniques déficientes en cette molécule et soumis à une lésion mimant la pathologie de Parkinson. La deuxième et la troisième procédures confirmeront dans un modèle de rat relevant de la maladie de Parkinson, l'efficacité neuro-protectrice et la dose optimale à injecter de la molécule et d'un mimétique de cette molécule. La quatrième procédure permettra de confirmer l'efficacité neuro-protectrice de la molécule et d'un mimétique dans un modèle complémentaire de la maladie de Parkinson incluant une lésion induite par une autre toxine. Enfin la cinquième

procédure, visera à tester une combinaison de traitement utilisant le mimétique associé à une molécule actuellement développé en clinique pour la maladie de Parkinson.

Tout au cours de ce projet, les précautions seront prises pour stresser au minimum l'animal. Dès leur arrivée, les animaux seront hébergés par cage de 5 individus pour les souris et 2 individus pour les rats. Le projet bénéficie du fait que les modèles animaux et les protocoles expérimentaux choisis pour l'étude sont bien décrits dans la littérature scientifique.

L'administration d'anesthésique, d'analgésique avant tout acte chirurgical ainsi qu'un suivi adapté des animaux et la définition précise des points limites précoces et prédictifs d'un mal être, permettent de limiter au maximum la souffrance animale. Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés, un nombre minimum d'animaux par groupe de traitement a été considéré basée sur une précédente étude (15 animaux par groupe pour les rats). La réalisation séquentielle des expérimentations permet de réduire le nombre d'animaux, en effet les procédures 4 et 5 seront réalisées si et seulement si les procédures 2 et 3 sont concluantes.

A l'issue de ce projet, si les propriétés de la molécules étudiées et de son mimétique sont validées dans ces différents modèles, ceci pourrait conduire à un nouvel outil thérapeutique de la maladie de Parkinson.

18302 Le cancer est l'une des principales causes de mortalité dans le monde. Le cancer du poumon est l'un des cancers les plus répandus (en 4ème position en France). La recherche se doit d'être accrue pour pouvoir trouver des traitements plus efficaces.

La radiothérapie est le deuxième traitement le plus utilisé pour combattre le cancer après la chirurgie. Aujourd'hui, les progrès en immunologie ont permis de faire régresser complètement et de façon durable des maladies métastatiques autrefois incurables. Toutefois, l'immunothérapie reste encore inefficace sur certains types de cancers et sur un nombre important de patients. De récentes recherches ont démontré que la combinaison de la radiothérapie avec l'immunothérapie permettrait de mieux combattre la maladie. La combinaison de la radiothérapie et de l'immunothérapie pourrait permettre d'obtenir des réponses partielles ou complètes dans un plus grand nombre de cas. Une synergie entre l'immunothérapie et la radiothérapie est en effet parfois observée chez les patients, mais que trop rarement. Les conditions d'irradiation permettant d'augmenter la fréquence d'apparition de cette synergie chez les patients se doivent d'être étudiées. Ainsi, l'on pense actuellement que l'irradiation, non pas d'un site tumoral, mais de plusieurs sites tumoraux (irradiation à la fois de la tumeur primaire et des métastases) pourrait permettre d'obtenir cette synergie de manière beaucoup plus fréquente. L'irradiation multi-site est donc une voie de recherche à explorer.

En parallèle, de nouvelles cibles thérapeutiques ont vu le jour pour traiter les cancers solides ainsi que les cancers hématologiques en se tournant vers l'apoptose ou mort cellulaire programmée. La dérégulation de l'apoptose fait partie des premières causes de développement et de progression du cancer. Elle joue un rôle majeur dans la résistance aux chimiothérapies, les thérapies ciblées ainsi que la radiothérapie. Les cellules tumorales résistent à l'apoptose en produisant des inhibiteurs de protéines impliquées dans l'induction de l'apoptose. Une nouvelle approche thérapeutique a vu le jour avec une molécule qui bloque l'activité de ces inhibiteurs et restimulent donc la mort cellulaire des cellules cancéreuses. Cette molécule est un antagoniste des inhibiteurs de l'apoptose. De récentes recherches ont montré une synergie entre ce type d'antagoniste et des anticorps qui permettent une meilleure activation du système immunitaire (immunothérapie). Mais pour le moment aucune donnée n'a montré d'efficacité de ce double traitement en combinaison avec la radiothérapie. Etudier les effets que peuvent avoir la triple combinaison est une nouvelle piste de traitement pour les cancers du poumon.

Afin de déterminer l'efficacité de traitement de cette triple combinaison, seul un modèle in vivo pourra nous apporter les informations nécessaires. En effet, le type d'interaction évalué est complexe et inclus le rôle de la radiothérapie sur les cellules tumorales, mais aussi sur le système immunitaire et le microenvironnement tumoral. Il n'existe pas de modèle in vitro permettant une telle étude. Le projet nécessite donc d'être mené sur un organisme vivant disposant notamment d'un

système immunitaire. Nous utiliserons le modèle murin pour notre étude. La radiothérapie utilisée sera une radiothérapie multi-site afin d'être dans des conditions que l'on pense optimale pour induire une synergie entre la radiothérapie et les immunomodulateurs.

Pour ce projet, nous avons mis en place des stratégies d'expérimentation et d'observation afin de réduire au minimum la souffrance et la douleur des animaux. Les souris seront hébergées en groupe pour minimiser le stress de l'isolement. De plus, l'environnement des animaux sera enrichi en permanence par du coton ou des nids en carton afin de diminuer leur angoisse et favoriser leur bien-être. Les points limites seront strictement appliqués. Le nombre d'animaux sera adapté pour atteindre les objectifs du projet et réduire au minimum le nombre d'animaux. En effet, une analyse statistique à priori a été effectuée afin de calculer le nombre d'animaux nécessaires pour détecter des différences significatives tout en réduisant au minimum le nombre d'animaux, qui a été estimé au maximum à 1600 souris sur 4 ans. Le suivi longitudinal des animaux par imagerie sur animal vivant (luminescence) permet de réduire le nombre d'animaux utilisés (augmentation de la puissance statistique, et animal son propre témoin pour certains paramètres). Les animaux seront observés quotidiennement pour détecter tout signe éventuel de souffrance ou de toxicité des traitements. L'imagerie in vivo sous anesthésie non invasive est une méthode optimale et raffinée pour obtenir des données pertinentes sur l'animal vivant. Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommages durables que pourraient ressentir les animaux.

18303 Depuis ces dernières décennies, on assiste à une augmentation importante des maladies inflammatoires du poumon. Une inflammation trop importante ou durable nécessite une réparation prolongée des tissus. Les tissus cicatriciels résultants n'étant pas pleinement efficaces, la fonction de l'organe en est altérée. L'utilisation d'anti-inflammatoire doit permettre de contrôler l'inflammation et ainsi limiter les lésions des tissus.

Les anti-inflammatoires disponibles actuellement ont des activités limitées ou présentent de nombreux effets indésirables. Il apparaît donc nécessaire de mettre au point des traitements anti-inflammatoires efficaces et présentant moins d'effets secondaires.

Notre objectif est d'évaluer l'activité anti-inflammatoire de produits pharmacologiques en cours de développement, candidats-médicaments, dans un modèle d'inflammation pulmonaire créé par administration intranasale de lipopolysaccharides bactériens chez la souris.

Adéquation avec la règle des 3R

Remplacer

Pour réaliser ce projet, l'activité anti-inflammatoire de produits pharmacologiques sera évaluée chez la souris, car c'est l'espèce la plus utilisée pour les études pharmacologiques et le développement d'anti-inflammatoire. A ce jour, aucun modèle moléculaire et/ou cellulaire n'est suffisamment intégré et complexe pour permettre de reproduire l'ensemble des phénomènes biologiques et immunitaires impliqués dans la réaction inflammatoire et les mécanismes de dégradation, d'élimination pouvant affecter l'innocuité, la biodégradabilité, la pharmacocinétique et l'efficacité des candidats médicaments. C'est pourquoi une approche chez l'animal reste une étape indispensable.

Raffiner

La procédure expérimentale est conçue pour garantir le bien-être de l'animal et réduire au maximum l'inconfort, le stress et la souffrance de l'animal. Les souris seront maintenues en groupes sociaux, dans un environnement enrichi de tubes en carton. Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude avec un suivi régulier des animaux. La température corporelle des animaux sera maintenue dès lors que les animaux seront anesthésiés, jusqu'à leur réveil complet. La douleur liée à l'induction de l'inflammation pulmonaire et l'administration des candidats médicaments est une douleur ponctuelle réversible qui fera l'objet d'une surveillance de l'animal. Les animaux seront particulièrement surveillés après l'administration des candidats-médicaments pour pallier à la survenue de tout signe de toxicité. Des critères d'interruption de l'expérimentation en fonction de l'aspect clinique des animaux (évolution pondérale, l'apparence physique général, comportement).

Réduire

Seuls les candidats médicaments sélectionnés sur un ensemble de modèles alternatifs, dont l'efficacité et leur innocuité a été appréciée sur les modèles cellulaires et possédant les caractéristiques physicochimiques adaptées seront évalués chez l'animal. La réalisation de ces procédures par un technicien rompu à ces manipulations garantit une bonne reproductibilité, permet de limiter le nombre d'animaux à engager dans les protocoles et représente la garantie que les procédures n'auront pas à être reproduite, sauf à vouloir confirmer l'activité d'un composé. Nous avons montré que la procédure expérimentale parfaitement maîtrisée permet une évaluation efficace de l'activité anti-inflammatoire à l'aide de 3 à 6 souris pour chacun des groupes, en fonction des paramètres mesurés.

Nous prévoyons d'évaluer l'activité de 15 candidats-médicaments par an sur une période de 5 ans soit un maximum de 1350 souris.

- 18304** Nous proposons l'utilisation de techniques non invasives par imagerie par résonance magnétique (IRM) afin de suivre l'effet de l'anesthésie sur l'activité cérébrale au repos.

Nous souhaitons compléter une étude unique chez le rat afin de visualiser les cartes de connectivité fonctionnelle mesurées en IRM et les corréliser à des phénomènes physiologiques chez l'animal vivant anesthésié. Pour cela, il n'est pas possible de REMPLACER l'animal vivant car nous souhaitons travailler sur les effets des anesthésiques sur l'activité cérébrale.

Néanmoins, la procédure expérimentale non invasive et le RAFFINEMENT des conditions de travail assurent un inconfort minime aux animaux. Le bien-être des animaux sera suivi quotidiennement par du personnel formé 7j/7. Les animaux seront hébergés dans des cages standards aux normes européennes. Les principes éthiques et les standards de raffinement sont utilisés de la naissance à la mort de l'animal. De plus, les procédures considérées dans ce projet prévoient l'utilisation d'une anesthésie générale.

REDUCTION : nous consultons un biostatisticien avant de procéder à l'étude pour s'assurer que nous utilisons le nombre minimal d'animaux pour atteindre le résultat souhaité. Nous avons ainsi estimé nécessaire un groupe expérimental de 10 animaux qui auront uniquement eu une anesthésie et IRM, nous chercherons donc à pouvoir les réutiliser pour d'autres projets du laboratoire afin de respecter au maximum les animaux et réduire leur utilisation en interne. Nous utiliserons donc 10 rats wistar de plus de 300g afin qu'ils soient confortablement installés et chauffés dans le berceau de l'imageur.

- 18305** La cryptosporidiose est une maladie parasitaire intestinale à prévalence cosmopolite et responsable de diarrhées chez les individus immunodéprimés et les jeunes. Zoonose mal contrôlée, elle affecte la santé humaine et animale. Sa transmission est assurée de manière oro-fécale, suite à la contamination de denrées alimentaires ou eaux de boisson par les fèces d'un individu contaminé. Chez les animaux de production, elle conduit à des pertes économiques importantes ainsi qu'à des problèmes sanitaires et environnementaux. Les cibles les plus sensibles sont les jeunes ruminants (veaux, agneaux, chevreaux) en raison de l'immaturité de leur système immunitaire intestinal. Cette pathologie atteint également à la notion de bien-être animal, provoquant symptômes digestifs, déshydratation, retard de développement et peut conduire à la mort de l'animal selon la sévérité des manifestations cliniques précédentes.

La présente demande s'inscrit dans un projet de Recherche finalisé, et basé sur une stratégie innovante visant à mettre en évidence l'effet protecteur de produits naturels, issus de levures, contre la cryptosporidiose chez l'agneau. Dans le contexte « One Health » actuel, ce travail s'insère donc dans une perspective de santé humaine et vétérinaire. La cryptosporidiose survenant dans les jours qui suivent la naissance, l'immunité innée joue un rôle important pour limiter l'infection chez ces sujets naifs ; en effet, il n'y a pas de passage transplacentaire des anticorps maternels chez les ruminants et les anticorps du colostrum ne suffisent pas à protéger le nouveau-né. L'objectif du projet est de renforcer les défenses immunitaires des jeunes animaux grâce à des produits levuriens immunostimulants administrés par voie orale, afin de potentialiser la réponse précoce au parasite

et de limiter, voire éviter, les symptômes cliniques et conséquences sanitaires de cette infection parasitaire.

La stratégie de choix des produits levuriens pour ce projet s'est appuyée sur de multiples expérimentations préalables, ex vivo et in vitro, visant à étudier leur potentiel immunostimulant et leur effet sur le développement du parasite, afin de sélectionner les produits les plus pertinents.

L'espèce ovine a été choisie car elle est très sensible à l'infection et l'accès aux jeunes animaux est facilité grâce aux élevages ovins de proximité.

Ce projet s'inscrit dans la dynamique de respect de la règle des 3 R en expérimentation animale :

- Réduire : Le plan expérimental (nombre d'animaux par lot, nombre de lots expérimentaux, répétition des expérimentations) a été établi de façon à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en s'assurant de l'exploitabilité et de la significativité des résultats

- Raffiner : Les agneaux seront infectés par le parasite *Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*) par voie orale et une surveillance clinique quotidienne ainsi que des mesures non invasives de paramètres biologiques (température, poids) seront assurées. Un enrichissement de l'hébergement adapté à l'espèce a été prévu (agneaux maintenus en groupe pour laisser libre court à leurs interactions sociales dans un parc avec des copeaux) et les critères du point limite ont été définis. Les prélèvements sur animal vivant se limiteront à des prises de sang et récolte de fèces, puis les prélèvements d'intestin et d'organes immunitaires seront faits après euthanasie

- Remplacer : Nous ne pouvons pas remplacer ce modèle in vivo étant donné la complexité de la mise en place des réponses immunitaires et des interactions cellulaires à la suite d'une immunostimulation et de l'infection parasitaire intestinale

Le nombre d'animaux est estimé à 48 : 8 animaux/lot x 3 lots/expérimentation x 2 expérimentations.

Ce projet permettra d'évaluer l'efficacité de produits levuriens pour lutter contre la cryptosporidiose. Le projet est financé par un contrat de recherche avec un partenaire privé et par l'ANRT.

18306 Mesures sur animaux jeunes ou adultes (volailles, porcs) de l'efficacité alimentaire des matières premières, aliments et additifs destinés à l'alimentation des animaux de rentes en élevages de production.

Un objectif majeur des productions animales destinées à l'alimentation humaine est de développer des techniques alimentaires pour optimiser l'utilisation des ressources végétales nécessaires à l'alimentation des animaux : épargne d'énergie, de protéines etc. ...

Ainsi, les progrès dans la connaissance des besoins nutritionnels des animaux et dans l'équilibre des rations ont permis d'améliorer à la fois la croissance des animaux et les indices de conversion alimentaire.

En plus des caractéristiques des matières premières utilisées dont la connaissance doit être sans cesse améliorée, des additifs alimentaires sont développés pour améliorer la digestibilité globale de la ration, donc son efficacité, tout en préservant la santé des animaux voire en l'améliorant.

A chaque étape du développement de ces techniques et des produits, une vérification de l'efficacité est nécessaire sur les animaux en élevage pour mesurer classiquement les performances de croissance et de conversion alimentaire ; des animaux sont nourris avec un aliment témoin (performance attendues connues) et d'autres sont alimentés avec des aliments de composition modifiée et/ou contenant un additif nutritionnel (acide aminé, enzymes, prébiotique ou encore probiotique).

Les conditions d'élevage expérimental sont proches des conditions d'élevage en production ; à des périodes clés de leur croissance, les animaux sont pesés ainsi que la quantité d'aliment consommée ce qui permet de comparer statistiquement l'efficacité des différents régimes alimentaires entre eux.

La période d'essai proprement dite dure entre 8j et 12 semaines en fonction des espèces et des procédures mises en œuvre.

Statistiques.

Le nombre d'animaux mis en expérimentation est déterminé par un test de puissance qui conduit au nombre minimum de sujets ou de répétitions nécessaire pour espérer mettre en évidence des différences significatives entre les effets des différents traitements (un traitement = un régime alimentaire formulé spécifiquement et/ou contenant un produit à tester). (réduction)

Logement.

Les animaux sont logés dans des conditions proches des conditions en élevage classique avec une attention particulière à la maîtrise d'ambiance, la qualité des sols et la limitation des densités (raffinement).

Pour les poulets, au maximum 12 répétitions (12 parquets) par traitements sont mises en oeuvre, elles sont constituées de 15 à 20 animaux dans des dispositifs de 48 parquets (soit 960 animaux au maximum par dispositif) ; le nombre d'animaux utilisés est donc limité au nombre de traitements à tester.

Pour les porcelets en post-sevrage ou en engraissement, en général 12 répétitions (12 cases) par traitement sont mises en oeuvre, elles sont constituées de 1 à 2 porcs dans des dispositifs de 96 cases (soit 192 porcelets ou 96 porc au maximum par dispositif).

Le choix des produits testés sur animaux est si possible issu de tests in vitro qui ont permis une sélection préalable afin de limiter au minimum les tests in vivo (remplacement, réduction) ; cependant, l'efficacité réelle des produits doit être in fine vérifiée sur des animaux mis en conditions d'élevage identiques aux conditions d'élevage en production.

Les besoins de mesures de l'efficacité zootechnique des régimes alimentaires étant permanent pour l'entreprise, le projet est établi pour une période de 5 ans (soit 75000 animaux)

Effectuées par du personnel parfaitement formé selon les bonnes pratiques précisément décrites dans des procédures, les manipulations des animaux sont sans conséquence attendues sur les animaux durant la période d'élevage. (raffinement).

18307 Ce projet de recherche est axé sur le rôle de la protéine matricellulaire appelée hevin dans la réponse aux drogues. Ces protéines interagissent avec la matrice extracellulaire et les cellules, régulant ainsi la fonction des neurones. Deux membres de cette famille ont été impliqués dans la dépression, la réponse aux antidépresseurs et la résilience au stress. Hevin est induit après un stress chronique social dans le noyau accumbens, centre de la récompense, uniquement chez les souris résilientes, c'est à dire celles qui ne présentent pas d'aversion sociale en dépit de l'exposition au stress. De plus, sa surexpression chez les souris susceptibles est suffisante pour inverser l'aversion sociale. Ces observations, ainsi que d'autres données sur le rôle de hevin dans la synaptogénèse et sa présence au niveau des synapses excitatrices, suggèrent que cette protéine matricellulaire est impliquée dans la plasticité synaptique sous-tendant les émotions positives et la motivation. Hevin dans le noyau accumbens régule également les propriétés renforçantes de la cocaïne et de l'alcool. Il est exprimé à la fois dans les astrocytes et dans certaines populations neuronales.

L'objectif de ce projet est de poursuivre la caractérisation du rôle de hevin dans la réponse à la cocaïne et à l'alcool. En particulier, ce projet vise à caractériser les réponses des astrocytes et des neurones du noyau accumbens à des applications aiguës de drogue en absence de hevin. Pour cela, l'activité cellulaire in vivo, aussi bien astrocytaire que neuronale, sera enregistrée par la technique photométrie par fibre qui permet d'enregistrer à l'aide de rapporteurs calciques fluorescents (GCaMP). Ces travaux permettront d'une part d'identifier les voies neuronales et astrocytaires impliqués dans la régulation des effets de la cocaïne et de l'alcool et d'autre part de déterminer le rôle de hevin dans l'activation de ces réseaux cellulaires suite à l'injection de drogue (cocaïne et alcool).

Malgré l'objectif d'utiliser des modèles cellulaires pour réaliser ce projet, les effets des drogues se produisent sur l'organisme entier. Les protocoles décrits dans ce projet sont donc essentiels pour mieux comprendre l'importance des événements moléculaires causés par les drogues sur des circuits neuronaux intacts.

L'impact de hevin sur les effets des drogues sur l'activité calciques dans les astrocytes et les neurones sera testée en utilisant des souris n'exprimant pas la protéine hevin. Les études nécessiteront 140 souris (20 souris adultes du même fond génétique C57BL6/J, 80 souris Hevin-KO, 20 souris transgéniques PV-Cre et 20 souris double transgéniques KO+PV-Cre).

La règle des 3R a été considérée tout au long de l'élaboration de ce projet et sera appliquée au quotidien. Pour le remplacement, des modèles cellulaires (culture neuronale et astrocytaire) sont utilisés pour étudier les mécanismes contrôlant et régulant hevin. Pour la réduction, des expériences précédentes ont permis de définir le nombre minimal d'animaux permettant de générer des données statistiquement solides. Enfin, concernant le raffinement, les animaux seront hébergés avec un cycle jour/nuit adapté et avec la boisson et la nourriture ad libitum. Lors des protocoles d'injection d'alcool et de cocaïne, les souris feront l'objet d'un contrôle quotidien par une personne compétente. Ces contrôles doivent permettre de repérer tout animal malade ou blessé et de prendre les mesures appropriées. L'équipe vétérinaire est présente pour s'assurer que l'animal ne souffre pas face à une gêne, une détresse, une douleur ou une blessure. Si un animal est en souffrance, alors, il sera rapidement euthanasié. Pour les procédures chirurgicales, les anesthésiques kétamine et xylazine dont la durée d'anesthésie est idéale pour la durée de la procédure chirurgicale sont utilisés. Afin d'assurer une prise en charge de la douleur optimal en post-opératoire, le carprofen en péri-opératoire est injecté.

Les protéines matricellulaires représentent un nouveau courant de recherche qui peut amener à comprendre comment les individus s'adaptent aux drogues. Cette recherche est particulièrement novatrice et prometteuse. On est fondé à en attendre des bénéfices pour une meilleure compréhension des désordres psychiatriques en particulier des troubles de l'addiction, mais également permettre une connaissance renouvelée de la plasticité et par la même des bases de l'apprentissage et de la mémoire.

18308 Les maladies métaboliques telle que l'obésité sont caractérisées par des désordres affectant le métabolisme lipidique et énergétique et sont fréquemment associées à des complications cardiovasculaires liées à l'athérosclérose. L'athérosclérose est une pathologie caractérisée par l'accumulation de lipides dans la paroi vasculaire des artères de moyen et gros calibre qui peut conduire à des accidents vasculaires tel que l'infarctus du myocarde.

De par leur dimension multifactorielle, avec une composante lipidique et inflammatoire prédominante, ces pathologies affectent plusieurs organes/tissus (paroi artérielle, foie, tissu adipeux) rendant leur prise en charge particulièrement complexe. Il est admis que ces désordres métaboliques constituent un continuum de pathologies qui se développent de façon simultanée (obésité, stéatose hépatique, résistance à l'insuline, diabète de type 2...). De fait, l'étude de l'ensemble de ces complications doit être abordée de façon globale et intégrée afin de mieux comprendre les voies pathophysiologiques impliquées.

Les macrophages résidents et issus des monocytes circulants sont des cellules immunitaires clés qui contrôlent la dimension lipido-inflammatoire des maladies métaboliques associées à des inflammations chroniques de bas grade. Toutefois l'orchestration complexe des mécanismes moléculaires mis en place dans les macrophages afin de résoudre l'inflammation locale dans un tissu/organe spécifique est encore mal connue. Il est désormais bien établi qu'une alimentation riche en lipides conduit à l'activation métabolique des macrophages laquelle joue un rôle prépondérant dans le développement des désordres métaboliques. L'analyse lipidomique et transcriptomique des macrophages de la paroi artérielle, du tissu adipeux et du foie de souris soumises à des régimes riches en lipides nous a permis d'identifier des réseaux d'interaction de lipides centrés autour de gènes qui signent l'activation métaboliques de ces macrophages en réponse au stress lipidique induit par le régime.

Le but de ce projet est donc de valider l'implication de certains de ces réseaux d'interaction en testant l'impact de gènes et lipides candidats dans l'activation métabolique des macrophages dans le développement des maladies cardiométaboliques. Cette stratégie nous aidera à identifier de nouvelles voies métaboliques impliquées dans les maladies métaboliques lesquelles pourront

représenter de potentielles nouvelles cibles moléculaires en thérapie dans l'athérosclérose et les maladies métaboliques associées aux lipides.

Afin de pouvoir répondre à ces objectifs scientifiques, nous utiliserons le modèle de la souris car il constitue le seul modèle préclinique à l'heure actuelle qui permette d'invalider ou d'induire l'expression de gènes de manière tissu-spécifique et donc de démontrer la fonction des gènes participant aux réseaux d'interaction identifiés. Ce modèle est également incontournable car il a été validé par de très nombreuses études pour la modélisation de l'ensemble du métabolisme glucido-lipidique jusqu'aux aspects pathologiques de développement des maladies métaboliques. Dans le souci de suivre une démarche respectant la règle des 3Rs, une stratégie de production des animaux multi-transgéniques nécessaires à l'étude sera suivie afin de réduire le nombre total d'animaux générés de génotype non désiré et donc euthanasiés. La réalisation de ce projet sera donc rendue possible grâce à l'utilisation de souris qui seront soumises à des régimes riches en lipides afin d'induire spécifiquement le développement de l'obésité et des désordres métaboliques associés tels que la résistance à l'insuline et la stéatose hépatique ainsi que le développement de l'athérosclérose. La taille des groupes expérimentaux a été optimisée afin de répondre aux besoins et de mettre en évidence des différences statistiques en prenant en compte les variations liées à chaque type d'expérience. Ainsi, le nombre requis de souris afin de pouvoir isoler un nombre suffisant de macrophages dans chaque tissu d'intérêt pour réaliser les études et pour ensuite atteindre la puissance statistique nécessaire pour l'analyse des données est de 16 souris (8 pools de 2 souris). L'étude des 10 gènes et 5 lipides candidats dans les différents contextes métaboliques proposée dans ce projet nécessitera donc l'utilisation de 912 souris. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, la taille des groupes expérimentaux a pu être optimisée et ce grâce à l'expérience du personnel réalisant les procédures expérimentales, ce qui permet de réduire significativement la variabilité des résultats attendus. Les mâles seront utilisés dans l'étude de l'activation métaboliques des macrophages au cours de l'obésité et de l'athérosclérose induits par les régimes riches en lipides car ces derniers sont plus sujets au développement des maladies métaboliques, notamment de l'obésité (prise de poids, formation de masse grasse) et des désordres métaboliques associés (résistance à l'insuline, stéatose hépatique. .). Enfin, dans la mesure du possible les animaux seront explorés de manière extensive afin de limiter le nombre de groupes expérimentaux nécessaires pour la réalisation du projet. Les souris seront regroupées dès le sevrage par cage de 4 et les régimes seront initiés à l'âge de 8 semaines. Une période d'acclimatation d'une semaine sera observée avant le début des régimes pour les animaux qui ne sont pas issus de l'animalerie. Les souris seront hébergées dans des cages standard de l'animalerie et suivront donc les conditions de stabulation et d'enrichissement de l'ensemble des animaux de cette animalerie. Les souris seront surveillées quotidiennement et si l'une d'entre elle perd du poids ou est mal portante, elle sera euthanasiée. Les animaux évolueront dans un milieu enrichi pendant toute la durée de l'expérimentation.

18309 Les cancers de la glande cortico-surrénale (corticosurrénalomes) sont des cancers agressifs avec un très mauvais pronostic (survie à 5 ans < 30%). La seule option de soin efficace est l'exérèse chirurgicale de la tumeur primaire. Toutefois, la moitié des patients se présente au diagnostic avec une maladie métastatique. Dans ce contexte, l'utilisation du mitotane (agent adrénolytique) seul ou en combinaison avec une lourde chimiothérapie (étoposide, doxorubicine et cisplatine) ne permet qu'un ralentissement transitoire de la maladie, mais pas de guérison. Les mécanismes à l'origine du développement de ce cancer et impliqués dans la dissémination métastatique sont encore mal caractérisés. Ceci limite les possibilités thérapeutiques et en particulier le développement d'approches ciblées. Des études chez les patients porteurs de ces tumeurs ont mis en évidence des altérations des suppresseurs de tumeurs ZNRF3 et P53 dans 20 à 30% de ces cancers. L'objectif de ce projet est d'analyser l'implication de ces deux acteurs dans la survenue et la progression métastatique des corticosurrénalomes et d'identifier les voies altérées en aval de ces suppresseurs de tumeurs. Pour ce faire, le projet visera à étudier le développement de tumeurs dans des souris invalidées pour ZNRF3 ou P53 individuellement ou en combinaison, ces deux altérations étant retrouvées associées chez les patients portant les corticosurrénalomes les plus agressifs. Les résultats préliminaires de nos collaborateurs montrent une implication des

macrophages dans la modulation de l'agressivité des tumeurs en réponse à l'inactivation de ZNRF3. Afin d'évaluer la contribution de ces cellules immunitaires à la progression des tumeurs des souris invalidées pour ZNRF3, nous inactiverons CCL2, le gène codant la cytokine impliquée dans leur recrutement, dans le contexte d'inactivation de ZNRF3. L'utilisation de modèles de souris génétiquement modifiées pour ce projet est indispensable afin d'évaluer les interactions existant entre ZNRF3 et P53, d'évaluer la capacité des tumeurs à former des métastases et de comprendre le rôle des macrophages dans la progression de ce cancer agressif. A terme, ce projet permettra de disposer de modèles animaux pertinents d'un point de vue clinique et qui permettront d'évaluer de nouvelles approches thérapeutiques. L'aspect concernant les macrophages est de ce point de vue, particulièrement prometteur, ces cellules immunitaires pouvant être mobilisées avec des traitements immunomodulateurs, afin de détruire les cellules tumorales.

Ce projet prévoit la génération par croisements de trois lignées transgéniques dont la progression tumorale sera analysée à trois stades de développement. Ces croisements généreront 1928 animaux. Nous nous efforçons de respecter au mieux la règle des 3Rs.

1/ Remplacement : nos études nécessitent une approche de physiologie intégrée, cependant, dans la mesure du possible, la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la tumorigenèse fera appel à des cultures de lignées cellulaires afin de remplacer et limiter le nombre d'animaux utilisés ; 2/ Réduction : le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et les élevages seront utilisés au mieux puisque les études seront menées sur des mâles et femelles, et la majorité des génotypes produits seront utilisés ; 3/ Raffinement : les animaux feront l'objet d'une surveillance régulière par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié de l'animalerie. Afin de réduire au maximum la douleur et l'angoisse que certains protocoles pourraient engendrer chez les animaux, des points limites ont été définis. En cas d'atteinte d'un point limite, de signes de détresse ou de douleur, les animaux seront sortis du protocole, euthanasiés et autopsiés.

18310 Le traumatisme crânien (TC) est un problème majeur de santé publique lourd de conséquences neurologiques et lésionnelles à court comme à long terme pour lequel il n'existe aujourd'hui aucun traitement. Parmi les mécanismes impliqués, de nombreuses études ont mis en évidence le rôle délétère de la neuro-inflammation dans l'apparition et l'évolution des conséquences neurologiques et lésionnelles post-traumatiques. Ainsi, l'espoir de traiter les patients traumatisés crâniens repose sur la découverte de stratégies thérapeutiques permettant de réduire les handicaps acquis à la suite d'un TC.

Notre projet a pour objectif d'évaluer trois peptides, sélectionnés *in silico*, évalués et montrés efficaces et dénués d'effets toxiques dans un modèle animal de maladie inflammatoire chronique articulaire. Ces peptides entraînent une immunisation active, c'est-à-dire qu'ils induisent une production d'anticorps du « soi » neutralisant une protéine impliquée dans la neuro-inflammation. La réaction immunitaire recherchée, qui nécessite une coopération complexe entre différentes cellules, ne peut être réalisée avec un modèle cellulaire. Au cours de cette étude, les peptides seront injectés aux animaux puis des prélèvements sanguins seront effectués pour évaluer la réaction immunitaire et la neuro-inflammation. Un TC sera induit puis les déficits neurologiques seront évalués par des tests comportementaux. Ainsi, l'efficacité de ces trois peptides immunogènes sera évaluée sur la production d'anticorps, la neuro-inflammation, les conséquences neurologiques et la lésion cérébrale post-traumatiques.

Toutes les expérimentations sur l'animal seront conduites en respectant la règle des « 3R » (remplacer, réduire, raffiner). Réduire : le projet est construit de telle manière que l'ensemble des mesures nécessaires à cette étude (réaction immunitaire ; déficits comportementaux ; lésion cérébrale) soit obtenue sur un même animal. Le faible taux d'échec (10%) des gestes permettra également de réduire le nombre d'animaux. Raffiner : les expériences seront réalisées sur des souris dont l'anesthésie et l'analgésie seront monitorées durant et après la procédure de TC. Les tests comportementaux effectués reposent sur l'évaluation de comportements naturels et spontanés. Par ailleurs, les animaux seront hébergés en groupes sociaux stables, afin de limiter tout stress et modification de hiérarchie. L'eau et la nourriture seront fournis à volonté et le milieu

sera enrichi par des cotons compactés. La mise en place de points limites permettra d'identifier toute souffrance et/ou douleur, et pourra entraîner la mise à mort anticipée des animaux, si nécessaire. Remplacer : les tests de mise au point et de toxicité ont été effectués sur des modèles cellulaires.

En 5 ans, ce projet utilisera 68 souris.

A terme, notre projet pourrait permettre le développement d'un médicament pour les patients ayant subi un TC.

18311 Le myélome multiple (MM) est un cancer de la moelle osseuse où certains globules blancs (les plasmocytes) normalement chargés de produire les anticorps, se multiplient anormalement. Il en résulte une destruction du tissu osseux, associée à une anémie et une susceptibilité accrue aux infections. Lorsqu'il génère des signes cliniques, des traitements sont proposés. Ils allient des chimiothérapies à des autogreffes de cellules souches. Aujourd'hui, les inhibiteurs du protéasome (IP) comme le Bortézomib (BZ) sont au cœur de l'arsenal thérapeutique anti-MM. Le protéasome est un complexe qui assure l'élimination des déchets protéiques dans les cellules. Si on le bloque, les protéines anormales s'accumulent et la cellule meurt. Le BZ attaque plus particulièrement les cellules tumorales car elles ont une activité de synthèse protéique élevée, génératrice d'un surcroît de déchets. Il est particulièrement toxique pour les cellules du MM, car la fonction des plasmocytes est de produire activement des anticorps. En plus de son activité anti-tumorale propre, le BZ potentialise la sensibilité des cellules de MM aux autres chimiothérapies. De plus, il agit sur l'environnement tumoral dans la moelle osseuse en y limitant divers mécanismes favorisant l'implantation et la croissance du myélome, et la destruction osseuse associée. Cependant, chez certains patients les IP induisent des effets secondaires sévères, qui nécessitent l'ajustement ou l'arrêt du traitement. De plus, de nombreux malades développent des chimiorésistances dont les bases moléculaires restent mal comprises. Malgré les avancées permises par les IP, le MM reste incurable avec une médiane de survie d'environ 6 ans et il est important de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Nous avons identifié un nouvel inhibiteur capable d'induire un stress cellulaire associé à la production accrue de déchets protéiques qui, s'il est maintenu, évolue vers un suicide cellulaire. Sur la base de ces données, nous pensons que l'action de cet inhibiteur pourrait potentialiser l'efficacité thérapeutique des IP dans le MM en (1) aggravant l'accumulation de déchets protéiques toxiques dans les cellules du myélome (2) en empêchant leur dialogue moléculaire avec l'environnement de la moelle osseuse. A l'appui de notre hypothèse, des combinaisons de cet inhibiteur et de BZ, insuffisantes pour déclencher seules la mort cellulaire, se sont révélées hautement cytotoxiques sur plusieurs lignées de MM dérivées de patients. Nous déterminerons si ce nouvel inhibiteur permet de réduire les doses efficaces des IP, et ainsi de limiter leurs effets secondaires dans un modèle animal murin. Des résultats précliniques positifs permettraient de valider l'intérêt thérapeutique de cet inhibiteur dans le MM, et ouvriraient la voie à des essais cliniques. Au-delà du MM, l'efficacité de cet inhibiteur pourrait présenter un rationnel dans d'autres formes de cancers connus pour être susceptibles aux IP, tels que le cancer du poumon non à petites cellules, les leucémies et certaines tumeurs solides.

Le bénéfice attendu est le développement de nouvelle thérapie pour le myélome multiple, qui est aujourd'hui incurable et éventuellement d'autres cancers.

340 souris seront utilisées sur 5 ans. Les souris seront greffées avec des cellules tumorales humaines et seront traitées en utilisant ce nouvel inhibiteur. La croissance des cellules tumorales sera suivie afin de déterminer l'efficacité du traitement.

Les effets néfastes de ce projet sont liés au développement de cellules cancéreuses chez l'animal. Les souris pourront devenir léthargiques et maigrir. Les souris seront surveillées, et dès l'apparition de symptômes révélateurs de souffrance, d'inconfort ou de stress, les animaux seront mis à mort. Le projet comporte 4 procédures (respectivement, 28, 108, 180 et 24 animaux) dont le niveau de sévérité attendu est modéré pour chacune d'elle. Les animaux seront mis à mort à la fin de l'étude. Le recours à l'animal est nécessaire. En effet, nous avons déjà validé l'effet de cet inhibiteur sur des cellules en culture et sur des cellules directement prélevées de patients, mais l'efficacité

thérapeutique de cet inhibiteur doit être validée sur un organisme entier. Il existe des souris immunodéficientes qui ne rejettent pas les cellules humaines. Nous pouvons donc leur greffer des cellules humaines de myélome multiple. Ceci nous permet d'étudier leur développement et de tester l'efficacité du traitement sur la croissance des cellules tumorales dans l'organisme pendant plusieurs semaines.

Le nombre d'animaux que nous estimons nécessaire repose sur notre expérience de la conception d'études de ce type. Nous avons consulté un biostatisticien pour être sûrs d'utiliser le nombre minimum d'animaux nécessaire et suffisant pour atteindre l'objectif fixé.

Les souris immunodéficientes seront maintenues dans un environnement protégé pour réduire le risque d'infection. Elles seront hébergées en groupe, avec une litière appropriée, des matériaux de nidification. En cas de besoin les cages peuvent être chauffées, du Diet gel ajouté et les souris réhydratées par voie sous-cutanée. Le traitement pourrait induire des effets indésirables. Les doses sont calculées pour les réduire, tout en atteignant les objectifs scientifiques. Des points limites ont été fixés et les animaux seront euthanasiés s'ils sont atteints.

18312 1-Rationnel et objectifs du projet : Le système immunitaire tient un rôle prépondérant dans la progression tumorale et la réponse aux traitements. Parmi les cellules qui le composent, les lymphocytes T occupent une place centrale mise en avant ces dernières années grâce aux succès retentissants des immunothérapies. Il apparaît donc crucial d'étudier et de comprendre les mécanismes impliqués dans la régulation moléculaire de leurs fonctions. Certains travaux récents ont mis en évidence l'implication de la protéine (X) dans l'immunité anti-tumorale. Dans ce projet, les rôles spécifiques de cette protéine dans la biologie des lymphocytes T seront étudiés dans le contexte du cancer. Pour ce faire, des modèles murins déficients en protéine (X) spécifiquement dans les lymphocytes T, seront transplantés avec des cellules cancéreuses ; la croissance tumorale ainsi que la réponse à différents traitements anti-cancéreux seront évaluées.

2- Retombées attendues dans les domaines de la cancérologie et de l'immunologie : Les modèles développés dans ce projet représentent un avantage incomparable dans l'étude de la biologie des lymphocytes T et leur régulation moléculaire. Cette étude pourrait mettre en évidence des fonctions inédites de la protéine (X) dans l'immunité anti-tumorale et la réponse aux traitements. Enfin, ce projet pourrait faire émerger de nouvelles cibles thérapeutiques dans le traitement du cancer.

3- Conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement : Une série d'expériences in vitro sera réalisée pour étudier le rôle de la protéine (X) dans la biologie des lymphocytes T. Cependant, malgré l'évolution des techniques de culture cellulaire et des sciences omiques, aucune expérience in vitro fiable ne peut, pour le moment, remplacer la réalisation d'expériences in vivo dans l'étude de la croissance tumorale et la validation de cibles thérapeutiques éventuelles. Le nombre d'animaux utilisé dans nos procédures sera réduit au strict nécessaire pour obtenir des résultats biologiquement reproductibles et statistiquement interprétables. Des points limites adaptés et respectant le bien être animal ont été définis au préalable. De plus, afin d'éviter toute souffrance animale inutile, une surveillance journalière des animaux par du personnel qualifié et au fait des points limites des expérimentations sera effectuée. Toujours dans une optique de raffinement, des cellules cancéreuses non métastatiques et dont la croissance n'induit pas de douleurs particulières seront utilisées, pour limiter les effets néfastes de la croissance tumorale. Enfin les animaux disposent de batonnets de coton dans chaque cage afin de diminuer le stress potentiel des expérimentations.

Le nombre maximal de souris utilisées dans ce projet est de 248

18313 L'objectif de ce projet est de déterminer l'effet de la durée de mise sous pression de l'abdomen sur l'efficacité d'une chimiothérapie administrée par voie intrapéritonéale. Chez l'homme, un traitement comparable a été mis en œuvre à partir de 2013 et consiste en l'administration de chimiothérapies sous forme d'aérosol, dans l'abdomen du patient, par voie laparoscopique (coéloscopie) : la PIPAC (Pressurized IntraPeritoneal Aerosol Chemotherapy). Cette technique est donc minimalement invasive. La vaporisation doit améliorer la distribution des agents de chimiothérapie dans la cavité abdominale, et l'application sous pression devrait augmenter la pénétration locale de la

chimiothérapie. Elle est utilisée chez l'homme pour le traitement des carcinomes péritonéaux (présence de très nombreux foyers tumoraux qui ne peuvent pas tous être retirés par le chirurgien). Ce type de cancer disséminé est en général le signe d'une maladie très évoluée et associée à une faible survie (médiane de survie de 3 à 12 mois). Actuellement, le traitement à visée curative de la carcinome péritonéale repose sur la chirurgie de réduction tumorale (pas toujours aisée pour retirer l'ensemble des nodules cancéreux) combinée à la chimiothérapie intrapéritonéale (administrée sous forme liquide directement dans l'abdomen). Cette procédure ne peut être appliquée qu'à des patients répondant à certains critères assurant qu'ils sont capables de la supporter. La PIPAC constitue ainsi une approche nouvelle et de ce fait a été mise en œuvre de façon relativement empirique avec très peu de données disponibles dans la littérature et des effets parfois délétères chez l'homme par manque de connaissance du mode d'action et des doses de chimiothérapie à administrer par cette méthode.

Lors de notre précédent projet validé par le ministère et visant à étudier la technique PIPAC, nous avons pu remarquer que les dispositifs de type "PIPAC" qui existent actuellement chez la souris ne permettent pas de distribuer les aérosols de manière satisfaisante au sein de l'abdomen de l'animal. L'objectif précédent était de montrer une différence d'effet thérapeutique entre la PIPAC et l'IP (technique de référence) dans un abdomen sous pression, ce qui n'a pas été le cas. De fait, nous nous concentrons maintenant sur les effets de la durée de la pression intra-abdominale sur l'efficacité du traitement. Pour ce faire, nous effectuerons uniquement des injections IP avec pression intra-abdominale.

Dans ce contexte, et pour répondre à la demande de chercheurs travaillant sur la prise en charge de la carcinome péritonéale d'origine ovarienne, nous souhaitons étudier deux modèles représentatifs de 2 types de cancer de l'ovaire: SKOV3 et OVCAR3. Les cellules tumorales utilisées étant d'origine humaine, les lignées de souris utilisées sont immunodéficientes. Ces souris sont à phénotype dommageable, mais du fait de leur hébergement en portoir ventilés, aucun phénotype dommageable ne sera exprimé. Les tumeurs seront induites par injection intrapéritonéale de cellules cancéreuses et le temps de pousse tumorale peut aller ensuite jusqu'à 12 semaines. La prise tumorale sera contrôlée une première fois 7 jours après l'induction et une fois par semaine par la suite durant tout le protocole par imagerie de bioluminescence et/ou échographie. La procédure complète (de l'induction jusqu'à la fin des protocoles expérimentaux) ne dépassera pas 12 ou 16 semaines en fonction des procédures.

L'objectif de ce projet consiste pour chaque modèle :

- à étudier l'effet de la pression sur l'efficacité de la chimiothérapie. Plusieurs durées de mise sous pression seront testées : 45 minutes, 30 minutes et 15 minutes. Il est nécessaire de comparer les effets de différents temps de pression sur la pénétration de la chimiothérapie au sein de la tumeur.
- à étudier l'effet de la pression sur la pénétration dans la tumeur de la doxorubicine. La doxorubicine est une micromolécule utilisée en traitement par chimiothérapie du cancer de l'ovaire chez l'Homme.
- à étudier l'effet de la pression sur la pénétration dans la tumeur du bévacizumab. Le bévacizumab est une macromolécule (anticorps monoclonal) utilisée en association avec la chimiothérapie classique chez l'Homme.

La présente saisine concerne donc 192 souris (96 souris par modèle de tumeur), qui seront explorées par imagerie de bioluminescence et/ou par imagerie échographique. D'après notre expérience aucun dommage n'a été observé suite à l'apparition de foyers tumoraux au niveau abdominal, les animaux sont mis à mort avant que les foyers tumoraux puissent générer une gêne ou une douleur. Une surveillance pointue des animaux et la détermination de points limites pertinents seront mises en place dans ce projet pour anticiper tout stress ou douleur généré chez nos animaux.

Ce projet sera mené conformément à la règle des 3R :

- Raffiner : les examens d'imagerie sont non invasifs et seront réalisés sur animaux sous anesthésie générale, et ne susciteront pas de stress important à l'animal. Les traitements IP sous pression seront également réalisés sous anesthésie générale et un antalgique sera administré.

- Réduire : le nombre d'animaux sera limité à 192 souris. La possibilité de réaliser par imagerie un suivi longitudinal au cours du temps nous permet également de réduire le nombre de vies animales mises en jeu.
- Remplacer : la modélisation de l'effet de la pression sur l'efficacité de la chimiothérapie est une discipline complexe et à notre connaissance il n'existe pas de modèle in vitro. La mise en œuvre de modèles animaux pour les études d'efficacité reste nécessaire car il n'existe pas à l'heure actuelle de modèles représentatifs de la complexité d'un organisme entier ni de cette pathologie.

18314 Pour limiter l'élimination de poussins mâles de souche ponte à l'éclosion, une des alternatives est d'élever ces mâles, présentant habituellement de très faibles rendements en viande sur la carcasse et de faibles efficacités alimentaires. C'est pourquoi l'utilisation de souches génétiques d'animaux à double fin, c'est à dire caractérisés à la fois par de bonnes performances de pontes pour les femelles et de croissance pour les mâles, est une stratégie qui doit être évaluée pour l'élevage avicole biologique. Ceci sera réalisé à deux saisons, au printemps et à l'automne pour prendre en compte les modifications de comportement sur le parcours et de performances aux deux saisons.

Notre projet vise donc à caractériser, au niveau de leurs performances de croissance, de la santé, de la physiologie, du bien-être et du comportement exploratoire, les différences existant entre quatre souches de poulets mâles élevés en plein-air : deux souches génétiques expérimentales à double-fin ayant des objectifs de rendements contrastés, une souche ponte et une souche label chair. Nous évaluerons ces réponses sur 250 poulets mâles par souche, soit 1000 poulets mâles au total. Pour observer les poulets dans leur groupe social, et quantifier les comportements exprimés et l'utilisation du parcours, certains animaux seront équipés de puces à fréquence radio (RFID) (procédure 1) qui permettra de suivre en continu l'utilisation du parcours par ces poulets.

Afin de lier les performances à la santé des animaux et à la qualité de leur viande en fonction du génotype, nous effectuerons des prélèvements sanguins pour analyser leur réponse vaccinale (voir procédure 2) à trois âges.

Remplacement : Le recours aux animaux vivants est nécessaire pour se placer en condition d'élevage biologique habituel et pouvoir suivre le comportement naturel d'exploration, les performances des animaux sur le parcours extérieur, et étudier la qualité de la viande produite pour le consommateur.

Réduction : 1000 poulets mâles élevés pour moitié au printemps et pour moitié à l'automne seront requis pour simuler les conditions des élevages commerciaux biologiques. Afin de limiter le nombre de facteurs et conséquemment le nombre d'animaux nécessaires pour les tests statistiques, nos expériences seront réalisées uniquement sur des poulets mâles. Le nombre d'animaux prévu est nécessaire et suffisant pour étudier le comportement exploratoire des animaux sur le parcours (100 animaux par souche et par saison) et échantillonner suffisamment de sang (25 animaux à 3 temps par souche et par saison) et tirer des conclusions significatives de cette expérimentation.

Raffinement : La stratégie de raffinement est adaptée pour que les conditions d'élevage des animaux se rapprochent de celles d'un élevage avicole biologique classique avec accès à un parcours plein air et un élevage en groupe favorisant l'expression des comportements naturels des poulets. Les animaux seront hébergés dans des conditions optimales d'alimentation et de soins, avec une évaluation de leur comportement, de leur santé et bien-être grâce à la grille de référence dédiée. Une surveillance au minimum quotidienne des animaux est assurée afin de détecter précocement toute altération de leur état de santé ou de leur comportement. Enfin, les animaux ont à disposition des perchoirs et des ficelles dans les bâtiments en enrichissement du milieu.

18315 L'optogénétique est une technique permettant de moduler l'activité des nerfs par illumination via l'introduction dans les neurones de protéines sensibles à la lumière, appelées opsines. Introduites dans des types cellulaires non sensibles à la lumière, elles permettent un contrôle lumineux de nombreux processus cellulaires, dont l'inhibition (hyperpolarisation) ou l'activation (dépoliarisation) neuronale par le trafic d'ions de part et d'autre de la membrane cellulaire. Les channel rhodopsines et les halorhodopsines sont 2 familles d'opsines microbiennes. Les channel rhodopsines excitables

par la lumière bleue, ont la capacité de stimuler l'activité neuronale. Les halorhodopsines, excitables par la lumière jaune, inhibent l'activité nerveuse des neurones. Le contrôle de l'activité nerveuse grâce à l'introduction dans les neurones d'opsines activatrices ou inhibitrices représente un espoir thérapeutique majeur dans de nombreuses pathologies dont l'origine est une dysfonction de l'activité neurosensorielle, parmi lesquelles les pathologies de la surface oculaire. Parmi les pathologies chroniques et multifactorielles de la surface oculaire, la sécheresse oculaire est caractérisée par une rupture de l'homéostasie du film lacrymal et des anomalies sensorielles. La prévalence de la sécheresse oculaire varie de 5 à 35% chez les sujets âgés de 50 ans et plus. Les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués demeurent mal connus. Elle représente un des principaux motifs de consultation pour douleurs oculaires en Ophtalmologie. La sécheresse oculaire se manifeste par une sensation d'irritation, de sécheresse, de brûlure, de picotements et de sensibilité accrue à la lumière. Cependant, le symptôme le plus fréquent et le plus invalidant est celui de la douleur oculaire ressentie par les patients à des degrés divers. Cette douleur chronique a un véritable impact sur la qualité de vie des patients dont près de 60% se déclarent gênés dans leurs activités quotidiennes. L'impact psychologique est également considérable, 80% des patients estimant que leur douleur n'est pas suffisamment prise en considération.

Cette douleur chronique résulte de la forte densité de l'innervation cornéenne, qui se trouve lésée lors la sécheresse oculaire. En effet, la cornée est le tissu le plus densément innervé du corps humain. La densité des terminaisons nociceptives de la cornée est estimée à 7000 nocicepteurs/mm² pour la cornée humaine, soit 500 fois plus de terminaisons nerveuses que le derme et 30 fois plus que la pulpe dentaire. Dans le cas d'une sécheresse oculaire, l'altération de l'épithélium cornéen ainsi que l'inflammation cornéenne et centrale (au niveau du ganglion trijumeau et du complexe sensitif du trijumeau) ont pour conséquences un abaissement du seuil d'excitation des nocicepteurs. Cette hyperexcitabilité des nerfs cornéens provoque à terme une sensibilité périphérique (cornéenne et trigémينية) et centrale (complexe sensitif du trijumeau) aboutissant à la chronicisation de la douleur.

L'objectif de ce projet de recherche est de déterminer les capacités de transfection d'adénovirus associés exprimant des opsines activatrices ou inhibitrices dans des nerfs cornéens (axones et soma) dans un modèle murin. Un modèle de transfection des nerfs cornéens sera réalisé par une abrasion de l'épithélium cornéen permettant ainsi la pénétration des virus dans les nerfs cornéens. Les virus utilisés codant pour les différentes opsines permettront par la suite de moduler l'activité des nerfs cornéens et donc d'étudier les mécanismes physiopathologiques responsables d'une augmentation de sensibilité cornéenne et de préciser les relais neuronaux centraux impliqués dans la chronicisation de la douleur oculaire. A terme, il permettra de définir les mécanismes neurogènes et circuits physiopathologiques impliqués lors la sécheresse et la douleur oculaire chronique.

L'utilisation de l'animal est indispensable dans ce projet. Il nécessitera l'utilisation de 140 souris mâles adultes C57Bl6/J.

Conformément à la « règle des 3R » décrite au 2° de l'article R214-105, nous respecterons les principes de Remplacement, Réduction et Raffinement. Concernant le principe de Remplacement, une vaste étude bibliographique a mis en exergue la nécessité du recours aux animaux et notamment aux souris C57Bl6/J. En effet, cette espèce est la plus utilisée à ce jour pour étudier et mieux comprendre les pathologies oculaires du segment antérieur. De plus, lors de la sécheresse oculaire des interactions complexes se mettent en place entre différents types cellulaires (neurones, cellules inflammatoires, cellules cornéennes) et il n'existe pas encore de systèmes in vitro pouvant mimer la complexité de ces interactions cellulaires. Afin de respecter le principe de Réduction, nous limiterons au maximum le nombre d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement interprétables. Enfin, pour respecter le principe de Raffinement, les animaux seront maintenus dans des conditions d'hébergement stables, contrôlées et avec un enrichissement du milieu (bâton à ronger et maison en carton), de manière à assurer un bien-être optimal. Egalement, les animaux seront examinés quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié de l'animalerie. De plus, afin d'éviter toute souffrance animale, les animaux bénéficieront d'une anesthésie générale et/ou locale selon les procédures. Enfin, différents points limites ont préalablement été définis (animaux reçus présentant une malformation, signes d'infections

oculaires, réaction comportementale exacerbée de l'animal, aspect de l'œil anormal, inflammation conjonctivale, mobilité anormale, aspect du pelage hérissé, perte de poids importante, blessures importantes).

18316 La tétralogie de Fallot est une pathologie cardiaque congénitale fréquente représentant à elle seule plus de 10% des cardiopathies congénitales. Les anomalies cardiaques caractéristiques de la tétralogie de Fallot sont le plus souvent corrigées chirurgicalement à un très jeune âge, permettant aux patients de vivre dans de bonnes conditions pendant de nombreuses années. Cependant à l'âge adulte, ces patients présentent des dysfonctions ventriculaires droites (contraction inefficace) très souvent accompagnées de troubles du rythme sévères et de mort subite pour lesquels un traitement bien défini n'existe pas encore. Le remplacement de la valve pulmonaire par une prothèse est souvent nécessaire chez ces patients pour limiter la dysfonction du ventricule droit mais le timing optimal pour effectuer cette intervention reste débattu et les conséquences sur l'activité électrique du cœur méconnues. Nous avons dans un premier temps mené un protocole préliminaire, qui visait à caractériser les propriétés électriques ventriculaires suite à la correction chirurgicale de la tétralogie de Fallot et d'étudier la réversibilité de ces anomalies après le remplacement de la valve pulmonaire précoce (après 60 jours de suivi). Nous avons ainsi obtenu des résultats positifs qui montrent que les anomalies électriques ventriculaires sont réversibles après mise en place d'une valve pulmonaire après 2 mois de suivi. En pratique clinique, ces résultats préliminaires pourraient avoir un impact sur la prise en charge des patients ayant une tétralogie de Fallot opérée, puisque nous sommes en mesure de montrer pour la première fois que la mise en place d'une valve pulmonaire a un effet non seulement sur les paramètres hémodynamiques mais aussi sur les propriétés électriques ventriculaires des patients. Toutefois, nous pourrions affiner ces résultats, en recherchant un seuil au-delà duquel ce remodelage n'existerait plus car il serait trop avancé. Nous souhaitons donc, afin de compléter notre étude, réaliser une série d'expérimentations supplémentaires avec un suivi prolongé des animaux qui bénéficieront de la mise en place d'une valve après 4 et 6 mois de suivi. L'objectif sera de déterminer à partir de quelle durée de suivi et de quel degré de remodelage celui-ci n'est plus réversible. Ce projet sera développé autour d'un modèle chronique de dysfonction ventriculaire droite chez le porc qui mime les lésions d'une tétralogie de Fallot opérée (24 animaux au total), modèle que nous maîtrisons désormais. Cette espèce, de par la proximité de son anatomie et de son électrophysiologie cardiaque avec celles de l'Homme, facilitera la translation des résultats à la clinique. Afin de nous permettre de répondre aux questions d'ordre clinique, des modèles animaux de pathologies humaines et des tissus animaux sont nécessaires. Bien que les données obtenues à partir de ces études ne peuvent être obtenues à partir d'études informatiques, elles pourront à terme être incorporées à des modèles numériques et participer ainsi au REMPLACEMENT et à la réduction du nombre d'animaux utilisés dans de prochaines études, ainsi qu'à leur raffinement. D'autre part, nous sommes en mesure de pratiquer la plupart des différentes investigations à la suite les unes des autres, ce qui nous permettra d'accroître la quantité d'informations obtenues à partir d'un animal, permettant la REDUCTION du nombre d'animaux. Par ailleurs, le projet est réalisé avec un suivi chronique, le bien-être des animaux sera particulièrement pris en compte lors de leur prise en charge, toutes les mesures de RAFFINEMENT seront mises en place : lors de l'opération avec une anesthésie, un suivi des constantes, une analgésie adaptée, mise en œuvre par du personnel compétent et lors de l'hébergement notamment avec la mise en place de mesures d'enrichissement adaptées (locaux adaptés, groupes sociaux, suivi quotidien, jeux...).

18317 Comprendre comment le cerveau encode, consolide, stocke et restitue nos souvenirs est fondamental en Neurosciences. Ces fonctions reposent sur des circuits neuronaux précis et complexes reliant de grands ensembles de neurones. Les protéines de la Polarité Cellulaire et Planaire (PCP) sont exprimées dans le cerveau des mammifères et s'accumulent dans la région de l'hippocampe, une structure très importante pour l'apprentissage et la mémoire.

Dans ce projet, nous souhaitons comprendre comment ces protéines participent chez la souris C57BL6 adulte aux processus d'apprentissage et de mémorisation. Nous utiliserons la technique

chirurgie stéréotaxique qui va nous permettre de modifier l'expression des protéines spécifiquement dans l'hippocampe des souris. Un mois plus tard nous testerons et évaluerons la capacité des souris à effectuer des tâches de mémoire.

Règle des 3R.

Remplacer : Ce projet s'intègre dans un projet plus global combinant différents travaux de recherche complémentaires allant de l'étude biochimique ou biomoléculaire au comportement. Beaucoup d'études "in-vitro" sont effectuées sur des cellules en culture en amont de l'utilisation des animaux pour limiter au maximum leur utilisation mais l'étude de la mémoire chez la souris ne peut être évaluée par des méthodes alternatives.

Réduire : Afin d'utiliser le nombre minimal d'animaux mais de garantir la validité scientifique et statistique des résultats, nous avons évalué par une étude empirique qu'un nombre minimum de 20 animaux par groupe est nécessaire pour notre étude.

Raffiner : Pour supprimer l'angoisse, la détresse ou la douleur subie par les animaux au cours de l'expérience, les animaux sont élevés en cage enrichie avec un nid végétal, surveillés régulièrement et des points limites suffisamment précoces ont été mis en place. De plus concernant la procédure de chirurgie, un traitement analgésique pré/post-opératoire, le mode d'anesthésie (gazeuse + locale) ainsi que le suivi-post opératoire permettent de réduire au minimum l'inconfort et la douleur de l'animal. Pour ce projet nous avons estimé le nombre total d'animaux nécessaire à 320 souris sur 5 ans.

18318 Le système immunitaire est connu pour jouer un rôle essentiel dans la compréhension et le traitement de nombreux cancers. À titre d'exemple, l'immunothérapie représente une avancée médicale majeure de ces dernières années. Elle a pour principe la stimulation du système immunitaire du patient, afin de lui permettre de détruire les cellules tumorales qui menacent son organisme.

En greffant des cellules souches à des souris immunodéprimées, nous pouvons reconstituer, dans cette espèce, un système immunitaire humain fonctionnel. Ce modèle d'étude préclinique nous permet de mieux comprendre d'une manière plus spécifique de son utilisateur final, l'Homme, les interactions existantes entre la physiologie, le système immunitaire, une tumeur et une molécule.

Dans le cadre de ce projet, des souris humanisées (Hu-NCG et Hu-NOG) et non-humanisées (NCG, NOG, NSG, BRG, Nod/Scid, C57Bl/6, BALB/c) recevront une greffe de lignée tumorale ou de Patient-Derived Xenografts (PDX) par voie sous-cutanée. Après croissance de la tumeur injectée, l'administration des composés de recherche sera réalisée par voie entérale (gavage, incorporation dans l'alimentation) ou parentérale (veineuse, intrapéritonéale, sous-cutanée ou intra-musculaire).

Les volumes à administrer seront préétablis par le vétérinaire d'établissement et le comité de bien-être. A titre d'exemple, pour une souris de 20 g, la limite d'administration sera de 400 µL per os; 200 µL par voie sous-cutanée; 200 µL par voie intrapéritonéale; 50 µL par voie intramusculaire et 200 µL par voie intraveineuse.

La croissance tumorale et le poids de l'animal seront monitorés deux à trois fois par semaine pour évaluer l'effet des molécules sur les tumeurs. La fréquence pourra être augmentée en fin d'étude, si nécessaire.

Des prélèvements de sang seront réalisés dans le sinus rétro-orbital ou dans la veine caudale. Les prélèvements au sinus rétro-orbital seront réalisés sous anesthésie générale ou, à défaut, sous anesthésie locale. La fréquence maximale de prélèvement sera dépendante du poids, selon un schéma préétabli par le vétérinaire et le comité de bien-être. A titre d'exemple, le volume prélevé sera de 160 µL par semaine, maximum, pour une souris de 20 g. Des tests de laboratoire seront réalisés sur ces prélèvements (eg : cytométrie en flux ou ELISA) et permettront d'objectiver les effets des molécules.

REDUCTION :

Un total de 10000 souris adultes seront utilisées, couvrant une période 5 ans, permettant de réaliser 330 études précliniques. Le nombre de souris par étude sera de 5 à 10 individus par groupe, avec

un minimum de 4 groupes (1 groupe placebo et 3 groupes traités). Le nombre d'animaux utilisés dans chaque étude sera réduit au maximum en se basant sur des tests statistiques se basant sur les effets attendus de la série.

RAFFINEMENT :

Les souris seront hébergées en cage ventilée, par groupe social stable. La nourriture et l'eau de boisson seront fournies ad libitum. La cage contiendra une couche de litière permettant aux souris de creuser, de se cacher et de réaliser un nid, élément essentiel à leur bien-être. Un morceau de bois permettant aux souris d'exprimer leur comportement de rongeur, ainsi qu'un nid en carton seront également disposés. Les souris recevront une période d'acclimatation de 7 jours, minimum, avant l'entrée en projet, et seront habituées à la présence de l'expérimentateur qui les manipulera régulièrement. Les pièces d'hébergement disposeront d'un cycle lumière-obscurité (12h - 12h), d'une température (20 - 24°C) et d'une hygrométrie (45 - 65%) contrôlés en permanence. Les souris seront monitorées tous les jours pour vérifier l'absence de souffrance. Celle-ci sera objectivée par une échelle de score clinique adaptée aux études en immuno-oncologie.

REMPACEMENT :

Les tests in vitro seront envisagés si ceux-ci sont appropriés. Néanmoins, il n'est actuellement pas possible de recréer in vitro un environnement complexe comme le système immunitaire, et de mimer son interaction avec une tumeur, tout en objectivant les effets potentiellement toxiques d'une molécule en développement. La souris constitue donc un modèle scientifiquement valide, robuste et indispensable pour le développement et la mise au point de traitements innovants pour des pathologies cancéreuses.

18319 Le diabète de type 2 (DT2) est une pathologie multi-organe affectant 58 millions de personnes en Europe et 3,7 millions de personnes en France. Il s'agit également d'une maladie silencieuse. 22 millions de personnes restent non diagnostiquées en Europe (700 000 en France), car sa détection est souvent fortuite, alors que la maladie est déjà pleinement installée. Le principal défi concernant le DT2 se situe donc avant l'apparition des premiers symptômes cliniques. Ainsi, il est urgent de trouver de nouveaux biomarqueurs de l'installation et de la progression du DT2. La découverte actuelle de biomarqueurs est basée sur une approche de métabolomique non ciblée et sans a priori en utilisant des échantillons de sang veineux ou d'urine. Malheureusement, ces métabolites fournissent une vue globale et corps-entiers, offrant peu d'informations mécanistiques sur le métabolisme et la fonction des organes. Leur potentiel pour cibler les thérapies spécifiques à un organe est alors limité.

Dans ce projet nous cherchons des biomarqueurs (signatures métabolomiques) des dérives métaboliques spécifiques à certains organes survenant avant les premiers symptômes cliniques pour un meilleur phénotypage précoce de l'installation et de la progression du DT2.

Les animaux utilisés seront des mini-porc Yucatan mâles appareillés de 4 cathéters (artériel, portal, sus hépatique et cave inférieure). 60 animaux distribués en 4 lots seront utilisés. Les animaux seront alimentés avec 2 régimes différents : un régime normal et un régime induisant le développement du DT2. Des prélèvements sanguins sont prévus au début (J0), puis ensuite à J30, J60, J90, J120, J150 et J180.

Le protocole proposé s'inscrit dans le respect de la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement) pour l'expérimentation animale, réduisant au minimum le nombre d'animaux nécessaires pour la réalisation du projet. En effet, l'effet de l'âge sera suivi sur un nombre restreint d'animaux. Aussi, les animaux sont utilisés comme leurs propres témoins lors des cinétiques. Par ailleurs, les protocoles appliqués au projet sont adaptés aux interventions chirurgicales (pose de cathéter), avec une anesthésie générale et des traitements locaux visant à réduire l'impact des gestes invasifs. Cette étude visant à déterminer des marqueurs spécifiques des organes lors de l'installation du DT2 la dimension intégrant la complexité des interactions entre tissus et organes dans cette maladie métabolique est très importante, car elle ne se retrouve que chez les animaux vivants. L'utilisation d'animaux vivants est donc la seule option possible.

18320 L'objectif général motivant ce projet est de développer une nouvelle classe d'antimicrobiens, les éligobiotiques® (EB), qui vont éliminer sélectivement les souches d'entérobactéries multi-résistantes de la flore digestive (microbiote) de patients transplantés et colonisés par ces bactéries. Cette élimination sélective servira de traitement préventif, empêchant ainsi l'apparition d'infections bactériennes difficiles à traiter dans les semaines suivant une transplantation d'organe.

Pour ce faire, un modèle particulier de septicémie induit par l'administration de l'entérobactérie *Escherichia coli* a été choisi pour évaluer l'effet clinique potentiel des éligobiotiques®. Le but est de savoir si, lorsque les bactéries sont soumises à un traitement par éligobiotiques®, elles diminuent en quantité et s'associent à moins de signes cliniques d'infection une fois administrées chez la souris.

Cette étude s'articulera autour de trois axes :

- Une phase pilote permettant de définir la virulence de deux souches d'*E. coli*, l'une sensible aux éligobiotiques® et l'autre résistante aux éligobiotiques® ;
- Une deuxième phase pilote de mise au point du modèle de septicémie,
- Une phase d'efficacité pour mettre en évidence le bénéfice clinique et microbiologique d'un traitement préventif par éligobiotiques®

366 souris C57BL/6 WT (56 pour la phase pilote 1, 130 pour la phase pilote 2 et 180 pour la phase d'efficacité) seront nécessaires pour la mise en œuvre de ce projet.

Dans le cadre de cette étude, une attention particulière sera portée au respect de la règle des 3R. Le nombre d'animaux nécessaire pour répondre aux hypothèses et permettre une analyse statistique robuste a été réduit à 8 par groupe (pour la première phase pilote, au lieu de 10) et à 5 par groupe pour la seconde phase pilote, grâce à l'expérience acquise lors d'études précédentes. Néanmoins, pour évaluer l'efficacité du traitement par EB, des groupes de 10 souris seront indispensables.

Des analyses *in vitro* ont déjà été réalisées sur l'efficacité des EB. Toutefois l'efficacité de tels composés ne peut être confirmée que dans des modèles pré-cliniques, c'est pourquoi aucune stratégie de remplacement ne peut être envisagée.

Enfin, un enrichissement du milieu (jouets en plastique, igloos en carton) sera utilisé et une surveillance des signes cliniques sera réalisée 3 fois par jour pour cette étude (raffinement).

18321 Le Syndrome de l'X fragile (FXS) est la forme la plus commune de retard mental et d'autisme héréditaire. Ce syndrome est dû à la perte d'expression du gène *FMR1*, situé sur le chromosome X, chez les patients. A l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement spécifique pour cette pathologie, et il est donc primordial d'explorer de nouvelles pistes thérapeutiques.

Nous avons identifié deux récepteurs à l'histamine présents dans le cerveau comme des cibles thérapeutiques potentielles. Nous avons donc testé *in vitro* plusieurs inhibiteurs pour chacun de ces récepteurs à l'histamine, et identifié 4 molécules ayant un effet sur les lignées cellulaires X fragile. Ces 4 molécules ont toutes été validées pour d'autres indications thérapeutiques, et ne présentent donc pas de toxicité ou d'effets indésirables trop importants. De plus, on sait que ces molécules passent la barrière hémato-encéphalique et atteignent donc le cerveau.

L'objectif de ce projet est donc d'évaluer l'effet thérapeutique de ces 4 molécules sur la souris *Fmr1-KO*, modèle du syndrome de l'X fragile récapitulant les phénotypes majeurs et les défauts neuro-anatomiques observés chez les patients. Ces souris ont un phénotype non dommageable.

Nous évaluerons en particulier leur effet sur 4 aspects caractéristiques de la pathologie :

- les troubles de l'interaction sociale chez le souriceau
- les troubles cognitifs
- les troubles sensori-moteurs
- la maturation des épines dendritiques

Les résultats obtenus nous permettront de définir sur quels phénotypes de la pathologie ces molécules agissent, et de mieux identifier les voies de signalisations impliquées. Cela nous

permettra également de les proposer dans le cadre d'autres pathologies présentant des phénotypes similaires tels que l'autisme ou la schizophrénie précoce.

Afin de répondre aux exigences de remplacement de la règle des 3R, nous avons effectué toute l'étude préliminaire sur des lignées cellulaires immortalisées, ce qui nous a permis de garder les molécules les plus prometteuses pour l'étude in vivo.

Pour répondre aux exigences de réduction, les tests seront effectués sur le nombre minimum requis d'animaux nous permettant d'obtenir des résultats robustes statistiquement. De plus, pour les tests d'interaction sociale durant le développement, ce sont les mêmes animaux qui seront testés à différents âges, ce qui nous permettra à la fois de réduire le nombre total d'animaux et d'avoir un suivi longitudinal sur les animaux. Enfin, les cerveaux des animaux utilisés pour les tests de comportement seront prélevés afin d'étudier la maturation des épines dendritiques, ce qui évitera d'utiliser des animaux en plus.

Enfin, pour répondre aux exigences de raffinement, les animaux seront stabulés en groupes sociaux adaptés, avec des éléments d'enrichissement (maisonnettes, ouate, bâtonnets à ronger). Ils seront manipulés par du personnel expérimenté, et surveillés 2h puis 24h après chaque test afin de vérifier leur état de santé, et d'intervenir selon les points limites définis pour chaque procédure. Pour limiter au maximum la souffrance chez les animaux en cours d'expérimentation, une grille de score a été établie.

Pour évaluer l'intérêt thérapeutique de ces molécules sur les différents aspects de la pathologie du syndrome de l'X fragile, nous utiliserons un nombre total de 2870 animaux.

18322 Le cancer colorectal (CCR) est le troisième cancer le plus fréquent et la quatrième cause de la mortalité par cancer. Avec un moins bon pronostic, le cancer du rectum représente environ 30% des CCR.

Le traitement standard des cancers du rectum, identique pour tous les patients porteurs d'un cancer du bas ou moyen rectum à partir d'un stade T2, associe un traitement par radiothérapie et chimiothérapie (chimioradiothérapie = CRT), suivie d'une chirurgie globale du rectum et du mésorectum. Cette prise en charge permet d'assurer le contrôle local pelvien de la maladie, au prix de séquelles fonctionnelles importantes (urinaires, rectales et sexuelles) pour 25% à 50% des patients. Une bonne réponse au traitement par CRT est obtenue chez 50 à 60% des patients avec une diminution importante de la taille tumorale dans 15 à 25% des cas (réponse complète), associée à un meilleur pronostic de la maladie. Il est important d'améliorer le taux de réponse complète, en sensibilisant la tumeur à la radiochimiothérapie pré-chirurgicale, ce qui permettrait d'amener plus de patients vers la mise en place de stratégies préservatrices rectales : le « Watch and Wait » (pas de chirurgie mais simple surveillance) ou simple excision tumorale localisée (Chirurgie localisée ou le mésorectum est conservé).

Notre équipe a fait une preuve de concept de la chimio et radiosensibilisation des cellules tumorales pancréatiques par des combinaisons de bioactive food components (BFC, Resveratrol et Capsaïcine), administrées oralement sur des modèles pré-cliniques de souris. Les BFC sont des biomolécules non essentielles qui sont présentes dans l'alimentation et qui sont capables de moduler un ou plusieurs processus métaboliques cellulaires, pour lesquels un rôle a été démontré en santé et dont la consommation est sans danger pour la santé.

L'administration des BFCs en parallèle de la radiothérapie et de la chimiothérapie permet d'augmenter l'efficacité antitumoral du traitement. Nous avons des données in vitro qui montrent que ce concept pourrait être étendu aux tumeurs colorectales. De plus, la localisation anatomique de ce cancer en fait un candidat idéal pour une radiochimiosensibilisation par les BFCs administrées oralement car il devrait permettre une absorption accrue des molécules par la tumeur. L'association des BFC resveratrol et capsaïcine pourrait donc à terme permettre d'augmenter le nombre de réponses complètes et ainsi améliorer nettement la qualité de vie des malades et le pronostic des cancers du rectum.

D'autre part, cette association de la chimiothérapie à la RT est difficilement faisable chez les patients les plus âgés en raison de sa toxicité. Pour ces patients, la radiothérapie seule est souvent proposée

alors que la radiochimiothérapie donne de meilleurs taux de réponse. Parallèlement, la chirurgie pose également problème chez ces mêmes patients en raison des comorbidités et de l'âge. Les perspectives thérapeutiques récentes s'orientent vers des stratégies de préservation rectale (exérèse locale ou surveillance rapprochée) sous réserve d'une réponse au traitement néoadjuvant. Le développement d'une alternative à la chimiothérapie qui permettrait une radiosensibilisation sans augmenter la toxicité du traitement est donc pertinente pour améliorer la prise en charge ces patients. Sur la base de nos résultats *in vitro*, nous faisons l'hypothèse que le resveratro ou sa combinaison à la capsaïcine pourraient constituer une alternative à la chimiothérapie par 5 fluorouracil pour radiosensibiliser la tumeur rectale chez le sujet âgé.

Afin de valider nos premiers résultats *in vitro*, nous souhaitons tester les effets radiochimiopotentialisants et radiosensibilisants de la combinaison de BFC sur un modèle de souris. L'espèce choisie pour cette expérience est une lignée immunodéprimée. L'immunodépression des animaux est nécessaire pour permettre une bonne prise tumorale des xénogreffes. Nous utiliserons le minimum nécessaire d'animaux pour être statistiquement significatifs et scientifiquement irréprochables. L'ensemble des expériences impliquera différents lots d'animaux, dont le total sera de 260 sur 5 ans. Les animaux sont produits à cet effet dans une structure agréée qui tient compte de l'éthique animale et assure l'élevage et le suivi quotidien des animaux dans les meilleures conditions de bien-être conformément à la législation et la règle des 3R. En matière de raffinement, la douleur sera prise en charge de la naissance jusqu'à la mort de l'animal (utilisation d'analgésiques). L'environnement des animaux sera enrichi par des tunnels en polycarbonate. Nous ne pouvons cependant pas remplacer l'expérimentation animale car le processus étudié est trop complexe pour être modélisé *in vitro* ou *in silico*.

18323 Le cancer est la deuxième cause de décès parmi toutes les maladies. La résistance au médicament est l'une des principales causes d'échec aux traitements actuels. Le cancer du pancréas est un cancer très meurtrier. Asymptomatique et métastatique, il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement efficace, l'espérance de vie du patient excédant rarement 6 mois. D'autre part, le carcinome hépatocellulaire (HCC) arrive en cinquième position des cancers les plus fréquents dans le monde. Seuls 30 à 40% des patients atteints de HCC sont éligibles à des traitements potentiellement curatifs. Un nombre important de cas de HCC sont diagnostiqués à un stade avancé et la survie médiane après le diagnostic est d'environ 6 à 20 mois. Les options thérapeutiques pour les patients atteints d'un HCC en stade avancé au moment du diagnostic comprennent la chimiothérapie systémique telle que le sorafénib. Cependant, l'un des principaux inconvénients du traitement par sorafénib est le faible taux de réponse objective. L'urgence à laquelle la recherche est confrontée nous a amené à développer de nouveaux agents efficaces pour combattre le cancer du pancréas et le HCC.

Dans ce contexte, un analogue de la trifluopérazine (ZZW-115) a été développé et s'est avéré très efficace sur plusieurs lignées cellulaires. Des résultats prometteurs ont été obtenus *in vitro* qui montrent une réduction significative du taux de prolifération cellulaire de plus de 50 lignées cellulaires différentes. De plus, nous avons obtenu des résultats prometteurs *in vivo* qui montrent une réduction significative de la croissance tumorale de xénogreffes obtenues après implantation de cellules tumorales humaines (MIAPaCa2 ou Hep3B) sur des souris NUDE. L'efficacité de cette molécule est justifiée par son affinité pour une protéine clef dans le processus de carcinogenèse pancréatique, NUPR1.

Mais, cette formulation peut être améliorée notamment en modifiant sa chimie, afin d'augmenter son potentiel antitumoral et s'affranchir des potentiels effets secondaires sur les récepteurs du potassium hERG observé *in vitro*. La nanomédecine est une stratégie prometteuse pour contourner la résistance aux médicaments, réduire la toxicité des traitements et améliorer l'efficacité thérapeutique.

Après des études *in vitro*, des nano-formulations de ZZW-115 encapsulé dans des dendrimères amphiphiles ou des liposomes ont été sélectionnées et se sont avérées très efficaces sur différentes cellules cancéreuses. Ainsi, pour vérifier si ces nano formulations sont efficaces sur différents modèles de cancer du pancréas et d'HCC, nous voulons valider, dans ce projet, leurs activités

anticancéreuses. A l'heure actuelle, il n'existe aucune autre méthode qui pourrait se substituer à l'expérimentation animale dans ce type d'étude. Le modèle animal le plus pertinent à ce jour reste la souris. Dans ce projet, des souris SWISS NUDE xénogreffées avec des tumeurs du pancréas et d'HCC humain seront utilisées pour valider l'efficacité de ces nano-formulations afin d'évaluer leur potentiel thérapeutique. Ce projet sera conduit dans le respect de la règle des 3R. Dans le respect des principes de remplacement et de réduction, nous avons déjà testé nos nano-formulations in vitro (cellules tumorales dérivées de patients en culture).

Dans le respect du principe de réduction du nombre d'animaux, nous les réduisons grâce à l'utilisation de tests statistiques permettant d'optimiser la taille des effectifs. Le nombre total d'animaux pour ce projet est estimé à 192 souris : 96 souris SWISS NUDE pour générer les xénogreffes avec les cellules MiaPaCa-2, et 96 souris SWISS NUDE pour générer les xénogreffes avec les cellules Hep3B.

Dans le respect du principe de raffinement, les souris seront légèrement anesthésiées pour faciliter la manipulation et mesurer le poids de l'animal ainsi que la taille de la tumeur tout en diminuant le stress engendré par la pique. Si l'état de la souris nécessite une prise d'antalgique, nous lui donnerons de la buprénorphine à 0,1mg/kg. À terme, les souris seront sacrifiées afin de prélever les tumeurs qui se seront formées durant l'expérimentation.

Les souris seront hébergées collectivement (4 à 5 animaux par cage de 530 cm²) et le milieu sera enrichi par la présence dans chaque cage de matériel de nidation : en alternance tiges de papier, abris en carton, pelotes de lanières de papier. La nourriture et l'eau de boisson seront fournies ad libitum. Le changement des litières aura lieu une fois par semaine. De plus, une période d'acclimatation à l'environnement et l'expérimentateur de 7 jours minimum seront assurés pour les animaux avant toutes expérimentations.

Nous avons déterminé des points limites à ne pas franchir pour respecter le bien-être de l'animal. Un contrôle quotidien de l'état clinique de nos animaux sera réalisé.

18324 La Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) est une maladie dont les principaux symptômes sont la bronchite chronique et l'emphysème qui induit une destruction progressive de la paroi des poumons. La BPCO représente un problème majeur de santé publique et est en passe de devenir la troisième cause de mortalité dans le monde.

Les traitements actuellement disponibles ne permettent pas de traiter la maladie mais seulement les symptômes. En effet, le fait de ne pas tout savoir de cette maladie rend difficile le développement de nouveaux traitements.

Nous savons que les cellules du système inflammatoire détruisent la paroi des poumons ce qui forme un cercle vicieux conduisant à l'amplification de réaction inflammatoire et des symptômes de la BPCO. Le rôle de certaines cellules du système immunitaires a été mis en évidence dans la BPCO, mais l'implication exacte d'autres sous-types n'est pas entièrement connue à ce jour.

Dans ce travail, nous souhaitons déterminer le rôle des molécules issues de la dégradation de la paroi pulmonaire sur les fonctions de ces sous-types de cellules immunitaires et ainsi expliquer leur rôle dans l'évolution de la BPCO.

Dans un premier temps, nous étudierons les fonctions des cellules immunitaires chez des souris avec un emphysème. Dans un second temps, nous regarderons le rôle d'une molécule capable de bloquer les produits de dégradation de la paroi pulmonaire.

Les avantages du projet seront de comprendre du rôle des cellules du système immunitaire au cours de la BPCO. Les effets indésirables attendus sont les suivants : les animaux pourront présenter une légère augmentation de stress dû à l'anesthésie et à la procédure expérimentale. De plus, au cours de l'établissement de l'emphysème, les animaux pourraient présenter des difficultés respiratoires.

Seul un modèle animal peut permettre d'étudier et de comprendre les fonctions et le rôle de ces cellules immunitaires dans la BPCO ce qui pourrait ouvrir la voie au développement de nouveaux médicaments.

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

« Remplacer » les modèles animaux : Notre projet se focalise sur un modèle nécessitant l'utilisation d'un modèle animal. En effet, il n'existe pas de modèle *in vitro* capable de reproduire la complexité des réactions et interactions immunitaires.

« Réduire » le nombre d'animaux en expérimentation : Pour nos expérimentations, nous avons prévu le nombre nécessaire et suffisant d'animaux (270), pour garder une puissance statistique dans le traitement des résultats et pour avoir le nombre de contrôles internes suffisant.

« Raffiner » la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites : Les animaux feront l'objet d'une surveillance rapprochée pendant 48 h (toutes les 10-16h) suite à la procédure expérimentale, ainsi qu'une visite quotidienne afin de détecter les points limites préalablement établis et d'éviter tout stress et souffrance animale inutiles. Avant la procédure expérimentale, les souris seront anesthésiées afin d'éliminer la souffrance potentielle due à la procédure. À la fin de l'expérimentation les souris seront mises à mort par surdose d'anesthésique. Durant toute leur vie, les animaux sont hébergés avec plusieurs enrichissements permettant de limiter le stress.

18325 L'objectif de cette étude est d'analyser le métabolome (ensemble des métabolites) chez des rats doubles transgéniques de souche Fischer modifiés au niveau d'un gène codant le précurseur de la protéine chimère, la bêta-amyloïde, et le second gène codant la mutation « DeltaE9 » de la preselinine humaine (rats TgF344-AD).

Nous ne serons pas en charge de la création de la lignée transgénique. Nous utiliserons des animaux transgéniques versus animaux témoins, chez lesquels différents « compartiments » seront analysés : le sang, le liquide céphalo-rachidien, et différentes zones cérébrales.

Les études qui ont été réalisées dans ce modèle de MA montrent que des dysfonctionnements du métabolisme évalué *in vivo* par spectrométrie de masse interviennent dans certaines régions cérébrales. Cette nouvelle étude nous permettra de préciser la nature de ces anomalies, en réalisant une analyse beaucoup plus large du métabolisme par LC-MS *in vitro* au niveau cérébral. De plus, la confrontation de ces résultats avec ceux obtenus au niveau du LCR chez les mêmes animaux, ce qui n'est possible que dans un modèle animal, apportera des éléments nouveaux dans le cadre des explorations de biomarqueurs cliniques

Ce type d'étude n'est pas réalisable en clinique, d'où la nécessité de comparer des animaux reconnus comme des modèles de la maladie d'Alzheimer (MA), TgF344-AD, à des animaux témoins de même souche (remplacement).

Dans ce modèle, les signes caractéristiques de la MA (accumulation de protéines anormales) se développent au cours de l'âge, ce qui modélise la maladie humaine. C'est pourquoi l'étude sera réalisée à la fois chez des animaux jeunes, en début de maladie (autour de 6 mois), et des animaux âgés, en fin d'évolution de la maladie (autour de 22 mois). Un effectif de 8 rats mâles par groupe sera utilisé :

8 animaux transgéniques et 8 animaux témoins par âge, soit un total de 32 animaux.

Les animaux seront hébergés à raison de 2 par cage avec présence d'un enrichissement : papier absorbant, bâton à ronger et tunnel (raffinement).

Le prélèvement de différents « compartiments » chez chaque animal, à savoir le sang, le liquide céphalo-rachidien, et différentes zones cérébrales, permettra d'optimiser leur utilisation (réduction).

18326 L'utilisation massive de produits phytosanitaires est fréquemment évoquée comme un facteur majeur de la dégradation rapide de la biodiversité. Ces produits ont été créés pour perturber des systèmes biologiques causant la mort des cibles organiques. Cependant, la plupart des travaux portant sur les effets des pesticides se sont focalisés sur la toxicité immédiate (effets létaux) à doses relativement hautes et en utilisant des modèles de laboratoire. Pourtant, de faibles doses présentes dans l'environnement peuvent, à travers leurs effets sub-létaux, modifier profondément la physiologie, la reproduction et la survie des organismes non cibles.

Le projet consiste à examiner les effets d'herbicides très répandus (AMPA [principal métabolite du glyphosate] et nicosulfuron) sur la physiologie des crapauds épineux (*Bufo spinosus*) adultes en testant des concentrations retrouvées dans l'environnement dans un contexte de contamination chronique.

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

- Remplacement : L'étude des effets sub-létaux des produits phytosanitaires sur la faune sauvage a des implications importantes à la fois pour la recherche fondamentale en écologie et la recherche appliquée. Ce projet porte spécifiquement sur le crapaud épineux (*Bufo spinosus*), une espèce d'amphibien répandue qui persiste en milieu agricole. Il n'existe pas d'alternative à l'utilisation d'un modèle animal pour cette étude.

- Réduction : Nous avons réduit au minimum le nombre d'animaux employés. En effet, l'expérience sera menée sur 40 individus adultes (20 mâles et 20 femelles) par lots expérimentaux (1 lot témoin, 1 lot exposé à l'AMPA et 1 lot exposé au nicosulfuron), soit un total de 120 individus.

- Raffinement : Tout au long de la procédure, les individus disposeront de conditions de maintien en captivité optimisées. Ils seront maintenus dans des terrariums dédiés, dont le substrat et l'eau de boisson seront changés de façon hebdomadaire (plus souvent en cas de besoins) et auront un accès à la nourriture adapté à leur taille et leur besoin. Un suivi journalier de l'état de chaque individu et de son terrarium sera effectué. L'utilisation de points limites adaptés est implémentée à notre approche expérimentale : en cas d'observation de comportement anormal pendant plus de 2 jours (apathie, immobilité continue, absence d'alimentation) ou d'une perte de masse importante, les individus seront retirés de l'expérience et placés en conditions normales (sans contaminants). L'avis du vétérinaire référent sera sollicité le cas échéant.

18327 La maladie d'Alzheimer (MA) est l'une des maladies neurodégénératives les plus courantes, caractérisée par une perte progressive de mémoire et d'autres fonctions cognitives. A un niveau cellulaire, la MA est définie par une neurodégénérescence de l'hippocampe et des parties spécifiques du cortex (cortex frontal, temporal, entorhinal et pariétal) avec un dépôt caractéristique de plaques β -amyloïdes et des enchevêtrements de protéine Tau dans le cerveau qui seraient à l'origine d'un syndrome oxydatif et inflammatoire très neurotoxique. Chez l'Homme et dans de nombreux modèles animaux, une des cibles précoces de la toxicité des oligomères amyloïdes est la gaine de myéline qui entoure la plupart des axones. On considère que l'altération de la myéline est le point de départ des troubles du transport axonal et des phosphorylations de Tau aboutissant à la dégénérescence des contacts synaptiques et à l'apparition des troubles comportementaux et cognitifs chez l'animal et chez l'Homme. La protection de l'intégrité de la gaine de myéline apparaît comme un des objectifs stratégiques pour ralentir et atténuer la toxicité des oligomères A β 1-42.

La MA affecte plus de 44 millions de personnes dans le monde et à cause de l'allongement de l'espérance de vie, son nombre devrait tripler en 2050. Ceci crée un besoin urgent de commencer un traitement dans les stades les plus précoces de la maladie.

Le principal but du projet est d'utiliser une approche pluridisciplinaire et translationnelle pour développer dans des modèles expérimentaux, des stratégies thérapeutiques efficaces permettant de combattre les causes de déficiences dans la Maladie d'Alzheimer. Les objectifs du projet sont de disséquer les mécanismes qui sont à l'origine de ces déficiences (anomalies de la myéline, souffrance axonale) et d'utiliser de façon pertinente les outils technologiques de qualité à la disposition de l'Unité pour le suivi de l'évolution de la pathologie de la myéline et sa réparation. Il s'agit également de mettre au point des stratégies thérapeutiques à partir des modèles animaux développés pour la neuroprotection. Ce projet repose sur une base solide attestée par plusieurs publications dans des journaux de haut niveau et permettra le transfert d'hypothèses physiopathologiques vers la clinique et vice-versa.

Ces objectifs seront obtenus en réalisant, quels que soient les groupes d'animaux, le suivi des aspects cognitifs et moteurs des animaux par des tests de comportements en présence ou non de substances potentiellement neuroprotectrices.

Dans ce projet, il n'y a pas de douleur induite et nous utiliserons au maximum 1856 souris mâles et 928 souris femelles de 4 espèces sur la période totale de 5 ans.

Les modèles animaux (souris) développés se font dans le respect de la règle des 3R. Réduire : le nombre d'animaux utilisés dans les expériences de comportement est nécessaire et suffisant pour préserver la puissance statistique (15 animaux par groupe chez APPSWE, 12 animaux par groupe chez 5x-FAD et seulement 8 animaux chez les souris contrôles C57BL6 ou B6SJL). Les expériences seront de la durée la plus courte possible. Les protocoles sont optimisés et les expériences ne sont répétées qu'une fois. Raffiner : Les animaux seront suivis quotidiennement afin d'assurer leur bien-être et de détecter rapidement tout changement de comportement, des éventuels signes de douleur, de souffrance ou de stress s'ils devaient apparaître grâce à l'utilisation de points limites clairement définis.

Remplacer : les mécanismes biochimiques et moléculaires mis en jeu dans nos études sont étudiés sur des cultures de cellules. C'est ainsi que nous avons développé plusieurs types cellulaires en adéquation avec différentes pour étudier certains mécanismes liés à la maladie d'Alzheimer.

18328 Ce projet s'inscrit dans le cadre d'études cherchant à améliorer le bien-être des volailles et des porcs élevés dans des systèmes de production biologique et de plein air.

Bien que ces systèmes de haute qualité permettent un degré élevé d'expression du comportement naturel des animaux, il y a une grande variabilité dans l'utilisation de l'enclos extérieur (dénommé parcours) par les poulets, souvent faible au regard de l'espace alloué.

Notre projet vise donc à caractériser davantage l'utilisation des parcours par le poulet de chair grâce à des études comportementales. Ces études sont menées sur quatre groupes expérimentaux de poulets plein-air : un groupe expérimental de race locale, un groupe expérimental de souche capable de produire efficacement des œufs et de la viande, un groupe expérimental de souche label, toutes trois à croissance lente, et groupe expérimental de souche à croissance plus rapide que celle de la souche label classiquement utilisée. En particulier, nous examinerons le lien entre l'utilisation du parcours par les poulets, des indicateurs physiologiques et métaboliques sanguins et leur origine génétique. Pour ce projet, 800 animaux seront utilisés au total.

Remplacement : Le recours aux animaux vivants dans les études de génétique du comportement animal reste nécessaire, afin d'évaluer la complexité des réponses des individus face aux contraintes environnementales et sociales auxquelles ils sont soumis. Il est également important de se placer en condition d'élevage pour pouvoir suivre le comportement naturel d'exploration des animaux sur le parcours extérieur.

Réduction : Quatre fractions de 200 poulets mâles et femelles confondus seront requis pour simuler les conditions des élevages commerciaux, soit au total 800 poulets. Afin de limiter le nombre de facteurs et conséquemment le nombre d'animaux nécessaires pour les tests statistiques, nos expériences seront réalisées uniquement sur des poulets mâles, à l'exception du suivi par puce électronique réalisé sur les animaux des deux sexes. Le nombre d'animaux prévus est nécessaire et suffisant pour évaluer le comportement exploratoire des animaux sur le parcours et permettre l'identification des individus ayant des comportements explorateurs extrêmes (les plus et les moins explorateurs).

Raffinement : La stratégie de raffinement est adaptée pour que les conditions d'élevage des animaux se rapprochent de celles d'un élevage avicole biologique classique avec accès à un parcours plein air et un élevage en groupe favorisant l'expression des comportements naturels des poulets. Les animaux seront hébergés dans des conditions optimales d'alimentation et de soins, avec une évaluation de leur comportement, de leur santé et bien-être grâce à la grille de référence dédiée. Des points limites ont été déterminés et une surveillance au minimum quotidienne des animaux est assurée afin de détecter précocement toute altération de leur état de santé ou de leur comportement. Enfin, les animaux ont à disposition des perchoirs et des ficelles dans les bâtiments en enrichissement du milieu.

18329 L'hypertension pulmonaire (HP) est une pathologie rare et de mauvais pronostic. Elle est caractérisée par un rétrécissement progressif de la lumière des vaisseaux pulmonaires et se complique d'une défaillance du ventricule droit qui souffre, de façon chronique, d'un excès de pression. Cette insuffisance cardiaque droite conditionne la survie des patients. Une mortalité de plus de 80% à 5 ans est observée chez les patients atteints d'HP avec insuffisance cardiaque droite contre une mortalité de 40% à 5 ans chez les patients atteints d'HP sans dysfonction ventriculaire droite. Si la défaillance ventriculaire droite et la physiopathologie des lésions vasculaires pulmonaires sont connues, le retentissement de cette maladie sur le ventricule gauche (VG) reste méconnu. Or une dysfonction ventriculaire gauche est fréquemment observée chez les patients souffrant d'HP. Longtemps résumée à une gêne au remplissage provoquée par un ventricule droit dilaté, il semblerait que le mécanisme de la dysfonction ventriculaire gauche soit plus complexe et impliquerait un remodelage spécifique des cellules contractiles composant le muscle cardiaque (cardiomyocytes). Son impact sur le pronostic de l'HP est également non décrit, notamment sa potentielle réversibilité en cas de traitement curatif définitif de l'HP telle que la transplantation pulmonaire ou l'endartérectomie pulmonaire pour HP post-embolique (HPPE).

Dans ce projet nous modéliserons la dysfonction diastolique du ventricule gauche sur un modèle porcin d'HPPE chronique. Ce modèle animal mis au point dans notre laboratoire en 2010 a permis de mieux comprendre les mécanismes à l'origine de la dysfonction ventriculaire droite dans l'HPPE et a fait l'objet de plusieurs publications scientifiques. Nous souhaitons caractériser la cinétique d'installation de la dysfonction du VG au cours du développement de l'HPPE, mais également l'évolution de la fonction diastolique du VG après traitement de l'HPPE. Nous effectuerons une analyse fonctionnelle et morphologique du VG par échographie, ainsi qu'une analyse hémodynamique par l'étude des boucles pression-volume du VG. Une analyse du remodelage des cardiomyocytes et du tissu matriciel extra-cellulaire sera effectuée en anatomopathologie au terme de l'étude après euthanasie des animaux. A notre connaissance, aucune étude focalisée sur la dysfonction du VG et son potentiel de récupération n'a été rapportée à ce jour sur un modèle animal d'HP chronique.

Les méthodologies employées seront en parfait accord avec les règles d'expérimentation animale.

1) Remplacer : Le porc constitue un modèle de choix pour la recherche des mécanismes des pathologies cardiovasculaires en santé humaine. Les caractéristiques anatomiques et physiologiques cardiovasculaires du porc sont comparables à celles de l'Homme. Par ailleurs la modélisation de l'HP sur le gros animal permet l'application des méthodes d'investigations comparables à celles employées chez l'homme en pratique clinique (cathétérisme cardiaque, échocardiographie) ce qui n'est pas possible dans le cadre d'études in vitro ou in silico. Le modèle animal permettra une transposition rapide et pertinente des résultats à la pratique clinique.

2) Réduire : Il a été défini par analyse statistique qu'un effectif minimal de 20 porcs sera nécessaire. Le nombre d'animaux sera réduit au maximum pour atteindre une significativité statistique. Nous avons choisi de compter sur 8 animaux par groupe. Cependant, une fois le nombre de 6 animaux par groupe atteint, nous n'inclurons plus d'animaux dans ce protocole expérimental.

3) Raffiner : Toutes nos procédures tiennent compte de la notion de point limite avec des critères d'interruption d'expérimentation. Les procédures proposées n'induiront que des souffrances modérées grâce au recours systématique d'une anesthésie générale et à l'usage d'antalgiques dès que cela est nécessaire. Afin de tenir compte des besoins quotidiens de nos animaux et d'améliorer leur bien-être, les porcs auront une nourriture adaptée et seront stabulés en groupe de deux dans des cages de 2 m² (individus de poids <50kg) pour permettre un contact régulier entre congénères et réduire le stress. Leur environnement sera enrichi (activité de fouissement encouragée, médecine ball, jeux dans le couloir, pesée sous forme de jeux avec récompense, planche à gratter, distributeur d'aliment).

18330 L'anguille européenne est dans une situation alarmante à l'échelle des différents bassins versants français et européens. Un plan de gestion anguille a été validé en 2009 suite à la mise en place du Règlement européen (CE) N)1100/2007 du conseil du 18 septembre 2007 instituant des mesures de reconstitution du stock d'anguilles européennes. Ce règlement, décliné au niveau national, par

un plan de gestion national, demande aux Etats membres de réduire la pression et l'impact anthropique sur l'espèce. Un des facteurs aggravant l'état de la population de manière générale est la présence de nombreux ouvrages faisant obstacle à la libre circulation. Les poissons migrateurs, dont l'anguille européenne, afin d'effectuer son cycle biologique complet a besoin de migrer de l'aval des cours d'eau vers l'amont pour rejoindre les zones de croissance. Le fait de rendre accessible les secteurs amont en aménageant avec équipements adaptés les obstacles à la migration se définit sous le terme de rétablir la libre circulation piscicole sur les cours d'eau. Ces ouvrages ne permettent pas aux individus d'atteindre des zones de croissance et grossissement adéquates, sans la mise en place d'une gestion adaptée des organes de l'ouvrage ou la mise en place d'aménagement de franchissement spécifique.

Des passes spécifiques anguilles sont installées sur différents obstacles à la migration sur l'ensemble des bassins versants. Ces aménagements sont plus ou moins efficaces en fonction de leurs caractéristiques et des conditions hydrauliques dans le milieu. Des expérimentations complémentaires sont nécessaires afin d'optimiser les franchissements.

Le projet proposé concerne la recherche de compréhension et d'optimisation de l'efficacité du franchissement sur un site hydroélectrique. Le site est équipé depuis de nombreuses années d'une passe spécifique anguille. Des tests d'efficacité ont été développés sur ce site pendant 10 ans, permettant d'évaluer l'efficacité de la passe. Cependant à l'échelle globale du système la question se pose de savoir s'il est possible d'optimiser encore plus l'efficacité en augmentant le nombre de passes spécifiques anguilles installées sur l'ouvrage. Il est proposé d'installer deux passes provisoires supplémentaires localisées à d'autres endroits (rive opposé, milieu du cours d'eau donc de l'obstacle) et de faire des suivis des anguilles en migration sur l'ensemble des systèmes.

L'efficacité des systèmes est évaluée en fonction de la capacité des anguilles à trouver l'entrée des passes et à franchir l'obstacle. Pour cela le travail est fait sur la base d'un échantillonnage de la population en migration. Les anguilles sont capturées en amont des passes spécifiques par piégeage dans des bacs de volume de 1 à 2 m³. Les individus sont marqués avec des transpondeurs passifs de taille adaptée à leur taille et poids, et sont relâchés à l'aval de la passe. Lors de la remontée des anguilles marquées au niveau des passes, la lecture des transpondeurs (récepteurs automatiques) permet de connaître le temps de migration de chaque individu pour atteindre les passes et trouver leur entrée. L'analyse des données (difficultés pour trouver l'entrée des systèmes de franchissement, comparaison de l'échantillon avec l'ensemble de la population) donnera à terme des informations fondamentales pour optimiser les franchissements de l'anguille sur ces systèmes. Cet échantillon est ensuite comparé à l'ensemble de la population en migration.

Règle des 3R (Remplacer - Réduire - Raffiner).

- Remplacement : il n'est pas possible de remplacer les anguilles par une autre espèce, car l'expérimentation est faite sur le comportement migratoire de cette espèce en particulier. L'étude permet d'analyser son comportement dans le milieu naturel

- Réduire : le nombre d'individus marqués est limité au strict minimum. Il correspond au nombre d'individus marqués les années précédentes sur l'unique passe spécifique ayant permis d'avoir un retour suffisant sur l'efficacité de la passe.

- Raffiner : les individus marqués sont piégés par une technique douce de capture (piégeage dans un bac suffisamment grand permettant d'assurer le bien-être des individus le temps de la manipulation). La stabulation des individus a lieu pendant un temps assez réduit (moins de 12h), ils sont sédatés avant manipulation et marquage. Le marquage utilise une technique très rapide (quelques secondes), avec des marques respectant la norme de poids de la marque par rapport au poids de l'individu (2%) et la phase de réveil se fait dans un bac alimenté constamment en eau sous la surveillance d'un technicien formé. La remise à l'eau des individus a lieu dès que le poisson a retrouvé un comportement normal.

3 sessions de marquage seront prévues par an avec le marquage de 333 anguilles par session de marquage. Sur l'ensemble de l'expérimentation 5000 anguilles seront marquées. Ce nombre d'individus sera suffisant pour pouvoir interpréter les données, la population en migration sur ce site variant de 6 000 individus à 160 000 individus selon les conditions hydrauliques et météorologiques

pendant la période de migration. L'expérimentation étant proposée sur 5 ans, le nombre d'individus marqués sera adapté tous les ans afin de ne pas dépasser 25% des effectifs en migration, comme cela est d'usage pour ce type de suivi.

La proportion d'individus réussissant à remonter sur une des passes spécifiques en fonction de la zone de lâcher et le délai de retour permettront d'avoir une idée de l'efficacité des différentes passes installées et donc d'optimiser le franchissement de l'obstacle.

18331 L'effet positif, sur la santé animale et humaine, de divers probiotiques a été démontré, à plusieurs reprises, au niveau de l'amélioration des troubles gastro-intestinaux.

Les études réalisées chez le chien restent rares et parfois insuffisamment puissantes pour montrer un intérêt de la supplémentation en probiotiques. Dans le meilleur des cas, il a pu être montré une légère réduction du nombre de jours de diarrhée ou une amélioration du score fécal chez les animaux recevant des probiotiques.

Notre étude cherche à montrer qu'un nouveau mélange de microorganismes (formule confidentielle) pourrait être utilisé sans danger pour l'animal, et avoir des effets très bénéfiques sur sa santé et ainsi être considéré comme des probiotiques. La preuve de l'innocuité est le préalable à ce projet. Le second objectif est de montrer la présence dans les selles, des microorganismes utilisés, de démontrer leur rôle en tant que stabilisateur du microbiote et éventuellement en tant qu'agent améliorant la digestibilité de l'aliment.

Ce projet s'inscrit dans le cadre de la thématique de notre unité de recherche dont un des objectifs est d'améliorer le bien-être des animaux de compagnie par des approches nutritionnelles ou pharmacologiques. 18 animaux seront utilisés pour deux volets d'étude, un volet pour l'étude de la tolérance et l'autre pour l'étude de l'efficacité.

Pour l'étude de tolérance, les chiens seront séparés en trois groupes de 6 animaux, et recevront individuellement, chaque matin, durant 30 jours leur ration quotidienne à laquelle sera ajoutée soit une dose de microorganismes (probiotiques présumés, groupe 1) à la dose recommandée soit 10 fois la dose soit leur ration sans aucun ajout.

Pour s'assurer de l'absence de toxicité du mélange, des analyses sanguines (au début et à la fin de la période expérimentale) seront réalisées (biochimie et numération formule) ainsi qu'un examen clinique complet, la non modification des paramètres évalués servira de preuve quant à l'innocuité du mélange utilisé.

Pour l'étude d'efficacité, deux groupes de 7 animaux seront utilisés après une période de wash-out de 21 jours suivant l'étude de tolérance. Le premier groupe recevra uniquement l'aliment tandis qu'une dose de probiotique sera ajoutée à la ration des animaux du deuxième groupe. La supplémentation durera 30 jours durant lesquels les animaux seront individualisés tous les 7 jours soit 5 fois sur la période. Ils le seront également un jour, la semaine précédant la supplémentation et la semaine suivant la fin de la supplémentation. Afin de pouvoir évaluer les coefficients de digestibilité alimentaire, les animaux seront en plus isolés durant trois jours consécutifs lors de la phase de supplémentation. Des analyses sanguines (au début et à la fin de la période de supplémentation) seront réalisées (biochimie et numération formule) ainsi qu'un examen clinique complet.

Ce projet sera réalisé dans le respect de la règle des 3R.

Remplacer : Le chien est l'espèce cible et il n'existe pas de modèle ou moyen alternatif qui ne soit pas in vivo.

Réduire : Le nombre d'animaux est réduit au minimum afin de pouvoir effectuer une analyse statistique dont la puissance est suffisante pour pouvoir montrer un effet.

Raffiner : Le bien-être des animaux sera surveillé tout au long du protocole par leur observation quotidienne. Les conditions d'hébergement et les méthodes expérimentales utilisées seront les plus adaptées pour réduire toute souffrance et tout dommage que pourraient ressentir les animaux.

18332 L'ischémie-reperfusion (IR) est un phénomène inévitable en transplantation d'organe ou durant une chirurgie vasculaire, impliquant un désordre métabolique majeur. L'ischémie correspond à la phase où l'organe est privé de la circulation sanguine. La reperfusion de l'organe se traduit par la reprise de la circulation sanguine et donc des apports en nutriments et oxygène. La séquence d'IR peut entraîner des lésions sévères, à l'origine de dysfonctions des tissus/organes à court et long terme et potentiellement du rejet du greffon dans le cas d'une transplantation. Il est donc nécessaire d'optimiser les conditions de conservation des greffons, comprendre les mécanismes, définir des cibles et développer des stratégies afin de limiter ces lésions d'IR. Plusieurs paramètres intervenant durant la phase ischémique influencent les lésions de reperfusion, et donc la qualité des greffons. Il est établi que la durée d'ischémie et la température de préservation extracorporelle des greffons influencent la reprise de fonction des greffons lors de la reperfusion. L'objet de ce protocole est d'étudier les modulations de ces différentes variables sur les lésions d'IR précoces du rein et du foie de rat isolés perfusés ex vivo et d'étudier les voies de signalisation impliquées. L'objectif du projet est de mieux comprendre les mécanismes de stress et de réparation impliqués dans les lésions précoces d'IR afin d'optimiser la reprise de fonction des greffons. Ce projet permettra l'acquisition de données qui pourront être partagées avec la communauté scientifique et participer à l'amélioration de la conservation des greffons lors de transplantations d'organes. Cette étude nécessite 88 animaux (rats Wistar mâles âgés de 9 à 12 semaines).

La règle des 3R a été prise en compte:

Remplacer : Ce processus expérimental ne peut être remplacé par un protocole in vitro. Seule une étude in vivo/ex vivo, c'est-à-dire incluant la complexité des mécanismes physiologiques mis en jeu lors d'une séquence d'IR peut

permettre d'atteindre les objectifs de ce projet.

Réduire : Le nombre d'animaux par groupe (11 rats/groupe) est réduit au maximum, justifié et défini par un calcul de puissance pour définir le nombre d'animaux par groupe, suffisant pour détecter des différences statistiques biologiques

et histologiques entre les groupes.

Raffiner : Le raffinement de cette étude a également été pris en compte, les animaux seront hébergés dans des locaux adaptés avec enrichissement du milieu adapté à l'espèce et suivis au quotidien de leur état de santé. De plus, tous les

prélèvements d'organes seront réalisés sur des animaux anesthésiés associés à un contrôle de la température sur tapis chauffant et une prise en charge de la douleur par administration d'antalgiques. Les tissus prélevés chez les animaux seront placés dans une banque d'organes/tissus murins afin de mutualiser les échantillons.

18333 La fibromyalgie, qui concerne 2 à 3% de la population mondiale (en majorité des femmes), est un syndrome caractérisé par des douleurs et raideurs des tissus musculo-squelettiques, une sensibilité accrue à la douleur, une fatigue généralisée et une perturbation du sommeil. Elle a des impacts majeurs sur l'activité physique, la santé mentale et plus généralement sur la qualité de vie des patients qui en souffrent. L'origine de ce syndrome est mal connue, son étiologie étant vraisemblablement multifactorielle et impliquant des dysfonctionnements des systèmes de régulation de la douleur, du complexe hypothalamo-hypophysaire et/ou des désordres immunologiques. Des facteurs d'origine nutritionnelle pourraient également être impliqués, 70 à 80% des patients fibromyalgiques étant en effet obèses ou en surpoids. L'un des mécanismes majeurs potentiel explicatif de la symptomatologie de la fibromyalgie concerne la synthèse de sérotonine (impliquée en particulier dans la régulation de la douleur) à partir du tryptophane (Trp - acide aminé indispensable). Une diminution des taux circulants de certains acides aminés, dont le Trp a en effet été observée chez les sujets fibromyalgiques et une corrélation négative a également été démontrée entre les taux circulants de Trp et l'intensité de la douleur chez ces patients. Cette diminution pourrait s'expliquer par une augmentation de l'utilisation métabolique du Trp, mais aussi par une baisse de biodisponibilité du Trp alimentaire. Lors de la digestion il semble que le Trp puisse se lier à des sucres réducteurs, notamment le fructose pour former des complexes non absorbables.

Une forte proportion de fructose dans l'intestin, due soit à une malabsorption du fructose soit à une alimentation enrichie en fructose comme dans les régimes de type western diet, induirait une synthèse des complexes fructose-Trp et une diminution de la biodisponibilité en Trp et/ou la synthèse de dérivés du Trp qui pourraient avoir des répercussions sur la synthèse de sérotonine. De plus, ces complexes fructose-Trp, non absorbés dans la partie haute de l'intestin, deviendraient alors disponibles en quantité accrue pour le microbiote intestinal, ce qui pourrait entraîner des modifications de sa composition et de son activité (dysbiose) et avoir un impact sur le métabolisme de l'hôte. L'objectif de cette étude est de vérifier cette hypothèse qui, si elle s'avère juste, pourrait ouvrir des opportunités de mise en place de stratégies/recommandations alimentaires pour limiter la douleur chez les patients fibromyalgiques. Le protocole proposé s'inscrit dans le respect de la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement) pour l'expérimentation animale. Nous ne pouvons pas remplacer cette expérimentation animale par une expérimentation in vitro ou ex vivo mais nous avons réduit le nombre d'animaux en optimisant le nombre d'animaux par lots. Nous mettons en oeuvre des méthodes permettant de limiter au maximum la douleur et la souffrance de nos animaux, en utilisant des cages adaptées, une anesthésie avant sacrifice et en surveillant quotidiennement les animaux afin de prendre rapidement des décisions de soins ou d'exclusion d'animaux en souffrance. Le projet prévoit la mise en place d'une intervention nutritionnelle chez le rat adulte conventionnel (n=165) et chez les souris ne possédant pas le transporteur intestinal du fructose et conventionnelles (KO Glut 5) (n=520).

18334 Chez l'homme, la stimulation de nerfs périphériques est utilisée pour le traitement de maladies du système nerveux central comme l'épilepsie ou la dépression. De nos jours, plus de 50000 patients dans le monde sont implantés avec des microstimulateurs.

On sait que la stimulation de certains nerfs périphériques agit également directement sur les cellules du système immunitaire en inhibant leur activité, ouvrant la voie au traitement des maladies autoimmunes par les techniques d'électrostimulation de nerfs périphériques chez l'humain. Il a été montré chez la souris que l'électrostimulation des nerfs périphériques et plus particulièrement le nerf de la rate (nerf splénique) diminue l'inflammation et l'activité des cellules immunitaires. Ces études ont été à la base d'un essai clinique réalisé avec des patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde (PR) chez lesquels l'électrostimulation résulte en une amélioration significative des scores cliniques. L'électrostimulation de nerfs périphériques constitue donc une approche thérapeutique prometteuse pour le traitement chronique des maladies autoimmunes et notamment la PR. La PR est la cause la plus fréquente des polyarthrites chroniques. C'est une maladie dégénérative inflammatoire chronique, caractérisée par une atteinte articulaire souvent bilatérale et symétrique, évoluant par poussées vers la déformation et la destruction des articulations atteintes. La polyarthrite rhumatoïde est une maladie auto-immune reconnue pour présenter un nombre anormal de lymphocytes T dans les articulations qui produisent des cytokines inflammatoires, notamment le TNF, activant des macrophages. Ces macrophages vont à leur tour stimuler les chondrocytes, les fibroblastes et les ostéoblastes qui vont respectivement dégrader le cartilage, la matrice articulaire et déminéraliser les os composant l'articulation. La forme la plus courante de PR est caractérisée par des poussées inflammatoires, espacées par des périodes de rémission. Les patients atteints de cette forme de PR ont une qualité de vie extrêmement altérée selon l'intensité et la fréquence des poussées et il n'existe pas à l'heure actuelle de traitements curatifs pour cette maladie. Une thérapie basée sur l'électrostimulation des nerfs périphériques est une approche thérapeutique innovante, présentant une toxicité potentielle moindre comparée aux molécules de type stéroïdien par exemple et pourrait apporter une nouvelle alternative thérapeutique pour les patients réfractaires aux traitements actuels.

Ces dernières années ont également vu l'apparition d'une nouvelle classe thérapeutique antirhumatisme prometteuse, les inhibiteurs des Janus kinases (inhibiteurs JAK). En rhumatologie, le tofacitinib (Xeljanz, Pfizer) a été approuvé comme traitement pour la PR par la FDA en 2012 et par Swissmedic en 2013, et plus récemment pour le traitement de l'arthrite psoriasique. Le baricitinib (Olumiant, Eli-Lilly) a été approuvé en 2017 pour la PR, et pas moins de 20 autres inhibiteurs de JAK sont actuellement en cours d'évaluation dans la PR, à différentes phases de

développement, dont certains devraient être approuvés dans le courant de 2021. Les inhibiteurs des JAK offrent une alternative réelle aux biothérapies antirhumatismales dans le traitement de deuxième ligne de la PR modérée à sévère. Toutefois, de par leur mode d'action intracellulaire, les inhibiteurs des JAK bloquent toute une série de cytokines proinflammatoires, mais de façon partielle et seulement pendant une partie de la journée.

Le présent projet se propose ainsi d'étudier l'effet combiné de l'électrostimulation nerveuse et d'un inhibiteur JAK, le Baricitinib, sur le développement de l'arthrite et d'associer les propriétés anti-inflammatoire de ces deux traitements novateurs. L'objectif de ce projet est de générer des résultats précliniques et de déterminer si ces deux types de traitements peuvent potentiellement être utilisés en combinaison.

Plusieurs approches ont été développées chez la souris pour induire l'arthrite soit par immunisation ou par injection. Le modèle d'arthrite induite au collagène (CIA) est le plus connu car il implique l'immunisation avec une composante du cartilage : le collagène. Ce modèle a permis de démontrer que l'auto-immunité au collagène permet de développer une arthrite auto-immune caractérisée par une inflammation de la membrane synoviale, une destruction du cartilage articulaire et une érosion osseuse, analogues à la PR humaine.

Dans notre laboratoire, nous avons pu montrer que la stimulation électrique du nerf de la rate (nerf splénique) chez la souris inhibe la production de TNF consécutive à l'injection d'une substance inflammatoire mais également le développement de l'arthrite induite par le collagène.

L'objectif de ce projet est de comparer l'efficacité d'un traitement curatif avec un inhibiteur JAK utilisé en clinique (Baricitinib) à celui par électrostimulation du nerf splénique dans un modèle murin d'arthrite induite par le collagène. Le baricitinib est un inhibiteur sélectif et réversible des Janus kinases (JAK) 1 et JAK2. Le projet consiste donc à :

- induire une polyarthrite expérimentale (CIA) ;
- implanter une électrode de stimulation au niveau du nerf splénique chez la souris ;
- puis traiter des souris électrostimulées ou non avec un inhibiteur JAK utilisé en clinique (Baricitinib).

En tenant compte des mesures de réduction et de raffinement mises en place, les contraintes imposées aux animaux ont été évaluées et mises en balance avec les résultats escomptés et permettent d'envisager une balance dommage / avantage favorable à la réalisation de ce projet.

Remplacement : Ce type d'étude ne peut être envisagé que sur des organismes entiers préservant l'intégrité des interactions entre les systèmes immunitaires et nerveux dans un contexte pathologique et non pathologique.

Réduction : Le plan d'étude est conçu pour éviter une initiation non nécessaire des procédures en réalisant des tests statistiques pour chaque procédure. Ainsi, si les résultats obtenus lors de la procédure 1 ne sont pas validés, la procédure 2 ne sera pas réalisée. Par conséquent, le nombre de souris indiqué est un nombre maximum.

Raffinement : Des mesures de raffinements seront mises en place afin de limiter au maximum les contraintes imposées aux animaux dans le contexte de cette étude : les interventions chirurgicales seront menées suivant un protocole d'anesthésie et d'analgésie en prenant soin de maintenir la température corporelle des animaux en les plaçant sur une couverture chauffante. Le suivi postopératoire inclura un traitement antalgique et une grille d'observation préétablie prévoyant des mesures correctives et la mise en œuvre le cas échéant de points limites précoces et adaptés.

L'ensemble du projet nécessitera au maximum l'utilisation de 144 souris.

18335 En France, la sclérose en plaques (SEP) touche plus de 100 000 personnes et représente la 2ème cause de handicap chez le jeune adulte. Elle se caractérise par une atteinte de la substance blanche (myéline) du système nerveux central source de handicap moteur et cognitif. Le développement de méthodes d'imagerie de la myéline est un enjeu majeur pour l'évaluation de nouveaux traitements. Ce projet vient en complément d'un projet en cours qui porte sur le « développement de nouveaux radiotraceurs pour l'imagerie cérébrale en tomographie par émission de positons (TEP) » et mis en

place par notre collaborateur sur un site partenaire. Il utilise un modèle simplifié de sclérose en plaques pour développer et évaluer de nouvelles méthodes d'imagerie de la démyélinisation. Notre apport dans ce projet est l'évaluation de nouvelles approches d'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) très haut champ (11.7T) et permettant de mieux caractériser la myéline, et son éventuelle régénération. Une validation in vivo est nécessaire afin de déterminer la qualité des informations apportées par ces techniques. Il s'agit d'un projet préliminaire d'une durée de 2 ans permettant de calibrer le protocole d'acquisition et d'évaluer le potentiel des méthodes d'IRM sur animal anesthésié.

Une première procédure développera le projet sur le rat qui présente un gros cerveau facilitant la mise œuvre de l'IRM. En cas de succès, le passage à la souris sera envisagé dans une deuxième procédure.

Une phase de mise au point du protocole d'acquisition IRM concernera 4 animaux sains. La deuxième phase de la procédure portera sur le suivi longitudinal de 8 animaux avec lésion démyélinisante.

La deuxième procédure sur souris (12 animaux, 4 sains 8 modèles) suivra, si elle a lieu, la même démarche.

Application des 3R :

Remplacer : Il s'agit de mettre au point un protocole expérimental et de tester de nouvelles méthodes d'acquisition en IRM. Leurs aspects techniques seront validés in vitro avant d'être appliqué à l'animal. Nous commencerons nos expérimentations sur rats afin de s'assurer d'une amplitude de signal suffisante (qui est proportionnel à la zone observée, le rat présente un volume cérébral significativement plus grand que la souris). Le passage à la souris se fera dans une deuxième phase en cas de succès chez le rat, afin d'envisager par la suite un travail sur d'autres modèles plus proches de la maladie humaine et obtenus uniquement chez la souris.

Réduire : 4 animaux sains sont prévus pour la mise en place du protocole in vivo et pourront être réutilisés, sur avis vétérinaire. 8 animaux avec une lésion de la matière blanche seront utilisés en imagerie afin de pouvoir tirer des conclusions à minima selon des tests non paramétriques sur la variabilité et reproductibilité des mesures. La faisabilité chez la souris (mêmes effectifs) sera envisagée seulement en cas de succès chez le rat.

Raffiner : Des mesures de raffinement seront prises au cours du suivi afin de réduire le léger stress engendré par les examens IRM répétés. Ces mesures seront réalisées sous anesthésie générale, afin que l'animal ne bouge pas (une nécessité pour les examens IRM) et permettra de diminuer le stress induit par le bruit des machines, et obtenir des résultats fiables. Certaines séquences IRM peuvent avoir un niveau sonore important : des mesures seront prises comme la fixation d'un morceau de cire malléable sur les barres d'oreilles pour préserver l'ouïe des animaux.

18336 L'hippocampe est une structure du lobe temporal médian connue pour être fortement impliquée dans l'apprentissage spatial et la mémoire déclarative. Lors de cette série de travaux pratiques pour étudiants de première année de Master nous allons chercher à mettre en évidence le rôle de cette région du cerveau dans une tâche de reconnaissance spatiale. Pour cela nous pratiquerons une lésion bilatérale de l'hippocampe dorsal chez le rat. Puis nous étudierons la mémoire de reconnaissance spatiale chez les animaux lésés et contrôles via une tâche comportementale d'exploration d'objets. Les études morphologiques seront menées par la suite. Cette série de travaux pratiques a pour but de former les étudiants aux principales techniques spécifiques à la recherche en Neurosciences ; elle constitue une partie essentielle de leur formation de Master. Dans la mesure du possible, le remplacement des animaux par des méthodes alternatives (modèles mathématiques, méthodes in vitro ...) est préféré. Toutefois, vu la nature de la formation délivrée aux étudiants en Master l'utilisation de rongeurs reste nécessaire : les tests de comportement ne peuvent se faire sauf sur un animal. Le design des expériences comportementales a été étudié au plus juste, en tenant compte du pouvoir des analyses statistiques. Nous avons réduit le nombre total d'animaux utilisé (160 rats : 32 par an, pendant 5 ans), notamment en faisant travailler les étudiants en binôme. Enfin, le raffinement des méthodes expérimentales afin de réduire à son

maximum la souffrance animale est mise en œuvre grâce à l'utilisation d'anesthésiques appropriés lors de chirurgies, à la mise en place de soins post-opératoires, de points limites clairement établis, etc. L'ensemble des expériences étant menées par des personnels hautement qualifiés dans des locaux d'hébergement respectant les standards en vigueur (enrichissement partiel des cages ...). Le taux d'encadrement des étudiants est d'un enseignant par binôme ou trinôme lors de la séance de chirurgie et un enseignant pour 4 binômes (soit 8 étudiants) dans les autres séances, ce qui est plus élevé que les conditions standards de Travaux Pratiques (1 pour 20). Cela permet d'assurer une vigilance constante sur la mise en œuvre des bonnes pratiques d'expérimentation par les étudiants.

18337 La mémoire de travail est un type de mémoire qui nous permet de retenir et de manipuler une quantité limitée d'informations pendant un temps relativement court. Elle nous permet de stocker ces informations durant quelques secondes tout en exécutant d'autres tâches. Ce type de mémoire nous permet ainsi par exemple de prendre des notes écrites durant une présentation orale. La mémoire de travail joue un rôle important dans l'apprentissage, comme l'apprentissage d'une langue, et dans différents types d'activités comme la lecture et la résolution de problèmes. Ce type de mémoire implique différentes régions cérébrales qui interagissent entre elles. Chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, un déficit de la communication entre ces régions cérébrales entraîne une détérioration de la mémoire de travail. L'étude de l'interaction entre ces différentes aires est donc importante pour comprendre son fonctionnement dans un cerveau sain mais également dans les pathologies associées. L'objectif de ce projet est de disséquer au niveau de la population de neurones comment les informations provenant de différentes aires cérébrales sont traitées.

Justification du respect de la règle des 3R.

Remplacer : ce projet nécessite l'utilisation d'animaux. En effet à ce jour il n'existe pas encore de méthodes alternatives, l'étude de la communication entre différentes aires cérébrales nécessite l'utilisation d'un cerveau intact.

Réduire : ce projet utilisera 70 souris C57BL6/J durant 5 ans. Nos groupes expérimentaux seront dimensionnés pour utiliser le plus petit nombre possible d'animaux tout en obtenant des statistiques solides.

Raffiner : nous soulagerons les douleurs générées durant les chirurgies en administrant les molécules antalgiques les plus adaptées. Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de leur vie avec une surveillance quotidienne par du personnel compétent. Ils auront accès en permanence à l'eau et à de la nourriture de qualité constante, préparée spécifiquement pour leurs besoins physiologiques. Ils seront hébergés en groupe sociaux dans des hébergements enrichis avec des éléments qui leur permettront de reproduire leurs comportements naturels. Dans le cadre de leur suivi quotidien comme au cours des procédures, des points limites seront définis pour éviter ou limiter toute souffrance.

18338 Les biotechnologies de l'embryon ont été développées chez les équins comme chez d'autres espèces dont l'Homme. Parmi ces technologies, la production d'embryons in vitro (ICSI : Intra Cytoplasmic Sperm Injection en équins) et la vitrification (méthode de conservation par le froid) sont deux méthodes prometteuses compte-tenu de leurs avantages techniques. Les intérêts de la vitrification pour la filière sont nombreux. Pour un centre de transfert, cela permet de réduire le troupeau de juments receveuses et favoriser leur le bien-être. Pour un éleveur propriétaire d'une jeune jument à fort potentiel génétique, cela lui permet de stocker des embryons avant le début de la carrière sportive de sa jument. La vitrification des embryons permet le développement des échanges à l'international. Malgré le développement important des biotechnologies de l'embryon, de nombreuses études chez l'humain et chez les animaux modèles (souris, lapins et plus récemment bovin) indiquent que la micromanipulation des embryons pourrait s'accompagner d'effets délétères pour le développement de l'embryon à court et long terme.

L'objectif de cette étude est donc d'évaluer les effets de la vitrification de l'embryon équin de 8 jours et de l'ICSI sur l'expression des gènes embryonnaires (étude transcriptomique par RNAseq), le

développement à terme et la fonction placentaire ainsi que la santé et le comportement du jeune poulain jusqu'au sevrage.

Les résultats de cette étude seront intéressants pour la filière équine qui est de plus en plus utilisatrice des biotechnologies de la reproduction. De ce fait, notre modèle animal pour les expérimentations ne peut pas être remplacé puisque différent des autres espèces de mammifères domestiques vis à vis de ces biotechnologies, mais les techniques utilisées pour leurs réalisations sont optimisées afin d'améliorer le bien-être des animaux avant, pendant et après ces procédures expérimentales. De plus, toutes les procédures expérimentales de ce projet seront réalisées par du personnel compétent et formé et expérimenté à ces procédures.

Réduction: Le nombre d'animaux utilisés pour ce projet tient compte des pourcentages de réussite pour chaque étape. En résumé : Pour la partie concernant l'analyse des gènes embryonnaires, nous avons estimé à 48 le nombre de ponettes nécessaires (30 pour la production d'embryons et 18 pour les séances d'OPU). Pour la partie gestations et suivi des poulains, nous avons estimé à 132 le nombre de ponettes nécessaires (14 pour les inséminations immédiates, 35 pour la production d'embryons, 35 comme receveuses, 36 comme donneuses d'ovocytes et 12 comme receveuses d'embryons produits in vitro). Ces gestations conduiront, si tout se passe bien, à la naissance de 36 poulains qui seront suivis jusqu'au sevrage dans le projet.

Raffinement : Les procédures de collectes et transferts d'embryons utilisées dans ce projet sont pratiquées en routine dans les centres de reproduction équine et ne génèrent pas de stress particulier pour les juments. De plus, les ponettes du troupeau de l'INRAE de Nouzilly ont été habituées à ces procédures. La salle de prélèvement et de transfert d'embryon est équipée d'un tapis anti dérapant permettant aux ponettes de ne pas glisser pendant la réalisation de ces actes. Les ponettes sont aussi toujours en présence d'au moins un congénère pour éviter tout stress que pourrait générer un isolement. Enfin, les gestes de collecte et transfert ne sont réalisés que par des personnes formées à leur réalisation. Afin de garantir un confort maximal pour la ponette et le manipulateur lors d'un transfert, elle se voit administrer 30 min avant le transfert une dose de finadyne (10 ml) pour éviter une éventuelle inflammation au niveau de l'utérus qui serait synonyme de résorption embryonnaire. Elle reçoit également une dose de 0. 1ml de sédivet, pour permettre une légère sédation afin de réaliser le transfert sans mouvement parasite de la jument. Durant la procédure de prélèvements des ovocytes une personne est chargée de la surveillance de l'animal, de son confort. La ponette reçoit un sédatif (0. 1ml puis 0. 15ml), un analgésique et antispasmodique (15ml), un analgésique (0. 5ml), un antibiotique (20ml) et un anti-inflammatoire (2ml :100kg PV). Si besoin, la personne chargée du bien être de la ponette pourra injecter d'autres substances pour améliorer le confort de l'animal (analgésique, anti-inflammatoire, sédatif).

Les ponettes vivent en troupeau à l'année, la hiérarchie au sein du troupeau est donc bien établie et elles sont habituées à vivre ensemble. Elles sont hébergées en stabulation paillée et dès que les conditions climatiques le permettent elles sont mises à l'herbe.

18339 L'épilepsie touche plus de 50 millions de personnes dans le monde. Les épilepsies focales associées à des malformations corticales du développement sont parmi les plus sévères des épilepsies en raison de leur pharmacorésistance. Il est nécessaire de comprendre les mécanismes physiopathologiques à l'origine de ces crises afin de pouvoir développer de nouveaux médicaments antiépileptiques. Notre étude se focalise sur les épilepsies d'origine génétique, associées principalement à des mutations dans les gènes de la voie mTOR. Ces mutations sont retrouvées dans la plupart des dysplasies focales corticales (un des types de malformation corticale), en particulier dans les gènes MTOR et AKT3. Le laboratoire a d'ailleurs identifié, chez des patients épileptiques, la présence de mutation somatique, c'est-à-dire des mutations retrouvées seulement dans une population cellulaire : ici les neurones corticaux. Pour comprendre l'impact de ces mutations dans MTOR et AKT3, nous générons 3 lignées de souris transgéniques inductibles afin d'exprimer de manière stable deux mutants du gène mtor (S2215F et L1460P) et un mutant akt3 (E17K). Afin de modéliser différents phénotypes retrouvés chez l'homme, nous nous proposons d'induire ces mutations à 2 stades différents de développement et avec 2 taux de mosaïcisme différents, c'est-à-dire touchant un certain pourcentage de neurones. En effet, chez l'homme, les

mutations somatiques de MTOR et AKT3 sont retrouvées dans un pourcentage compris entre 0.5 % et 20 % des neurones de la région épileptique des patients.

Nos procédures expérimentales incluent l'étude transcriptomique, l'étude du phénotype épileptique et comportementale (comorbides à l'épilepsie) par électroencéphalographie (EEG) vigiles, et l'étude histologique et électrophysiologique du cortex dans le but de proposer un mécanisme d'épileptogénèse. Cela nous permettra ainsi d'envisager un traitement visant ces mécanismes.

Nos études nécessitent l'utilisation d'animaux puisque: (1) Les modifications cérébrales conduisant à l'émergence de l'épilepsie ne peuvent pas être étudiées chez l'humain. (2) La culture cellulaire, du fait de sa connectivité réduite, ne reproduit pas certaines propriétés des crises d'épilepsie dans un cerveau entier tels que le site d'initiation et le patron de propagation des crises. (3) La modélisation *in silico* nécessite des données expérimentales encore manquantes. Les souris présentent de nombreux avantages: (1) La possibilité de reproduire l'anomalie génétique humaine grâce aux nouvelles techniques génétiques. (2) Les rongeurs ont un cerveau suffisamment complexe pour générer des crises d'épilepsie. (3) De nombreux modèles d'épilepsie ont été développés dans ces deux espèces permettant d'avoir accès à d'abondantes données. Nous estimons qu'un maximum de 2160 souris seront nécessaires à la réalisation de ce projet.

Nos travaux seront réalisés dans l'application de la règle des 3 R (remplacer, réduire, raffiner).

Remplacer : Afin de limiter au maximum l'utilisation des modèles animaux utilisés au cours de ce projet, la culture neuronale sera privilégiée dans certains aspects de nos travaux.

Réduire : Nous ferons une planification rigoureuse des expériences en testant préalablement la faisabilité des expériences, en combinant différents protocoles au cours d'une même expérience et en réalisant une exploitation maximale des données à l'aide de l'utilisation appropriée de tests statistiques comme le test de student. Notamment, nous utiliserons un groupe contrôle pour 2 traitements.

Raffiner : Un soin particulier sera apporté à la réduction de l'inconfort, de la douleur et du stress des animaux grâce à l'utilisation combinée d'anesthésiques et de analgésiques, mais aussi de conditions d'hébergement adéquates et en milieu enrichi.

18340 Le contexte de cette proposition est l'administration de médicaments en aérosol. L'aérosolthérapie est considérée comme majeure pour la prise en charge du traitement des maladies respiratoires chroniques. Les plus courantes sont la BPCO chez les adultes et la bronchiolite chez les enfants. La bronchopneumopathie chronique obstructive (ou BPCO) est une maladie chronique inflammatoire des bronches, le plus souvent associée à d'autres maladies. Elle se caractérise par un rétrécissement progressif et une obstruction permanente des voies aériennes et des poumons, entraînant une gêne respiratoire.

Ce projet a pour objectif de développer un modèle pré-clinique *ex vivo* (correspondant à l'anatomie de l'adulte ou de l'enfant) avec des paramètres respiratoires contrôlés permettant de simuler de nombreuses affections respiratoires (de conditions saines à des affections pulmonaires obstructives). Initialement ce modèle a permis de réduire les essais sur les animaux (« principe des 3R »), puisque les poumons d'animaux utilisés pour mettre au point le dispositif de ventilation dans cette étude ne provenaient pas initialement d'animaux destinés à la recherche scientifique, mais de déchets organiques. Aujourd'hui la première phase du projet est réalisée et ce dispositif de ventilation *ex vivo* est fonctionnel. Afin d'étudier les effets de différentes techniques d'aérosolthérapie testés sur ces poumons issus initialement de déchets organiques, il est nécessaire de travailler sur un modèle *ex vivo* le plus proche possible de celui de l'homme. L'étude sera réalisée sur des porcs charcutiers comme modèle animal, en raison des nombreuses similitudes anatomo-physiologiques avec l'homme.

Le projet consiste donc à travailler sur des poumons prélevés dans les mêmes conditions que celle de la transplantation pulmonaire. Ainsi, pour avoir un raffinement optimal, les animaux donneurs seront prélevés après leur mort dans les mêmes conditions que les patients humains donneurs d'organe. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés dans les études scientifiques, les animaux donneurs seront, à chaque fois que ce sera possible, issus d'études scientifiques sans réveil afin

de ne pas utiliser d'animaux supplémentaires. Le nombre d'animaux maximal utilisés par an sera de 10 soit au total 50 animaux sur les 5 années que pourra durer l'étude.

18341 L'amélioration de l'efficacité alimentaire est un enjeu économique et environnemental majeur de la filière porcine. Il permet une réduction de la part du coût alimentaire dans le coût de production des animaux. Une meilleure utilisation des aliments par les animaux permet une réduction de l'impact environnemental de l'élevage, par la diminution des rejets (urine et fèces). Depuis 2000 une expérience de sélection a permis de créer 2 lignées porcines divergentes pour leur efficacité alimentaire.

La présente demande concerne l'hébergement des porcs en engraissement. En effet les surfaces d'hébergement en conditions expérimentales et en élevages agricoles sont différentes. Il est nécessaire pour une expérience de sélection d'élever et de tester les porcs dans les conditions d'hébergement en élevages standard, et non dans des conditions d'hébergement de type expérimentation animale, pour obtenir des résultats utilisables sur le terrain par les éleveurs. La procédure de testage et de sélection ne nécessite pas de prélèvements ni de contention spécifique engendrant une douleur ou un inconfort des animaux. Il s'agit d'élever ces animaux comme ils le seraient dans une ferme classique, soit par exemple avec une surface de 0,4m²/porc de 40kg, au lieu de 0,7m² en élevage expérimental.

Afin d'observer de la variabilité entre les porcs, de sélectionner ceux à performances particulièrement élevées ou particulièrement faibles et de mesurer les effets de la sélection sur les performances, un nombre élevé de porcs doit être engraisé. Dans ce dispositif, il s'agit de 960 porcs par an, soit 4800 porcs (5 x 960 porcs) pour la durée de 5 ans couverte par cette demande.

La règle des 3R est prise en compte dans ce projet :

-Remplacer : par nature, le projet concerne l'espèce porcine. Les résultats de ces études sont cependant communiqués plus largement que dans la communauté porcine, servant en particulier pour d'autres productions de monogastriques en croissance (lapins, volaille).

-Réduire : l'effectif total d'animaux est élevé, pour observer une grande variabilité des performances et maintenir la diversité génétique de la population. Nous ne pouvons le réduire plus, mais aucun prélèvement invasif n'est appliqué à ces animaux.

-Raffiner : De façon à favoriser le bien-être des animaux, les porcs bénéficient d'enrichissement de leur milieu de vie (chaines, bois à ronger, jeux. . .).

18342 Pour contrer la crise mondiale imminente due au vieillissement et aux maladies neurodégénératives associées, des stratégies de rajeunissement émergent. Le transfert de plasma ou de facteurs plasmatiques des jeunes aux personnes âgées a donné des résultats mitigés dans les essais sur l'homme. Deux raisons peuvent expliquer cela: 1) jusqu'à présent, les études manquaient étant donné que le système immunitaire est durablement façonné tout au long de la vie en réponse aux infections, qui peuvent, à leur tour, affecter la teneur en facteurs plasmatiques de vieillissement du sang. En effet, le vieillissement qui affecte aussi le système immunitaire et des processus inflammatoires dans tout le corps peuvent à bas bruit contribuer aux maladies liées à l'âge et tous deux sont favorisés par des infections persistantes. Le rajeunissement du corps entier à l'aide de quelques protéines semble peu probable étant donné la grande complexité de la composition du sérum. Les vésicules extracellulaires (EV) font partie du sérum. Leur composition complexe dépend de l'organe qui les a produites. Les neurones sont à l'origine de 10% des EV du sérum (SEVON). Les SEVON pourraient donc être des messagers porteurs d'informations complexes dans le corps et pourraient fortement affecter les fonctions cellulaires. Les SEVON pourraient être à l'interface des compartiments immunitaire et neuronal pendant les infections persistantes et jouer un rôle essentiel dans la régulation de l'âge biologique des deux compartiments. Dans ce projet, nous allons combiner l'utilisation d'un modèle de souris Alzheimer dans lequel on peut induire la maladie ou la supprimer par simple traitement et l'infection par un parasite, le toxoplasme qui cible le cerveau, pour déterminer l'impact d'une infection persistante sur la progression de la maladie. Nous étudierons les changements biochimiques et fonctionnels des cellules immunitaires, des neurones

et des SEVON au cours de la neurodégénérescence combinée avec le toxoplasme. A terme nous mesurerons le pouvoir rajeunissant de SEVON de jeunes souris indemnes d'infection chez de vieilles souris infectées. Notre projet mettra en lumière les mécanismes du vieillissement cognitif et pourrait identifier ces interactions neuro-immunes comme une nouvelle cible thérapeutique prometteuse dans les troubles liés à l'âge.

Ici, il est proposé d'utiliser des modèles de souris dans lesquels il est possible d'induire ou de supprimer l'expression des molécules qui entraînent les symptômes correspondant à la maladie d'Alzheimer. Cela permettra d'étudier l'importance d'une infection pré-existant avant le développement de la maladie et de mimer la situation rencontrée dans le cas humain.

Le recours à un modèle animal est donc irremplaçable pour cette étude, puisqu'elle vise à déterminer les effets de l'infection et de facteurs sériques sur la physiologie de neurones, le comportement et la cognition.

Il est prévu d'utiliser un maximum de 1872 souris sur 5 ans.

La règle des 3R sera appliquée pour ce projet comme suit :

1- Remplacement : le recours à l'expérimentation animale dans le cadre de cette étude intervient après des études préliminaires in vitro utilisant des modèles cellulaires qui ont permis de valider l'impact de vésicules extracellulaires neuronales sur des lignées cellulaires de type immun et sur l'activation des cascades conduisant aux cassures double-brins de l'ADN. Le principe de remplacement n'est pas applicable à ce projet car ces études in vitro ne permettent pas d'étudier l'importance des manipulations proposées sur le comportement et la cognition.

2- Réduction : les expériences sont planifiées de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux, tout en permettant une analyse statistique valide des résultats. Des études sur des modèles animaux similaires ont montré que des groupes de 12 animaux par expérience comportementale étaient nécessaires. En outre, un même groupe d'animaux pourra être utilisé pour plusieurs tests comportementaux, et analyses biochimiques.

3- Raffinement : Les conditions d'expérimentations font l'objet d'une procédure de suivi du bien-être animal. Les animaux seront suivis quotidiennement dès le début des procédures. Un animal sera euthanasié s'il présente un des points limites d'arrêt de la procédure, que nous aurons définis en accord avec le comité local de suivi du bien-être animal pour limiter la douleur, la souffrance ou l'angoisse de l'animal. Nous nous attendons à ce que l'infection conduisent à un état fébrile passager d'une semaine. Les animaux seront euthanasiés si nous observons l'un des signes suivants : perte de poids > 30%, et état de déshydratation, ou un état fébrile persistant au-delà de 10 jours.

18343 La grippe pose un problème de santé majeur causant environ 500 000 décès par an. Une pandémie de grippe pourrait toucher des millions de personnes dans le monde et perturber la société, comme l'ont montré les pandémies de SARS-CoV en 2003 et de SARS-CoV-2 en 2020. La grippe pandémique a un potentiel de propagation beaucoup plus important que le SARS et aura probablement un impact plus important sur la santé et l'économie mondiale. Certaines personnes sont susceptibles de développer une forme grave, notamment les personnes âgées >65 ans, les enfants ≤5 ans, les personnes atteintes de maladies chroniques et les femmes enceintes.

La vaccination contre la grippe est le meilleur moyen de prévenir les complications graves et les décès associés. L'absence de vaccins antigrippaux efficaces et abordables limite considérablement notre capacité à contrôler la grippe saisonnière chaque année et dans le cas d'une pandémie.

Les vaccins antigrippaux actuels offrent une protection de près de 40 % et, par conséquent, 60 % des personnes vaccinées ne sont pas suffisamment protégées. Notre objectif est donc de développer une nouvelle génération de vaccins antigrippaux qui induisent une réponse anticorps optimale, robuste et durable en utilisant de nouveaux antigènes grippaux synthétisés in vitro et dépourvus de propriétés immunosuppressives.

Pour ce projet d'une durée de 5 ans, nous utiliserons 900 souris Balb/c.

Les expériences sur le modèle murin sont le seul moyen de déterminer quels antigènes de la grippe donnent une réponse immunitaire maximale. La réponse anticorps à des antigènes vaccinaux est en effet impossible à modéliser *in vitro*. Les données issues de ces expériences seront indispensables pour évaluer ces nouveaux antigènes grippaux en vue d'essais cliniques chez l'homme. Ces essais cliniques constituent la deuxième phase de notre projet.

Nous avons strictement suivi le principe des 3 R durant la conception de ce protocole.

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

Réduction : Le nombre de répétition des expériences sera défini de manière rationnelle : si une expérience donne des résultats statistiquement significatifs avec une puissance appropriée, elle ne sera pas répétée, sinon elle sera répétée deux à trois fois maximum. Les organes, sérum et cellules des souris sacrifiées en fin d'expérience sont conservés; ainsi, aucune expérience supplémentaire ne doit être faite si des questions nouvelles surviennent.

Raffinement : les souris seront hébergées en accord avec les lois d'éthique françaises. Les animaux seront contrôlés quotidiennement pour évaluer et réduire au maximum tout risque de douleur. Les gestes susceptibles d'entraîner une douleur seront réalisés sous anesthésie gazeuse. Les animaux malades seront soignés ou euthanasiés. Les conditions de vie seront améliorées au maximum (5 souris maximum par cage, ajout de nids végétaux et de tunnels en carton).

18344 Le sepsis désigne une inflammation généralisée associée à une infection grave. soit 1/3 des décès à l'hôpital. Les péritonites, infections originaires de la cavité abdominale, sont une des principales causes de sepsis. La plupart des péritonites sont dues à des bactéries libérant de puissants activateurs de l'inflammation : les endotoxines (ou lipopolysaccharides, LPS). Les LPS présents dans la cavité péritonéale passent rapidement dans la circulation (endotoxémie), déclenchant une réaction inflammatoire incontrôlée. Les lipoprotéines, dont le rôle est de transporter les lipides (cholestérol, triglycérides) dans la circulation, ont la capacité de lier les LPS circulants, provoquant leur neutralisation et leur détoxification. L'association entre LPS et lipoprotéines est favorisée par la protéine de transfert des phospholipides (PLTP). Notre groupe a pu démontrer dans des expériences préliminaires que l'inactivation des LPS par les lipoprotéines sous l'effet de la PLTP peut avoir lieu encore plus précocement : dans la cavité péritonéale, avant que les LPS n'aient pu rejoindre la circulation.

De nombreux patients en soins intensifs sont placés sous nutrition parentérale, procédure basée sur l'apport de nutriments par voie extra-digestive. L'Intralipide 20% est une émulsion lipidique agréée par l'ANSM et couramment utilisée dans la nutrition parentérale. Les gouttelettes lipidiques présentes dans cette émulsion possèdent des propriétés similaires à celles des lipoprotéines. Ainsi notre groupe a pu montrer *in vitro* que ces gouttelettes sont capables de lier les LPS.

Le présent projet vise à déterminer si une supplémentation en Intralipide par injection intrapéritonéale permet de protéger contre les effets néfastes des LPS dans un modèle de péritonite chez la souris. La réponse inflammatoire et les taux de survie suite à l'injection de LPS dans la cavité péritonéale seront comparés chez des souris type sauvage (PLTP active) et des souris génétiquement modifiées dépourvues de PLTP active (souris PLTPKO), supplémentées ou non en Intralipide.

Notre démarche expérimentale répondra aux exigences de la règle des 3R.

- **Remplacement** : Notre étude exclut l'utilisation de modèles *in vitro* ou d'animaux inférieurs dont l'anatomie (barrière péritonéale), le système circulatoire et immunitaire sont trop éloignés de celui des mammifères. Nous utiliserons le plus petit modèle de mammifère, la souris, en tirant parti de l'existence d'un modèle PLTPKO.

- **Réduction** : Les effectifs ont été optimisés sur la base des coefficients de variabilité reportés dans la littérature et les différences attendues entre les différents groupes pour les paramètres clés-de

l'étude (taux de survie et concentrations de LPS). Nos précédents projets utilisant l'administration intrapéritonéale de LPS nous ont permis de connaître les doses optimales à utiliser.

- Raffinement : L'intervention sur les animaux sera limitée à deux injections intrapéritonéales et un prélèvement sanguin avant mise à mort sous anesthésie. Des points limites seront déterminés. Le milieu d'hébergement des animaux sera enrichi.

Ces études nécessiteront au total l'utilisation de 192 souris.

18345 L'insuffisance rénale chronique (IRC) touche entre 8 et 16 % de la population mondiale et peut évoluer vers une insuffisance rénale terminale (IRT), nécessitant un traitement de substitution rénale par dialyse ou par transplantation rénale. Cette dernière permet de réduire la morbidité et la mortalité, et présente une qualité de vie et des avantages socio-économiques et sanitaires substantiels. Cependant, avec la charge croissante de l'IRT et la pénurie d'organes transplantables, il est urgent d'améliorer la survie à long terme des greffons rénaux.

Au cours des dernières décennies, l'application de traitements immunosuppresseurs efficaces lors des transplantations, en particulier les inhibiteurs de la calcineurine (CNI) a entraîné une diminution de l'incidence du rejet précoce médié par les cellules T (TCMR), la réponse immunologique la plus courante observée après une transplantation rénale. Toutefois, les taux de survie des greffons à moyen et long terme ne se sont guère améliorés, probablement du fait d'un contrôle insuffisant de la réponse allo-immune par les traitements actuels.

Alors que les mécanismes d'activation de la réponse allo-immune (reconnaissance directe et indirecte des molécules de HLA) sont bien connus, les étapes effectrices qui suivent ne sont à ce jour que peu élucidées. Jusqu'à présent des progrès ont été réalisés via des modèles murins transgéniques, relevant par certains aspects mais ne reproduisant pas l'ensemble du processus.

Nous faisons l'hypothèse qu'une nouvelle technique le single cell RNAseq (scRNAseq), qui permet de mesurer, via leur ARNm, l'activité de chaque cellule, va permettre la description de la réponse allo-immune dans toute sa complexité au sein d'un organe greffé comme le rein.

Différents modèles de recherche chez le porc et chez le primate-non-humain (PNH) peuvent mimer parfaitement des situations cliniques connues chez l'homme et permettent ainsi de mieux caractériser les mécanismes immunologiques impliqués dans des conditions précliniques proche de l'Homme.

Le but de cette étude sera donc de caractériser, à l'aide de la technique innovante de "scRNAseq", la cinétique et les mécanismes cellulaires précoces du rejet d'organe mis en place dans le greffon dès les premiers jours post-transplantation. Il est nécessaire de réaliser ces expériences dans des modèles animaux, de façon à pouvoir extrapoler ce qui se passe chez l'Homme.

Cette étude se développera en 3 phases :

1) mise au point de la conservation des prélèvements tissulaires après prélèvement d'organe (sans transplantation) chez le porc, et adaptation de la technique de scRNAseq à ces prélèvements rénaux ;

2) étude de la cinétique et des mécanismes immunologiques précoces de rejet chez le porc transplanté rénal (scRNAseq).

3) étude de la cinétique et des mécanismes immunologiques précoces de rejet chez le macaque transplanté rénal (scRNAseq).

Les résultats permettront de mieux caractériser le mécanisme d'infiltration des cellules du receveur dans les tissus du donneur dans les temps précoces de greffe, d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et cellules régulatrices, et par la suite d'orienter notre recherche vers de nouvelles stratégies thérapeutiques précoces permettant une meilleure acceptation de la greffe.

Il n'existe pas de remplacement possible pour ces expérimentations qui font interagir un système (immunitaire) avec un organe (le rein) dans un organisme (mammifère).

Le nombre maximum d'animaux utilisés au cours de cette étude sera de 23 :

- 20 porcs (donneurs et receveurs d'organes compris).

- 3 macaques (donneurs et receveurs d'organes compris).

Dans un souci de respect de la règle des 3R, les reins d'un même et seul donneur seront greffés simultanément à deux receveurs différents. Les principes de raffinement contribueront à réduire le nombre d'animaux utilisés tout au long du protocole.

De façon à diminuer le stress, la souffrance et la douleur, toutes les procédures de ce projet seront réalisées chez ces animaux sous anesthésie générale et un traitement antalgique leur sera donné de façon adaptée en fonction de la procédure et de l'espèce.

Les primates non-humains (PNH) sont hébergés avant protocole expérimental en volière, de façon à préserver leur mode de vie en communauté. Au cours du protocole expérimental les PNH sont hébergés dans des cages séparées, mais jointives permettant la vision et la communication entre congénères.

Les porcs sont hébergés avant protocole expérimental, dans des boxes à plusieurs suivant les comportements. Au cours du protocole expérimental les porcs sont hébergés dans des boxes séparées, mais au sein d'une même pièce permettant la communication entre congénères.

Un enrichissement alimentaire (fruits et/ou légumes) est apporté quotidiennement, un enrichissement par jeux (différentes activités) est apporté en rotation dans les cages et boxes selon un programme hebdomadaire (porcs et primates). Enfin, un aménagement (perchoirs, cordes...) des cages permet un enrichissement de mouvements des primates.

18346 Dans le cadre de la réalisation de prestations de techniques de cryoconservation et de reproduction assistée sur rongeurs de laboratoire au sein de notre laboratoire des Sciences de la Reproduction et pour les besoins de la communauté scientifique, nous avons recours dès que possible à un traitement de superovulation des femelles à collecter afin d'accroître leur rendement ovaire.

Ainsi et conformément à la règle des 3R, un traitement de superovulation permet d'obtenir un nombre accru d'ovocytes ou d'embryons par femelle et donc de réduire le nombre d'individus à utiliser.

Deux hormones sont utilisées pour l'établissement de cette superovulation :

- la PMSG est utilisée pour mimer l'effet de maturation des ovocytes des follicules endogènes (FSH)
- et la hCG qui est utilisée pour mimer l'ovulation induite par la LH.

Depuis les dernières décennies, la superovulation est utilisée avec succès pour la génération de modèles génétiquement modifiés comme pour la réalisation de techniques de Sciences de la reproduction pour la communauté scientifique.

Au sein de notre structure nous privilégions ce traitement afin de réduire le nombre d'animaux à collecter.

Grâce à l'administration de gonadotrophines, il est possible d'induire chez les femelles traitées, une ovulation avec un nombre d'ovocytes supérieur à la normale et à un moment prévisible. Ceci entraîne donc une diminution du nombre de femelles nécessaire pour la collecte d'une quantité définie d'embryons pour laquelle nous n'aurions pas eu recours à ce type de traitement.

La technique de superovulation décrite ci-dessous est celle couramment utilisée pour assurer les prestations de cryoconservation de modèles ou dans l'application de techniques de raffinement d'élevage intégrant des transferts d'embryons visant à assainir une colonie respirante ou l'accroître plus rapidement.

La réponse à l'injection de gonadotrophine varie d'une souche à l'autre au sein même d'une même espèce de rongeurs. La dose optimale et l'âge des femelles sont préalablement définis pour chaque souche en effectuant des injections préliminaires dose-réponse et par expérience. En règle générale, des doses de 5 à 10 unités internationales (UI) par souris de chaque gonadotrophine et âgées de 21 à 35 jours (poids corporel de 12 à 14 grammes) donneront le meilleur rendement en œufs fécondés. Chez le rat, les doses varient entre 20 et 50 UI par individu femelle et de préférence prépubère.

Les femelles reçoivent une injection intra-péritonéale (IP) de sérum de jument gestante (PMSG) le jour 1.

Le 3ème jour (48 à 52 Heures après l'injection de PMSG), elles reçoivent une injection IP de gonadotrophine chorionique humaine (HCG).

Si la fertilisation à lieu IN VIVO, immédiatement après l'injection de hCG, la femelle est accouplée avec un mâle fertile pour une nuit. Le lendemain un contrôle de la présence ou de l'absence de bouchon vaginal, témoignant d'un coït est réalisé.

Si la fertilisation à lieu IN VITRO, les femelles sont prélevées après avoir été mise à mort au CO2 ou par dislocation cervicale selon les protocoles autorisés par la directive 2010/63/UE et les ovocytes mis en contact de sperme fécondant dans un milieu et des conditions atmosphérique optimales pour la fécondation.

Nous réaliserons ce traitement sur un nombre maximum de 8700 rongeurs par an soit 43 500 rongeurs pour une période de 5 années

La règle des 3R est appliquée pour le principe de réduction et de raffinement.

1) Réduction du nombre d'animaux : nous réalisons la prestation à la demande de nos clients. Le nombre d'animaux dépend du besoin de ces derniers.

2) Limitation de la douleur/souffrance/angoisse : Les animaux seront maintenus dans des cages contenant de l'enrichissement, dans des conditions optimales de température avec cycle jour/nuit de 12h/12h et avec accès à volonté à l'eau et à la nourriture. Ils seront surveillés quotidiennement par du personnel qualifié afin de s'assurer de leur bon état général : comportement, aspect du pelage, perte de poids, mobilité ou tous autres troubles seront vérifiés afin de s'assurer du bien-être des animaux. En cas de changement de comportement ou d'aspect, une surveillance augmentée sera mise en place.

3) Impact environnemental : aucun.

Pour le Remplacement, sachant que la nature même du projet vise à obtenir un meilleur rendement ovulaire de l'espèce choisie pour réduire et raffiner, le remplacement d'individu de cette dernière n'est pas envisageable.

18347 Intitulé : Évaluation de candidats-médicaments par neuroimagerie fonctionnelle dans des modèles de tremblements essentiels par administration d'harmaline chez le rat et la souris

Durée: 60 mois

Mots-clés : Neuroimagerie ; tremblements essentiels ; Harmaline

Finalité

Recherche translationnelle : évaluation et sélection de candidats médicaments par imagerie sur un modèle de tremblements essentiels en vue d'utilisation future chez l'humain

Objectifs et bénéfices

Les troubles du système nerveux central affectent près d'un milliard de personnes dans le monde. Ils sont l'une des premières causes d'invalidité et représentent un enjeu majeur de santé publique. Parmi ceux-ci, nous nous intéresserons ici aux tremblements essentiels, une des plus fréquentes pathologies du mouvement, qui représente un enjeu médical important avec une prévalence estimée à presque 1% de la population générale et des symptômes très invalidants pour le patient (tremblements des membres supérieurs et parfois de la tête et des membres inférieurs, initiés lors du mouvement).

L'objectif de ce projet de recherche translationnelle est d'utiliser plusieurs techniques complémentaires de neuroimagerie fonctionnelle (imagerie par ultrasons fUS, par résonance magnétique fonctionnelle IRMf ou tomographie par émission de positons TEP) et une analyse comportementale pour caractériser l'effet cérébral de candidats-médicaments dans un modèle de tremblements essentiels. Les différentes techniques permettent d'évaluer l'activité cérébrale. L'objectif principal est de sélectionner les candidats médicaments les plus susceptibles d'être

efficaces dans de futures études chez l'humain, et l'objectif secondaire est de mieux comprendre les altérations des circuits cérébraux survenant lors des tremblements essentiels.

Nuisances prévues

Le modèle de tremblements essentiels utilisé consiste en l'injection unique d'une molécule, l'harmaline, qui provoque dès la première administration des tremblements à une fréquence similaire à celle de la pathologie. Cela constitue une nuisance courte puisque les symptômes cessent après 2 heures. Les différents candidats médicaments seront injectés en co-administration avec l'harmaline, afin de vérifier si les effets induits par l'harmaline en imagerie sont réduits par ces candidats médicaments par rapport à une injection d'harmaline seule. L'injection de ces candidats médicaments ne devrait pas provoquer de nuisance car ils sont sélectionnés parmi des molécules connues et bien tolérées, déjà administrées chez l'animal et pour lesquelles il existe des données de toxicité. Les animaux seront étudiés soit par imagerie fUS soit par IRMf, soit par TEP, soit par étude comportementale complémentaire visant à estimer la sévérité des tremblements. Les procédures d'imagerie fUS nécessiteront de réaliser une fenêtré de craniotomie (de 4 millimètres par 3 millimètres) afin de visualiser les structures profondes impliquées dans l'effet de l'harmaline. Une nuisance possible de cette procédure est l'apparition d'hémorragie lors de la chirurgie ou bien d'infection éventuelle à la suite de celle-ci, cependant le protocole sera optimisé de façon à ce que les risques de ces complications soient minimales (zone opérée réduite au maximum, stérilisation du matériel, administration systématique d'antibiotique et d'anti-inflammatoire en plus de l'analgésie et de l'anesthésie profonde). Les autres procédures d'imagerie ne nécessitent pas de chirurgie. Une partie des animaux sera étudiée en conditions d'éveil, après une habituation progressive afin de réduire le possible stress occasionné, dans le but de confirmer l'efficacité du candidat médicament le plus prometteur identifié lors de l'imagerie chez les animaux anesthésiés. 259 souris et 355 rats soit 614 rongeurs seront utilisés au total au maximum sur les différentes techniques permettant l'évaluation de candidats médicaments, avant euthanasie.

Remplacement

Nous avons au préalable effectué des études in vitro pour identifier les candidats médicaments les plus prometteurs parmi de nombreuses molécules, limitant l'utilisation des animaux. L'objectif est d'étudier des conditions proches de celles des futurs patients, on souhaite donc confirmer l'effet des molécules sur l'organisme vivant. Les molécules doivent être évaluées et validées chez l'animal avant d'être administrées à des patients.

Réduction

Le nombre d'animaux par groupe a été déterminé sur la base de calcul de puissance statistique compte tenu de la taille des effets observés et de la variabilité connue. Le nombre total proposé est un maximum et sera réduit si les candidats médicaments ne présentent pas d'effet bénéfique lors des premières phases de l'étude. L'objectif est d'identifier le candidat médicament le plus prometteur par imagerie fUS au début du projet avant d'effectuer le reste des études sur un nombre d'animaux réduit.

Raffinement

Les animaux seront surveillés régulièrement grâce à une grille de score et des points limites adaptés après la chirurgie par craniotomie. La douleur sera réduite au maximum par l'administration d'analgésiques dès l'apparition de signes. En cas de signes de détresse, la procédure serait interrompue et si nécessaire, l'euthanasie serait effectuée. Les expériences chez l'animal éveillé seront précédées par une phase d'habituation afin de minimiser le stress. L'environnement sera enrichi avec morceaux de bois, boîtes ou cylindres.

18348 Les expositions environnementales sont connues pour avoir un impact à long terme sur les phénotypes, parfois sur plusieurs générations. Mais s'il a été démontré que l'épigénétique explique une partie de la variabilité des caractères complexes, liée aux interactions avec l'environnement, l'ampleur de cette influence doit encore être évaluée avec précision. L'épigénétique transgénérationnelle est une question fascinante dans la communauté scientifique et fait l'objet de débats intenses. Le but du projet est d'étudier, chez la caille, comment les changements de

l'environnement d'un individu modifient les phénotypes pendant plus de 3 générations. Il repose sur un modèle animal original, à la suite d'une étude pilote démontrant que l'environnement embryonnaire influence les phénotypes pendant au moins trois générations.

La présente proposition tire parti de ce modèle pour mieux estimer les parts respectives de la variabilité phénotypique due à la génétique et à l'épigénétique, et pour améliorer les modèles de prédiction du phénotype en tenant compte des marques épigénétiques.

Deux "épi-lignées" seront comparées, une lignée témoin non traitée et une lignée dont les ancêtres ont été soumis à un environnement modifié au cours du développement - via l'addition d'un phytoestrogène naturel dans le régime des mères - en analysant leurs phénotypes, génotypes et épigénotypes. Nous identifierons la "signature épigénétique" du traitement des ancêtres et évaluerons quantitativement les parts respectives génétique et non-génétique de la variabilité phénotypique. Nous proposerons des modèles statistiques pour la sélection génétique prenant en compte l'hérédité non génétique.

Les résultats attendus du projet sont donc d'évaluer quantitativement l'impact de l'hérédité non génétique sur les phénotypes, de proposer de meilleurs modèles statistiques pour la sélection génétique en tenant compte de la contribution épigénétique, et de faire progresser l'identification des mécanismes moléculaires conduisant à une transmission non génétique par les gamètes.

Ce programme sera le premier chez les oiseaux à analyser les données épigénétiques obtenues sur plusieurs générations.

D'un point de vue appliqué, ce projet ouvrira la voie à de meilleurs modèles de sélection génétique en incluant la composante épigénétique de la variabilité phénotypique, augmentant à la fois la précision des modèles de prédiction et leur efficacité dans la sélection animale. Au-delà de la sélection, le projet contribuera à la mise au point de systèmes d'élevage améliorés, prenant mieux en compte la transmission non génétique, particulièrement importante pour les espèces utilisées en croisement. Le projet améliorera en outre la compréhension des bases moléculaires de la construction de phénotypes pour des caractères économiquement importants tels que la production d'oeufs, la croissance et le bien-être des animaux.

Le projet utilisera un total de 1320 animaux, sur 4 générations, dans le respect de la règle des 3R.

- Remplacer :

L'objectif principal de l'étude étant d'évaluer la transmission des effets de l'environnement entre générations, il est impossible de remplacer les animaux par des analyses in vitro. De plus, nous voulons déterminer si l'épigénétique transgénérationnelle est utilisable dans les espèces de rente. L'utilisation d'autres espèces, comme *C. Elegans* ou la souris, déjà utilisées dans des études de ce type, n'est donc pas envisageable, sachant que les mécanismes épigénétiques ne sont pas identiques entre nématodes et vertébrés, ni même entre mammifères et autres vertébrés.

- Réduire :

Nous testons 100 animaux par lignée et par sexe pour 2 épilignées, pendant 4 générations. Les 4 générations sont le minimum nécessaire pour déterminer si l'épigénétique transgénérationnelle est avérée. L'effectif utilisé est le minimum nécessaire pour détecter des différences statistiquement significatives entre groupes (contrôle et issu de mères supplémentées), calculé en utilisant les paramètres déterminés d'après les analyses préliminaires que nous avons réalisées. Nous avons utilisé dans cette étude pilote un modèle mixte prenant en compte le sexe des individus et leurs poids adulte, quand cela était justifié, en intégrant en effet aléatoire l'origine génétique du fondateur.

- Raffiner :

Les marques épigénétiques étant susceptibles d'être modifiées en fonction de l'environnement, il est crucial pour la fiabilité des résultats que les animaux soient élevés dans les meilleures conditions possibles, en évitant en particulier toute perturbation susceptible d'affecter leur bien-être. Dans cette optique, une visite quotidienne sera réalisée, permettant notamment de vérifier qu'il n'y a pas de perte de poids, de comportement anormal, de maladie à effets visibles. . . Les cages sont enrichies par des rondelles métalliques faisant office de jouets.

Aucune méthode invasive ne sera utilisée, et la prise de sang, nécessaire aux analyses de méthylation, sera réalisée dans le strict respect des conditions de bien-être des animaux, par une personne compétente qui participe aux soins quotidiens des animaux.

18349 L'autisme est une maladie du développement diagnostiquée en présence de deux types de symptômes : (1) une perturbation du comportement social et (2) des comportements répétitifs. On ne connaît actuellement pas la cause de la maladie, mais il a été proposé que des facteurs environnementaux, en particulier pendant gestation, puissent contribuer au développement de la pathologie. A l'exception de l'acide valproïque (Dépakine) ou de certains antidépresseurs, les agents environnementaux susceptibles de déclencher un syndrome autisme restent à identifier. Des études récentes chez l'homme montrent les femmes enceintes souffrant d'obésité présentent une prédisposition à mettre au monde un enfant atteint d'autisme ou d'un autre trouble neurodéveloppemental. S'il est connu que l'exposition prénatale à un régime déséquilibré (« cafétéria diet ») induit des modifications comportementales chez la souris, ces modifications n'ont jamais été étudiées sous l'angle de l'autisme. Nous souhaitons donc étudier l'impact de l'exposition de mères gestantes à un régime cafétéria sur le phénotype comportemental de la descendance, en recherchant plus particulièrement des signes d'autisme.

Pour ce projet, nous travaillerons chez la souris, un animal social dont le répertoire comportemental est suffisamment riche pour étudier le développement de signes d'autisme (maladie dont le diagnostic clinique est exclusivement comportemental).

Le projet de recherche que nous développons tient compte du bien-être animal en respectant le principe des 3R à savoir raffiner, réduire et remplacer.

Nous raffinerons nos expériences en prenant un soin particulier pour limiter les situations de souffrance ou d'inconfort des animaux tout au long du protocole expérimental. Nous hébergerons les animaux dans un environnement enrichi (maisonnette en carton, matériel de nidification) afin d'assurer leur bien-être. Nous avons défini des points limites pour l'ensemble de nos expériences pour limiter les situations de souffrance ou d'inconfort des animaux.

Afin de réduire le nombre d'animaux nécessaire pour réaliser nos expériences, nous utiliserons les animaux des deux sexes (mâles et femelles) et nous testerons chaque animal dans plusieurs paradigmes comportementaux afin de recueillir le plus d'informations possible pour chaque cohorte expérimentale. L'utilisation d'outils statistiques puissants nous permettra de réduire le nombre d'animaux nécessaire à la réalisation des expériences.

Toutefois, nous ne pouvons pas nous passer du modèle animal car l'autisme est une pathologie complexe qui ne peut être modélisée qu'au niveau de l'animal entier, exprimant toute la variété de son répertoire comportemental.

La mise en œuvre du projet de recherche nécessitera l'utilisation de 120 souris sur 24 mois.

18350 La narcolepsie avec cataplexie (NC) est un trouble du sommeil rare et handicapant. Cette affection est induite par la destruction spécifique des neurones produisant l'orexine. Cette pathologie est associée à des facteurs génétiques, environnementaux et biologiques, qui pointent vers une origine auto-immune. Par ailleurs, en 2009, la campagne de vaccination contre le virus grippal H1N1 a abouti à une augmentation drastique du nombre de cas de narcolepsie en Europe. Pour étudier les mécanismes immunitaires impliqués dans la NC nous avons développé un modèle de souris génétiquement modifiées, recréant la perte spécifique des neurones produisant l'orexine. Ce modèle offre une opportunité unique d'étudier les liens entre vaccination et narcolepsie. Collectivement, ces études permettront de disséquer les mécanismes capables d'aboutir à la destruction des neurones à orexine et de comprendre quelle est l'implication des facteurs environnementaux, tels que la vaccination anti-grippale. Cela pourrait également nous permettre de tester, dans une approche pré-clinique, certains traitements dans la NC. Pour l'ensemble du projet, il est prévu d'utiliser un maximum de 3393 animaux sur 5 ans avec 345 animaux pour axe I (lots 1, 2 et 3), 1134 animaux pour axe II (lots 4 à 13), et 1914 animaux pour l'axe III (lots 14 à 18).

La règle des 3R sera appliquée dans le cadre de ce projet.

1-Remplacement : le recours à l'expérimentation animale dans le cadre de cette étude se fait après de nombreuses études in vitro dans des modèles cellulaires montrant l'importance de ces gènes dans le fonctionnement du système immunitaire. Le principe de remplacement n'est pas applicable à ce projet car les études in vitro ne reproduiraient pas l'ensemble des voies impliquées dans des modèles physiologiques intégrés et par conséquent ne permettent pas l'obtention de résultats scientifiques exploitables et pertinents de la pathologie humaine.

2-Réduction : les expériences sont organisées de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux. Les études effectuées nous ont permis de maîtriser ces modèles murins permettant de réduire le nombre d'animaux. De plus, nous avons également pu valider certaines approches expérimentales in vitro permettant d'optimiser l'utilisation des animaux. Les résultats actuels ont permis de valider que des lots de 5 souris selon les paramètres à évaluer permettent d'acquérir des données fiables. L'utilisation des deux sexes permet de réduire le nombre de portées à générer pour produire les souris utilisées en expérience. De ce fait, la règle des 3Rs est appliquée.

3-Raffinement : Les conditions d'expérimentations font l'objet d'une procédure de suivi du bien être animal. Les animaux seront suivis quotidiennement à l'initiation du modèle. Un animal sera euthanasié s'il présente un des points limites d'arrêt de la procédure, que nous aurons définis pour limiter la douleur, la souffrance ou l'angoisse de l'animal.

18351 La mémoire de travail est un type de mémoire qui nous permet de retenir et de manipuler une quantité limitée d'informations pendant un temps relativement court. Elle nous permet de stocker ces informations durant quelques secondes tout en exécutant d'autres tâches. Ce type de mémoire nous permet ainsi par exemple de prendre des notes écrites durant une présentation orale. La mémoire de travail joue un rôle important dans l'apprentissage, comme l'apprentissage d'une langue, et dans différents types d'activités comme la lecture et la résolution de problèmes. Ce type de mémoire implique différentes régions cérébrales qui interagissent entre elles. Chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, un déficit de la communication entre ces régions cérébrales entraîne une détérioration de la mémoire de travail. L'étude de l'interaction entre ces différentes aires est donc importante pour comprendre son fonctionnement dans un cerveau sain mais également dans les pathologies associées. L'objectif de ce projet est de disséquer au niveau de la population de neurones comment les informations provenant de différentes aires cérébrales sont traitées.

Justification du respect de la règle des 3R.

Remplacer : ce projet nécessite l'utilisation d'animaux. En effet à ce jour il n'existe pas encore de méthodes alternatives, l'étude de la communication entre différentes aires cérébrales nécessite l'utilisation d'un cerveau intact.

Réduire : ce projet utilisera 70 souris C57BL6/J durant 5 ans. Nos groupes expérimentaux seront dimensionnés pour utiliser le plus petit nombre possible d'animaux tout en obtenant des statistiques solides.

Raffiner : nous soulagerons les douleurs générées durant les chirurgies en administrant les molécules antalgiques les plus adaptées. Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de leur vie avec une surveillance quotidienne par du personnel compétent. Ils auront accès en permanence à l'eau et à de la nourriture de qualité constante, préparée spécifiquement pour leurs besoins physiologiques. Ils seront hébergés en groupe sociaux dans des hébergements enrichis avec des éléments qui leur permettront de reproduire leurs comportements naturels. Dans le cadre de leur suivi quotidien comme au cours des procédures, des points limites seront définis pour éviter ou limiter toute souffrance.

18352 Les effets secondaires liés aux thérapies anti-cancéreuses comme la chute des cheveux, nausées, vomissements, diarrhées, douleurs ou fatigue surviennent rapidement après le début des traitements et durent parfois des mois après l'arrêt des traitements. Le projet qui est proposé, porte sur le développement d'une nouvelle molécule antioxydante, brevetée et sous couvert de

confidentialité, permettant de réduire les effets secondaires des traitements lourds comme la chimiothérapie et d'accélérer la récupération post-traitement des patients.

Ce projet a été validé et soutenu par le conseil scientifique du programme européen EUROSTARS. Le but de ce programme est de démarrer une étude clinique évaluant l'effet de cette protéine antioxydante sur la qualité de vie, la fatigue et les paramètres physiologiques de patient en rémission d'une hémopathie maligne après une première ligne de chimiothérapie ou après une première rechute.

Cependant, préalablement à cette étude clinique, il est nécessaire de déterminer l'effet de cette molécule antioxydante sur le développement des hémopathies malignes.

L'utilisation d'animaux préalablement greffés en sous cutané avec des cellules tumorales humaines de lymphomes, permettra d'étudier l'impact de cette nouvelle molécule sur le développement et la croissance des tumeurs. La comparaison avec les animaux ne recevant pas cette molécule permettra de mettre en évidence son influence positive, négative ou nulle sur la croissance tumorale.

Afin de réduire le nombre d'animaux, nous avons prévu le nombre nécessaire à l'étude pour être statistiquement significatif et pour pallier les non prises de greffe tout en réduisant au maximum la taille des groupes étudiés.

Le remplacement de ce modèle par des expérimentations in vitro ne permettrait pas d'étudier de façon rationnelle la croissance tumorale avec tous les facteurs mis en jeu in vivo comme la vascularisation et les facteurs environnementaux. Le modèle murin a donc été choisi pour mimer la croissance tumorale humaine dans un organisme complexe.

Afin de raffiner notre méthodologie, les souris feront l'objet d'une surveillance journalière pour éviter tout signe de souffrance et les paramètres comme le poids des souris ainsi que la taille des tumeurs seront suivis tous les deux jours à tous les jours lorsque les tumeurs arriveront à leur taille limite d'exclusion. De plus, le milieu sera enrichi à l'aide de carrés de cellulose à grignoter.

Pour l'ensemble du projet nous avons prévu un nombre de 120 animaux sur une durée de 3 ans.

18353 Le projet, réalisé dans un cadre réglementaire, a comme objectif de permettre l'évaluation du potentiel toxique d'un candidat médicament ou vaccin pendant son développement préclinique. Conformément à la ligne directrice " ICH guideline M3(R2) on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorisation for pharmaceuticals; EMA/CPMP/ICH/286/1995; December 2009", la réalisation de ce projet est indispensable pour chaque nouveau candidat médicament avant de démarrer les essais cliniques chez l'homme, et avant toute autorisation de mise sur le marché. L'évaluation de la toxicité d'un candidat médicament ne peut pas être réalisée in vitro. La réglementation internationale requiert l'utilisation en recherche biomédicale d'une espèce non rongeur. Ce projet concerne une espèce non rongeur, le lapin; on y évalue les effets après 1 jour à plusieurs semaines de traitement en fonction de la durée de traitement souhaitée/possible chez l'Homme. Ce projet consiste en 2 procédures qui englobent toutes les études nécessaires au développement préclinique d'un candidat médicament ou vaccin chez le lapin (études préliminaires, subchroniques et chroniques).

L'objectif étant de déterminer les effets potentiels du candidat médicament/vaccin chez le lapin, ce projet consistera donc en l'administration par la voie prévue chez l'homme, et selon un schéma de traitement similaire.

L'espèce est déterminée en fonction des études réglementaires prévues ou déjà réalisées dans une espèce donnée. Le lapin est l'espèce privilégiée pour les études de vaccins, car dans les études de doses répétées, cette espèce démontre une bonne immunogénicité. Le nombre d'animaux utilisés dans le cadre de ce projet varie selon le protocole expérimental et est déterminé a minima afin d'obtenir des résultats robustes et de respecter les lignes directrices en vigueur. Il est attendu d'utiliser au maximum 1630 lapins sur la durée du projet (5 ans). Si nécessaire, l'administration du composé à tester est réalisée sous anesthésie générale pour permettre une injection en toute sécurité et sans douleur (voie intravitréenne par exemple), et l'on peut recourir à l'usage d'analgésiques pour diminuer la douleur si elle n'a pas pu être évitée. L'état de santé des animaux

est contrôlé tous les jours et évalué par rapport à des points limites définis de façon à éviter un inconfort/souffrance prolongé. Si nécessaire, un vétérinaire peut intervenir, mais si la souffrance d'un animal est jugée trop importante et si aucun soin ne peut lui être apporté, il sera euthanasié selon une procédure éthiquement acceptée. Les animaux sont hébergés par paire pour les femelles et individuellement, avec enrichissement, pour les mâles et les femelles démontrant de l'agressivité en paire, car le lapin âgé de 3-4 mois a déjà un tempérament territorial et combatif avec ses congénères dans les conditions de vie en laboratoire. Les doses de produit sont choisies en vue d'éviter toute toxicité excessive, néanmoins, des soins adéquats seront appliqués pour éviter l'inconfort. Un soin particulier est accordé à l'enrichissement (jouets, musique).

18354 Le diagnostic précoce est un enjeu crucial pour la prise en charge et le traitement des maladies neurodégénératives. En effet, ces maladies se développent très lentement, et lorsque les premiers symptômes apparaissent, il est souvent déjà trop tard pour espérer un traitement permettant une rémission voire une guérison. Aujourd'hui, les rares méthodes de détection précoce restent limitées dans leurs applications et sont très coûteuses. Ces méthodes ne peuvent donc pas être utilisées comme outil de dépistage systématique.

Les progrès récents dans le dépistage précoce du cancer reposent sur l'analyse de l'ADN/ARN tumoral circulant dans les liquides corporels. Dans le cas des maladies neurodégénératives, la mort neuronale devrait de la même manière provoquer une fuite d'ADN/ARN neuronal dans les liquides corporels. Nous proposons d'étudier si l'ADN/ARN échappé des cellules neuronales et circulant dans les liquides corporels peut être détecté, refléter la neurodégénérescence et servir de biomarqueur précoce de maladies neurodégénératives. Si ces résultats sont concluants, ils ouvriront la voie au dépistage fiable, très peu invasif et peu coûteux (donc systématisable), et surtout très précoce des différentes maladies neurodégénératives.

Pour ce faire, nous étudierons l'ADN/ARN circulant dans les liquides corporels de primates non-humains modèles des maladies neurodégénératives, où la progression de la dégénérescence neuronale est bien connue et bien contrôlée (contrairement au cas des études de patients humains). Le modèle primate non-humain se justifie d'une part par la nécessité de détecter de l'ADN/ARN circulant dans les liquides corporels d'un animal qui en dispose en quantité suffisante pour pouvoir utiliser les techniques de détections utilisées chez l'homme – nous nous plaçons en effet dans une démarche strictement translationnelle –, et d'autre part de tester cette détection sur un modèle animal qui reproduit de manière bien contrôlée la progression chez l'humain de la maladie neurodégénérative étudiée.

Les primates non-humains étudiés dans le cadre de ce projet sont nés et élevés en captivité, dans des élevages agréés. Chez un premier animal, nous comparerons la composition et la quantité de fuite d'ADN/ARN neuronal avant, pendant, et après induction d'une forte neurodégénérescence (résultant en une pathologie de type Huntington), puis, si nous détectons avec succès des biomarqueurs de neurodégénérescence dans ce modèle, nous confirmerons ces résultats dans deux animaux supplémentaires, et étudierons la fuite d'ADN/ARN neuronal chez deux animaux modèles additionnels, l'un d'Alzheimer, l'autre de Parkinson. Le nombre de primates utilisés s'élèvera donc à cinq. Les analyses génétiques (par exemple par séquençage à haut débit) qui seront effectuées sur les échantillons de liquides corporels que nous prélèverons régulièrement ($n > 5$ pour chaque animal) avant, pendant, et après induction de la maladie vont générer une grande quantité de données, suffisante pour obtenir des résultats statistiquement concluants.

Chez les patients humains, le degré d'avancement de la pathologie dans les maladies neurodégénératives n'est absolument pas contrôlé, et il est donc impossible d'étudier les biomarqueurs de cet avancement de manière fiable. De ce fait, toutes les études humaines sur ce sujet parviennent à des conclusions non-reproductibles, voire contradictoires.

C'est de l'échec des études humaines récentes sur le sujet qu'est née l'idée de notre étude. En effet, seul le recours à des modèles animaux des maladies neurodégénératives, où la progression de la pathologie est bien contrôlée, permettra de trancher une fois pour toute si l'ADN circulant peut-être utilisé comme biomarqueur de la progression de ces maladies.

1) Remplacer : pour ce projet, il est nécessaire d'étudier des modèles animaux bien connus et bien contrôlés des maladies neurodégénératives. On trouve ces modèles chez le macaque, et chez les rongeurs. Cependant, pour cette étude, les modèles rongeurs ne sont pas exploitables du fait de leur petite taille et donc faible volume de liquides corporels, et c'est pourquoi nous avons fait appel au modèle macaque. En effet, il est indispensable d'obtenir des volumes d'échantillons d'un même individu qui soient suffisants pour pouvoir y appliquer les méthodes de traitement et d'analyse utilisées chez l'humain, chose que ne permettent pas les rongeurs. Sans utiliser les mêmes méthodes que chez l'humain, nous perdrons la totalité du caractère translationnel de notre étude, et ne pourrions donc pas atteindre l'objectif principal de ce projet. De plus, il n'est pas possible de reproduire tous les signes pathologiques des maladies neurodégénératives dans les modèles rongeurs, réduisant ainsi la pertinence pour l'application aux patients humains.

2) Réduire : le nombre d'animaux a été réduit au strict minimum nécessaire à l'obtention de résultats fiables et conclusifs. De plus, grâce au suivi longitudinal et aux comparaisons pré-post qu'il permet, le nombre d'animaux a pu être restreint, et le projet ne nécessite pas de groupe contrôle.

3) Raffiner : les prélèvements de liquides corporels ne nécessiteront que des techniques indolores. Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie des procédures chirurgicales (nécessaires pour établir certains modèles des maladies neurodégénératives par transgénése virale) ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. Les protocoles d'intoxication en vue d'induire une maladie neurodégénérative sont bien caractérisés et ont également été validés par une équipe vétérinaire et par des comités d'éthique. L'observation quotidienne de l'aspect et du comportement de chaque animal, et leur hébergement en groupe social permettront de veiller au bien-être des animaux.

18355 Il est aujourd'hui établi que la structure hippocampique du cerveau des mammifères (y compris l'Homme) produit tout au long de la vie de nouveaux neurones et que ceux-ci sont impliqués dans les processus mnésiques. Les neurones générés à l'âge adulte (néo-neurones) s'intègrent dans le réseau de neurones préexistant et sont notamment impliqués dans l'apprentissage spatial. Le laboratoire a montré que ces neurones générés à l'âge adulte sont spécifiquement impliqués dans les déficits mnésiques observables au vieil âge (à l'inverse des neurones nés lors du développement). En effet ces neurones ont été montrés comme étant moins réactifs au sein d'une population âgée vulnérable (Vul) au déclin de ses capacités mnésiques comparée à une population résiliente (Res) à celui-ci. L'objectif de ce projet est d'étudier et d'enregistrer in vivo l'activité des néo-neurones lors d'un apprentissage au moyen de l'imagerie calcique. Nous proposons de marquer les neurones nés à l'âge adulte tout au long de la vie de l'animal (début :2-3 mois ; milieu : 11-12mois et fin de vie : 17-18mois) par l'utilisation d'un rétrovirus qui permettra de visualiser leur activité à différents temps à l'aide d'un indicateur fluorescent d'activité neuronale exprimé par le rétrovirus injecté (rv-pRubi-GCaMP6s). Pour cela, des rats mâles de la souche Sprague-Dawley (n=180) seront utilisés pour des vieillissements jusqu'à différents stades de développement (jeunes adultes (n=60), en milieu de vie (n=30), et sénescents (n=90)). Ils seront soumis à une première procédure chirurgicale afin d'injecter le rétrovirus puis à une deuxième pour l'implantation d'une lentille nécessaire à la visualisation de l'activité neuronale lors d'une procédure comportementale. Une troisième procédure chirurgicale sera nécessaire deux semaines après la pose de la lentille afin de mettre en place un socle autour de la lentille qui servira de joint entre celle-ci et le miniscope qui permet l'enregistrement de l'image. Tout sera mis en œuvre afin de réaliser ce projet tout en respectant la règle des 3R. En ce qui concerne le remplacement, il est important de noter que cette étude nécessite d'une part la visualisation in vivo de l'activité de neurones et d'autre part qu'elle repose sur une approche intégrée nécessitant de mesurer les capacités cognitives de l'animal au cours du vieillissement, un tel projet ne pourrait donc pas être réalisé in vitro ou in silico. Dans un souci de respect du R de réduire, nous avons calculé au plus juste le nombre d'animaux par groupe sur la base d'études de vieillissement préalablement menées au sein du laboratoire. Ce nombre minimal nécessaire pour faire des analyses statistiques cohérentes tient compte de la nécessité d'avoir une cohorte suffisante d'animaux à des stades de vie avancés (jusqu'à 22 mois). Enfin, pour limiter au maximum l'inconfort des animaux, nous avons développé des procédures de raffinement notamment par l'utilisation d'anesthésies générales et locales et par l'usage d'analgésiques pour

pallier la douleur associée aux opérations chirurgicales ainsi que par la surveillance et l'observation quotidienne des animaux afin de s'assurer de leur bien-être. De plus, les animaux seront hébergés pas 3 en cages collectives enrichies (nids de fibres de peupliers compressées) puis par 2 lors du vieillissement lorsque leur taille et poids deviendront plus importants. De plus, pour identifier les dommages et contraintes subis par l'animal, nous avons défini une grille de score du bien-être basée sur cinq critères. Ces critères sont : la variation du poids de l'animal, son apparence physique, les changements comportementaux non provoqués et la réponse à des stimuli environnementaux, l'état de la plaie et le suivi du vieillissement. En cas de mise en danger du bien être établie à partir de ces critères, des procédures d'intervention ont été mises en place et des points limites ont été définis en accord avec la vétérinaire responsable.

18356 Le traitement ou la prévention des hémorragies chez les patients hémophiles A repose sur l'injection intraveineuse de facteur VIII (FVIII) exogène. La complication majeure de ce traitement est le développement d'une réponse immunitaire anti-FVIII aboutissant à la production d'anticorps anti-FVIII capable de neutraliser l'activité pro-coagulante du FVIII thérapeutique. Cet évènement indésirable survient chez environ 30% des patients et complique considérablement leur prise en charge ainsi que le coût du traitement.

Récemment, un anticorps monoclonal bispécifique nommé Emicizumab ou Hemlibra® a été développé afin de répondre à cette problématique. Emicizumab mime la fonction procoagulante du FVIII dans la coagulation. Cet anticorps est maintenant utilisé avec succès chez les patients avec et sans inhibiteurs. Toutefois, certains patients traités par emicizumab ont développé des saignements et ont dû recevoir d'autres préparations thérapeutiques pro-coagulantes en plus de l'emicizumab. Dans certains cas, ces patients ont eu des accidents thrombotiques gravissimes, provoqués par l'association des traitements. L'emicizumab étant un anticorps, sa demi-vie est longue et il persiste 3 semaines chez les patients. Il n'existe à ce jour pas d'antidote permettant d'inactiver l'emicizumab. De ce fait, les cliniciens sont confrontés au problème de ne pas pouvoir traiter les hémorragies des patients sous emicizumab sans risque de provoquer des thromboses potentiellement mortelles.

L'objectif de ce travail est de tester si l'injection d'enzyme Imlifidase ou IdeS, protéase dérivée de *Streptococcus pyogenes* capable de dégrader spécifiquement les IgG humaines, peut éliminer Emicizumab de la circulation des patients et permettre d'utiliser des traitements procoagulants sans risquer d'induire une thrombose chez les patients. La validation et l'optimisation de cette approche seront obtenues chez la souris déficiente en FVIII, un modèle pré-clinique d'hémophilie A sévère. Le nombre total maximal de souris estimé pour ce projet est de 140 souris.

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

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

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

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

18357 Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) regroupent la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique. Elles se caractérisent par une inflammation du tube digestif et du rectum pour la rectocolite hémorragique alors que la maladie de Crohn peut atteindre la totalité du tube digestif. Il y a environ 250 000 cas en France et 3 000 000 dans le monde. Les MICI sont associées à un risque augmenté d'accidents thromboemboliques veineux et artériels.

Le projet cible le nouveau concept d'immuno-thrombose (IT), initialement défini comme un système de défense contre l'entrée d'agents pathogènes dans la circulation, car lorsqu'il est hyperactivé (IT dérégulée) il pourrait conduire à un état prothrombotique et in fine à une fibrose intestinale et vasculaire; les 2 complications majeures des MICI. Le traitement actuel des MICI par anticorps (anti-intégrine $\alpha 4\beta 7$ ou un anti-TNF- α) agit sur l'immunoinflammation mais pas sur le versant « thrombotique pur » et donc pas sur l'IT. De nouvelles molécules pour normaliser l'IT dérégulée seraient complémentaires (ou alternatives) des traitements anti-inflammatoires. Le facteur von Willebrand (VWF) est très grosse protéine qui a pour rôle d'initier le processus de coagulation sanguine en cas de blessure au niveau d'un vaisseau sanguin. Nos résultats préliminaires indiquent que le VWF pourrait intervenir à la fois dans la régulation de l'IT et des fibroses vasculaires.

Ce projet a donc pour objectif de tester le rôle du VWF dans un modèle murin de MICI. Ce projet sera réalisé dans le cadre du respect de la règle des 3R :

Remplacement : Il n'existe pas d'alternative in vitro pour étudier les mécanismes des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et induire des colites.

Réduction : Afin de limiter le nombre d'animaux, plusieurs types de mesures seront effectuées sur un même animal. Les expériences invasives se feront sous anesthésie gazeuse (isoflurane en traitant la douleur si nécessaire par injection sous-cutané de buprénorphine). Il y aura deux groupes avec une colite aigue afin d'induire l'inflammation du colon. Ainsi 40 souris seront nécessaires pour cette étude afin d'obtenir une puissance statistique suffisante tout en réduisant au maximum le nombre d'animaux.

Raffinement : toutes les procédures expérimentales auront lieu dans une pièce où les souris ne sont pas hébergées. Une procédure d'estimation et suppression de la douleur est mise en place. Le point limite est fixé selon un score défini au préalable et qui tient compte des signes éventuels de mal-être (isolement, yeux fermés, dos voûté, poils hérissés, immobilité, perte de poids, déshydratation). En fin de protocole, les animaux seront mis à mort et des organes prélevés pour permettre des analyses histologiques et biochimiques.

18358 Dans le cadre de la réalisation de prestations de techniques de cryoconservation et de reproduction assistée sur rongeurs de laboratoire au sein de notre laboratoire des Sciences de la Reproduction et pour les besoins de la communauté scientifique, nous avons recours dès que possible à un traitement de superovulation des femelles à collecter afin d'accroître leur rendement ovulaire.

Ainsi et conformément à la règle des 3R, un traitement de superovulation permet d'obtenir un nombre accru d'ovocytes ou d'embryons par femelle et donc de réduire le nombre d'individus à utiliser.

Deux hormones sont utilisées pour l'établissement de cette superovulation :

- la PMSG est utilisée pour mimer l'effet de maturation des ovocytes des follicules endogènes (FSH)
- et la hCG qui est utilisée pour mimer l'ovulation induite par la LH.

Depuis les dernières décennies, la superovulation est utilisée avec succès pour la génération de modèles génétiquement modifiées comme pour la réalisation de techniques de Sciences de la reproduction pour la communauté scientifique.

Au sein de notre structure nous privilégions ce traitement afin de réduire le nombre d'animaux à collecter.

Grâce à l'administration de gonadotrophines, il est possible d'induire chez les femelles traitées, une ovulation avec un nombre d'ovocytes supérieur à la normale et à un moment prévisible. Ceci entraîne donc une diminution du nombre de femelles nécessaires pour la collecte d'une quantité définie d'embryons pour laquelle nous n'aurions pas eu recours à ce type de traitement.

La technique de superovulation décrite ci-dessous est celle couramment utilisée pour assurer les prestations de cryoconservation de modèles ou dans l'application de techniques de raffinement d'élevage intégrant des transferts d'embryons visant à assainir une colonie respirante ou l'accroître plus rapidement.

La réponse à l'injection de gonadotrophine varie d'une souche à l'autre au sien même d'une même espèce de rongeurs. La dose optimale et l'âge des femelles sont préalablement définis pour chaque souche en effectuant des injections préliminaires dose-réponse et par expérience. En règle générale, des doses de 5 à 10 unités internationales (UI) par souris de chaque gonadotrophine et âgées de 21 à 35 jours (poids corporel de 12 à 14 grammes) donneront le meilleur rendement en œufs fécondés. Chez le rat, les doses varient entre 20 et 30 UI par individu femelle et de préférence prépubère.

Les femelles reçoivent une injection intra-péritonéale (IP) de sérum de jument gestante (PMSG) le jour 1.

Le 3ème jour (48 à 52 Heures après l'injection de PMSG), elles reçoivent une injection IP de gonadotrophine chorionique humaine (HCG).

Si la fertilisation à lieu IN VIVO, immédiatement après l'injection de hCG, la femelle est accouplée avec un mâle fertile pour une nuit. Le lendemain un contrôle de la présence ou de l'absence de bouchon vaginal, témoignant d'un coït est réalisé.

Si la fertilisation à lieu IN VITRO, les femelles sont prélevées après avoir été mise à mort au CO2 ou par dislocation cervicale selon les protocoles autorisés par la directive 2010/63/UE et les ovocytes mis en contact de sperme fécondant dans un milieu et des conditions atmosphérique optimales pour la fécondation.

Nous réalisons ce traitement sur un nombre annuel maximum de 15 200 rongeurs soit 76 000 rongeurs sur 5 ans

La règle des 3R est appliquée pour le principe de réduction et de raffinement.

1) Réduction du nombre d'animaux : nous réalisons la prestation à la demande de nos clients. Le nombre d'animaux dépend du besoin de ces derniers.

2) Limitation de la douleur/souffrance/angoisse : Les animaux seront maintenus dans des cages contenant de l'enrichissement, dans des conditions optimales de température avec cycle jour/nuit de 12h/12h et avec accès à volonté à l'eau et à la nourriture. Ils seront surveillés quotidiennement par du personnel qualifié afin de s'assurer de leur bon état général : comportement, aspect du pelage, perte de poids, mobilité ou tous autres troubles seront vérifiés afin de s'assurer du bien-être des animaux. En cas de changement de comportement ou d'aspect, une surveillance augmentée sera mise en place.

3) Impact environnemental : aucun.

Pour le Remplacement, sachant que la nature même du projet vise à obtenir un meilleur rendement ovulaire de l'espèce choisie pour réduire et raffiner, le remplacement d'individu de cette dernière n'est pas envisageable.

18359 Le syndrome de Rett est une pathologie rare et sévère qui affecte essentiellement les filles. Dans 95% des cas, cette maladie est la conséquence d'une mutation du gène MECP2, qui code pour un modulateur épigénétique majeur. Sur le plan clinique, le syndrome de Rett est caractérisé par des déficits moteurs sévères, notamment au niveau respiratoire, par des troubles cognitifs et par un syndrome autistique, souvent associé à de l'épilepsie. Il n'existe à ce jour aucun traitement médicamenteux capable de soulager les troubles moteurs et les symptômes autistiques chez les patientes atteintes du syndrome de Rett.

Notre projet de recherche a pour objectif de mieux comprendre les mécanismes neurobiologiques du syndrome de Rett en étudiant par imagerie le rôle des deux principales populations de neurones du striatum. Cette compréhension permettra de proposer de nouvelles stratégies pharmacologiques pour soulager ce syndrome.

Nous travaillons chez la souris, qui est un animal social : nous utilisons notamment des souris qui présentent des mutations génétiques ressemblant à celles des patients autistes. Nous testons chez ces animaux différents traitements afin de vérifier s'ils pourraient être proposés comme nouveaux médicaments pour soigner l'autisme.

Le projet de recherche que nous développons tient compte du bien-être animal en respectant le principe des 3R à savoir raffiner, réduire et remplacer.

Nous raffinons nos expériences en prenant un soin particulier à limiter les situations de souffrance ou d'inconfort des animaux tout au long du protocole expérimental. Nous hébergeons notamment nos animaux dans un environnement enrichi (maisonnette en carton, matériel de nidification) afin d'assurer leur bien-être. Nous avons défini des points limites pour l'ensemble de nos expériences pour limiter au maximum les situations de souffrance ou d'inconfort des animaux.

Le nombre d'animaux pour les expériences d'imagerie est dicté par les différentes conditions à tester afin de répondre à la question scientifique posée. L'utilisation d'outils statistiques puissants nous permettra de réduire le nombre d'animaux nécessaire à la réalisation des expériences.

Toutefois, nous ne pouvons pas nous passer du modèle animal car l'autisme est une pathologie complexe qui ne peut être modélisée qu'au niveau de l'animal entier, exprimant toute la variété de son répertoire comportemental.

La mise en œuvre du projet de recherche nécessitera l'utilisation de 32 souris sur 12 mois.

18360 Le but de cette procédure est de permettre de définir la dose maximale tolérée (MTD) in vivo dans des souris saines (C57bl/6) pour des composés dérivés de la sertraline (antidépresseur non-toxique) que nous souhaitons tester ultérieurement dans un modèle murin de tumorigénèse (dans une autre demande d'autorisation). Ces composés dérivés de la sertraline ont tous une activité anti-tumorale in vitro que nous avons démontré par le passé. En effet, la sertraline cible TCTP qui est un gène clé de la réversion/reprogrammation tumorale. A ce stade il n'est pas possible de remplacer l'animal du fait de la complexité des mécanismes en jeu.

Ces produits seront injectés par voie intrapéritonéale (IP) pour l'évaluation de la toxicité afin de pouvoir tester plus tard, dans une étude à plus grande échelle, leur efficacité sur un grand nombre de souris limitant ainsi les risques pour les animaux de cette grande série à venir. Une étude de pharmacocinétique (chez un prestataire de service) nous a montré que la voie IP était la seule qui était efficace.

Nous envisageons de tester maximum 7 composés. Nous utiliserons 20 animaux maximum par composé soit 140 animaux maximum + 4 pour tester le Tamoxifène.

Les animaux seront suivis tous les jours et une grille de scoring sera mise en place prégnant en compte la mesure des tumeurs mais également l'état général des animaux. Des points limites sont définis et tout animal atteignant un de ces points sera mis à mort. (raffinement). A ce stade il n'est pas possible de remplacer l'animal du fait de la complexité des mécanismes en jeu dans la réversion tumorale et le test de molécules. Nous utiliserons pour cela 40 souris p53ko (dont la production fait partie d'une autre demande d'autorisation) et nous testerons maximum 2 composés (soit 40 animaux maximum) (remplacement). Nous utiliserons un minimum de souris, mais suffisamment représentatif (réduction).

Nous commenceront par injecter 4 souris avec 25mg/kg. Le choix de cette dose est basé sur l'expérience que nous avons avec la sertraline. Les composés à tester sont dérivés de la sertraline et c'est pour cette raison que nous commencerons par administrer 25mg/kg. Ces injections auront lieu 7j/7 pendant maximum 15 jours. Chaque souris recevra une dose précise à tester. Chaque souris recevra maximum 15 injections.

Les animaux seront hébergés à 4 par cage afin d'éviter le stress causé par l'isolement (sauf s'il y a des signes d'agressivité chez un animal qui nécessiterait alors de le séparer de ses congénères).

On observera les souris pendant 7 jours.

Si elles tolèrent bien le produit on augmentera la dose (dans un nouveau groupe de 4 souris par palier de 10mg/kg, jusqu'on atteindra points limites:

18361 Chaque évènement vécu, expérience personnelle, ou stress peuvent avoir un impact sur notre cerveau en modifiant son activité et ses circuits de manière à conduire à la formation de souvenirs (= trace mnésique).

Le processus de mémorisation pourrait être lié à la synthèse protéique. Afin de mieux le mettre en évidence, il va être utilisé ici un inhibiteur de la synthèse protéique, l'anisomycine. Un acide aminé facilement détectable sera injecté pour suivre la synthèse protéique en fonction de l'injection d'anisomycine (durée, quantité, etc). L'objectif du projet est de déterminer les conditions d'une synthèse protéique réduite au maximum.

Nous allons donc caractériser chez la souris les effets de l'anisomycine à différentes doses et suivant différents modes d'injection en se focalisant sur ses effets d'inhibition de la synthèse des protéines et sur ses effets comportementaux locomoteurs et exploratoires.

C'est un travail de caractérisation primordiale pour le laboratoire. En effet, plusieurs projets majeurs du laboratoire cherchent à comprendre le rôle de la synthèse protéique dans l'association de deux traces mnésiques dans des conditions normales et dans des conditions pathologiques (trouble de stress post-traumatique, anxiété et dépression).

Dans ce but, différentes concentrations d'anisomycine, différentes routes d'administration (sous-cutanée, intracérébroventriculaire et intrahippocampique) et différents temps d'action seront testées chez la souris pour ses effets sur la synthèse protéique et pour ses effets comportementaux sur la locomotion et l'exploration. Le nombre total de souris nécessaire pour ce projet est de 295 souris.

Le principe des 3Rs sera appliqué:

Remplacement : aucune méthode alternative in vitro n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée (effets de l'inhibition de la synthèse protéine durant une tâche comportementale et d'apprentissage).

Réduction : Les expérimentateurs suivront un protocole rigoureux permettant de limiter les variabilités individuelles et expérimentales. Les effectifs sont calculés de manière à permettre une réduction des effectifs optimisée permettant de suivre les recommandations éthiques d'obtenir une puissance statistique suffisante avec un minimum d'animaux.

Raffinement: Les conditions d'élevage des animaux seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu (cabanes plexiglass et cartons, tubes). Les injections/implantations intracérébrales se feront sous anesthésie générale par des chercheurs formés et expérimentés. Les animaux recevront un traitement analgésique avant l'intervention, un traitement anti-inflammatoire après l'intervention et 24 heures après. Si nécessaire un traitement antibiotique sera administré. Chaque animal est placé sur une couverture thermorégulée pour éviter toute hypothermie. Les cornées sont protégées de la déshydratation. L'anesthésie gazeuse est ici privilégiée pour mieux contrôler la profondeur d'anesthésie et pour une meilleure récupération post-opératoire. Une surveillance post-opératoire d'une semaine est réalisée pour suivre chaque souris et intervenir si nécessaire.

18362 Les troubles du mouvement sont des maladies neuromusculaires, souvent chroniques, qui handicapent durablement les patients et ont donc un impact sociétal important. La dystonie, par exemple, est un trouble qui se caractérise par des contractions musculaires involontaires, pouvant notamment entraîner des mouvements répétitifs ou des postures figées. La spasticité musculaire, quant à elle, est considérée comme une sur-contraction inhabituelle et involontaire du ou des muscles. Ce trouble du système nerveux central résulte en une crispation et une rigidité accrue du muscle touché. Le traitement de ces maladies neuromusculaires implique généralement la prescription de traitements administrés oralement : le baclofène, les benzodiazépines, le dantrolène... Ces traitements systémiques comportent cependant tous des effets secondaires conséquents (sommolence, nausée, fatigue). Une solution pour diminuer ces effets secondaires consiste à administrer le baclofène via une pompe intrathécale ; cette approche est toutefois invasive. Alternativement, l'injection intramusculaire de certains produits directement dans le muscle affecté peut soulager ces maladies : le phénol ou la toxine botulique. Cette approche présente de clairs avantages devant celles présentées précédemment, notamment concernant les

effets secondaires. Toutefois, cette approche doit encore être optimisée : les patients et soignants attendent des myorelaxants offrant encore moins d'effets secondaires, capables d'être efficaces rapidement après l'injection, et dont les effets seraient durables. L'objectif de notre projet global est de mettre en évidence les effets bénéfiques de l'utilisation locale de différents produits myorelaxants novateurs à effet rapide et durable, sur la contraction musculaire pour les patients souffrant de troubles du mouvement comme la dystonie et la spasticité. Au cours d'une étude princeps, nos travaux préliminaires nous ont permis d'identifier au moins 5 produits présentant une activité myorelaxante d'intérêt. Chacun des produits semble avoir des caractéristiques pharmacologiques différentes : certains induisent une myorelaxation très rapide, et d'autres offrent un effet durable par exemple. Or, selon la maladie neuromusculaire, le besoin clinique est différent, et donc chaque caractéristique est plus ou moins critique. Nous visons ainsi le développement de plusieurs produits, car nous envisageons la possibilité de positionner chacun des produits finaux pour le traitement de différentes maladies neuromusculaires.

A terme, nous démontrerons les bénéfices de nos produits face aux produits de référence utilisés en clinique. Ce projet expérimental d'optimisation concerne une troisième génération de produits d'intérêt, identifiés suite à nos travaux exploratoires.

Il n'existe à ce jour pas de test *in vitro* qui permette de tester la pharmacodynamique locale de ces molécules (cinétique de l'effet myorelaxant) qui est l'élément clé de leur valeur clinique, ce qui justifie donc notre étude sur le rongeur. Nous avons, au cours d'une étude précédente, obtenu des résultats prometteurs, et identifié un produit candidat avec une activité myorelaxante rapide et durable. Nous avons utilisé durant ce pilote le test du « Digit Abduction Score » (DAS), un test reconnu comme pertinent pour mesurer l'activité myorelaxante d'un produit.

Cette étude a pour objectif de caractériser le pouvoir myorelaxant de nouvelles molécules (troisième génération de composés) ; ces molécules ont été peu décrites dans la littérature scientifique, mais nos résultats leur prêtent une activité myorelaxante d'intérêt. Dans cette étude, le produit sera injecté localement aux rats, dans les membres postérieurs pour un suivi du « digit abduction score » (DAS). Cette procédure (injection et test DAS) est brève, indolore, et peu stressante pour les animaux. Notre produit sera comparé au traitement actuel de référence.

Concernant l'application des 3R, le remplacement ne peut pas être assuré dans cette étape du programme de travail, car la pertinence des modèles cellulaires de coculture est aujourd'hui encore débattue, et de tels modèles ne prennent de toute façon pas en compte le paramètre de diffusion (qui est essentiel lorsqu'on s'intéresse au profil pharmacodynamique des composés). Le test DAS nous permet au contraire de mesurer l'activité myorelaxante tout en prenant en compte ce paramètre.

Pour la réduction, les études précédemment réalisées nous ont donné un certain recul sur la taille des groupes nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement significatifs ; nous nous tiendrons donc au minimum d'animaux nous permettant d'arriver à une conclusion.

Concernant le raffinement, les animaux seront hébergés en groupe de 2 avec enrichissement du milieu, et surveillés quotidiennement. Notre étude précédente nous a permis un raffinement du modèle DAS chez le rat : l'injection intramusculaire dans le membre inférieur est réalisée sous contention par un expérimentateur entraîné, et les mesures de DAS sont brèves, indolores et peu stressantes pour les animaux. Au cours de cette étude, nous souhaitons continuer à limiter au maximum le stress des animaux.

En conclusion, cette étude nous permettra donc d'identifier les 3 meilleurs produits au sein de notre nouvelle génération de candidats, en utilisant au maximum 636 rats (souche : Sprague-Dawley femelles). Ces données serviront de base à la conception d'essai clinique chez l'homme.

18363 La mémoire épisodique est un type de mémoire qui permet de former des souvenirs de nos expériences personnelles associées à un ou des événements spécifiques. Elle fournit la capacité de se remémorer cette expérience mais aussi les émotions et le contexte spatial et temporel associés à cette expérience.

Il est important de caractériser les mécanismes neurobiologiques de la mémoire à la fois pour le bénéfice de nos connaissances (comment des capacités cognitives et mentales peuvent-elles émerger d'un organisme biologique) mais aussi pour comprendre par quels processus ces systèmes de mémoire peuvent être dévoyés dans certaines conditions pathologiques et traumatiques (telles que le trouble de stress post-traumatique (PTSD), dans lequel les patients sont confrontés aux rappels involontaires et intrusives d'évènements aversifs et traumatiques) et ouvrir éventuellement de nouvelles voies de traitement.

Une des caractéristiques les plus frappantes de la mémoire épisodique est sa capacité à associer différentes traces mnésiques dans un seul et même épisode (association temporelle). Dans le cerveau, une région, l'hippocampe, a été identifiée comme une structure cérébrale cruciale pour cette association temporelle : les évènements partageant une certaine proximité temporelle induisent une activité des neurones de l'hippocampe plus similaire que des évènements plus éloignés dans le temps, et cela même si ces derniers partagent des similitudes contextuelles ou sensorielles.

Ainsi, dans ce projet, nous posons l'hypothèse qu'un phénomène associé à la plasticité cérébrale (le tagging et la capture synaptique STC) est impliqué dans l'association temporelle de mémoires épisodiques.

Pour cela, nous utiliserons une nouvelle technologie de pointe, un système implantable intégrant un miniscope à fluorescence ultraminiaturisé permettant de visualiser simultanément l'activité de plusieurs centaines de neurones chez la souris lors de tâches d'apprentissage.

Cette technologie nous permettra de tester l'existence de ce phénomène lors d'un apprentissage ainsi que son implication dans l'association temporelle de souvenirs. Pour cela, nous étudierons alors l'activité de neurones de l'hippocampe afin de voir comment ils sont engagés dans 2 expériences différentes (environnements A et B) proches dans le temps. Pour tester l'existence et l'implication de la STC, nous nous appuyerons sur l'enregistrement de ces neurones avec et sans inhibition de la STC (induite par inhibition de la synthèse protéique, grâce à l'administration préalable d'anisomycine, un antibiotique).

Pour cette expérimentation 96 souris (mâles et femelles) maximum seront utilisées.

Raffinement : les populations neuronales enregistrées par cette méthode sont ciblées à l'aide de promoteur génétique permettant d'enregistrer spécifiquement ces types de neurones (réduisant toutes possibilités d'erreur d'identification). Les conditions d'élevage des animaux seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu (cabanons plexiglass et cartons, tubes).

Les injections/implantations intracérébrales se feront sous anesthésie générale par des chercheurs formés et expérimentés. Les animaux recevront un traitement analgésique avant l'intervention, un traitement anti-inflammatoire après l'intervention et 24 heures après. Si nécessaire un traitement antibiotique sera administré. Chaque animal est placé sur une couverture thermorégulée pour éviter toute hypothermie. Les cornées sont protégées de la déshydratation. L'anesthésie gazeuse est ici privilégiée pour mieux contrôler la profondeur d'anesthésie et pour une meilleure récupération post-opératoire. Une surveillance post-opératoire d'une semaine est réalisée pour suivre chaque souris et intervenir si nécessaire.

Remplacement : aucune méthode alternative in vitro n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée.

Réduction : Le protocole permet d'utiliser chaque animal comme son propre contrôle permettant de réduire les effectifs. Ceux-ci sont calculés de manière à permettre une réduction des effectifs optimisée permettant de suivre les recommandations éthiques d'obtenir une puissance statistique de 0.8 avec un minimum d'animaux.

18364 Notre capacité à mesurer l'activité neuronale in vivo permet d'améliorer considérablement notre compréhension du cerveau.

Un nouveau système d'imagerie ultra miniaturisé et portable nous permet aujourd'hui de visualiser l'activité de centaines de neurones individuellement pendant la réalisation d'une tâche comportementale chez la souris.

L'objectif de cette étude est la mise en place et la validation d'un protocole avec ce système pour l'observation de l'activité neuronale la souris en utilisant 2 stratégies différentes : (1) indicateur calcique chez des souris transgéniques et (2) indicateur calcique apporté par injection d'un vecteur viral.

Ces protocoles, une fois validé par ce premier projet, serviront de base à nos futurs projets utilisant ce système d'imagerie, notamment dans l'étude des troubles des comportements motivationnels, d'addiction et d'interactions sociales.

Pour cette expérimentation 40 souris (mâles et femelles) maximum seront utilisées. En effet dès que le procédé (expression du l'indicateur calcique, implantation et enregistrement de l'activité neuronal) sera réalisé avec réussite de manière répétée (4 enregistrements successifs réussis dans chacune des stratégies), le procédé et la technique seront considérés comme acquis et validés et les expériences pourront s'arrêter.

Raffinement : les populations neuronales ciblées par cette méthode sont très spécifiques. Les conditions d'élevage des animaux seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu (cabanes plexiglass et cartons, tubes). Les injections/implantations intracérébrales se feront sous anesthésie générale par des chercheurs formés et expérimentés. Les animaux recevront un traitement analgésique avant l'intervention, un traitement anti-inflammatoire après l'intervention et 24 heures après. Si nécessaire un traitement antibiotique sera administré. Chaque animal est placé sur une couverture thermorégulée pour éviter toute hypothermie. Les cornées sont protégées de la déshydratation. L'anesthésie gazeuse est ici privilégiée pour mieux contrôler la profondeur d'anesthésie et pour une meilleure récupération post-opératoire. Une surveillance post-opératoire d'une semaine est réalisée pour suivre chaque souris et intervenir si nécessaire.

Remplacement : aucune méthode alternative in vitro n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée.

Réduction : 40 souris (mâles et femelles) maximum seront utilisées. Les effectifs sont optimisés pour la mise en place d'un nouveau protocole (pas de test statistique). En effet dès que le procédé (expression du l'indicateur calcique, implantation et enregistrement de l'activité neuronal) sera réalisé avec réussite de manière répétée (critère: 4 enregistrements successifs réussis dans chacune des stratégies et au moins 6 souris enregistrées par stratégie), le procédé et la techniques seront considérés comme acquis et validés et les expériences pourront s'arrêter sans utiliser la totalité de 40 souris.

18365 Les infections au SARS-CoV-2, en particulier les plus sévères, sont associées à un risque thrombotique très élevé. Ce risque semble particulièrement élevé dans les jours suivant l'hospitalisation pour une pneumopathie à SARS-CoV-2. Plusieurs études ont récemment mis en évidence des anomalies de la fonction plaquettaire et endothéliale dans la phase précoce de la maladie. Ces anomalies pourraient contribuer au risque thrombotique et, in fine, à la mortalité liée à la maladie.

Le SARS-CoV-2 est formé d'une capsule sur laquelle est insérée une protéine, la protéine spike (S). C'est cette protéine qui détient la clé pour pénétrer dans les cellules humaines. Comme tous les virus, ce virus se réplique beaucoup mais des erreurs lors de la transcription des protéines peuvent se produire. C'est particulièrement le cas pour la protéine S du SARS-CoV-2. Ces erreurs de transcription sont à l'origine d'un déséquilibre des charges électriques pouvant favoriser l'interaction du virus avec les plaquettes et l'endothélium.

L'objectif de notre étude porte sur l'évaluation de l'interaction entre la protéine S ou ses variants, les plaquettes et/ou l'endothélium et leur rôle dans le risque thrombotique lié au SARS-CoV-2. La découverte des variants de transcription étant récente, il s'agit de la première étude sur le sujet.

En bref, les souris seront anesthésiées et placées sous un microscope. Les cellules sanguines (leucocytes et plaquettes) seront marquées à l'aide d'un anticorps fluorescent. La protéine S ou ses variants seront ensuite injectés en intraveineux pour voir si cela engendre la formation d'un thrombus, comme cela est observé au cours de la COVID-19 chez l'humain. En cas de thrombus, plusieurs traitements disponibles chez l'Homme seront testés, afin de voir lequel ou lesquels sont les plus efficaces pour empêcher la formation du thrombus ou favoriser sa dissolution lorsque celui-ci est déjà formé.

Remplacement : l'objectif de cette étude est d'analyser l'interaction entre la protéine S virale, les plaquettes et l'endothélium (via le glycocalyx). Il s'agit d'un modèle intégré impossible à reproduire in vitro, nécessitant l'action de ses acteurs au sein d'un organisme pour en évaluer l'effet. L'utilisation d'un modèle animal est donc absolument nécessaire.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisés lors de cette étude est réduit au minimum, ce nombre étant fixé à 16 souris/groupe au maximum pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs. La souris est un modèle valide pour étudier l'interaction entre la protéine S, les plaquettes et l'endothélium car il ne s'agit pas d'étudier l'ensemble de la maladie mais un processus pathologique spécifique. Ce modèle a déjà été utilisé pour étudier l'influence de certaines protéines virales sur les plaquettes. L'étude se déroulera en 2 phases distinctes : la première d'exploration de l'effet de la protéine S ou de ses variants sur les plaquettes et l'endothélium (n=512 au maximum) et la deuxième qui vise à étudier l'effet de certains traitements antithrombotiques (n=384 au maximum). Pour cette deuxième phase, seul le variant de la protéine S le plus thrombogène sera gardé, afin de limiter au maximum le nombre de souris nécessaires. En l'absence de thrombose observée lors de la première phase, il n'y aura pas de deuxième phase. Vingt souris seront nécessaires à la prise en main des procédures.

Raffinement : L'utilisation de modèles d'animaux a été établi en raffinant au maximum les conditions de travail, afin de limiter leur angoisse, stress et douleur lors des manipulations. Pour ce faire, des points limites ont été établis pour les procédures décrites. Ces points limites permettront de soustraire l'animal aux procédures expérimentales permettant de limiter la souffrance et l'inconfort de l'animal.

Cette étude nécessite l'utilisation de 916 souris.

18366 La mise en œuvre des réglementations portant sur l'expérimentation animale inscrite dans le droit français depuis février 2013 précise les obligations réglementaires de formations pour les personnes qui souhaitent concevoir ou mettre en application des procédures expérimentales sur les rongeurs.

Ce projet a pour objectif de former des étudiants et des professionnels se destinant manipuler des rats dans leur domaines de Recherche en Sciences du Vivant. Cet enseignement pratique sera intégré dans des formations réglementaires de niveau Concepteur et Applicateur. La période de 5 ans pour laquelle est demandé ce projet correspond à celle de l'agrément de ces formations.

Règle des 3R. Dans la mesure où ce projet a pour objectif de former de personnes qui seront amenées à travailler avec des animaux vigiles,

la première règle, soit celle de Remplacer, ne pourra être appliquée ; les deux autres le seront de manière à réduire au maximum le stress ou l'angoisse des animaux, ainsi que le nombre d'animaux nécessaires au projet.

En ce qui concerne la règle de Raffiner, les animaux auront accès ad libitum à l'eau et à la nourriture, bénéficieront de conditions de température et d'hygrométrie régulées et conformes à la réglementation en vigueur. L'enrichissement de l'environnement des animaux (bâtonnets à ronger, matériel de nidification), le maintien des interactions sociales (hébergement de plusieurs individus dans une même cage) et la surveillance quotidienne des animaux permettront de s'assurer de leurs bien-être et de détecter rapidement tout changement de comportement. Les animaux seront manipulés régulièrement par des personnes compétentes avant le début du projet afin qu'ils soient suffisamment habitués avant leur premier contact avec les apprenants. Une attention toute particulière sera portée à l'apprentissage initial de la capture et de la préhension de l'animal, et la

présence continue d'un encadrant garantira la qualité de l'apprentissage du savoir-faire nécessaire à la réalisation de tous les gestes enseignés.

En ce qui concerne la règle de Réduire, un nombre minimal de rats est prévu pour assurer un bon enseignement à chacun des participants aux formations. L'objectif est de permettre aux participants d'acquérir les compétences afin de leur permettre de réaliser ensuite leur travail de recherche selon les bonnes pratiques en expérimentation animale et en accord avec la réglementation européenne. De plus, il est important de préciser que la totalité des animaux utilisés lors de ces formations sont des animaux de réforme destinés à être mis à mort. Ce nombre annuel a été calculé au plus juste des besoins compte-tenu des objectifs de chacune des formations et du nombre de participants anticipés.

Le projet nécessitera un total de 360 rats sur 5 ans.

18367 La variété de profils cliniques observés dans la maladie d'Alzheimer plaide en faveur d'une prise en charge personnalisée de la prévention, du diagnostic et du traitement de cette affection. Le sexe est un facteur critique à prendre en compte car les femmes ont un déclin cognitif plus marqué que les hommes à un stade précoce de la maladie d'Alzheimer. Des travaux suggèrent que les interactions entre certaines régions cérébrales sont plus affectées chez les femmes que chez les hommes lors de l'émergence d'une maladie d'Alzheimer.

Dans un nouveau modèle de souris de la maladie d'Alzheimer, les femelles peinent à reconnaître un objet au bout de 24h à un âge où les mâles n'ont pas ce problème. Or cette forme de mémoire s'instaure pendant les phases de sommeil.

Ainsi, une perturbation des cycles veille sommeil, comme celle observée chez le patient Alzheimer, pourrait contribuer aux déficits observés des femelles.

Quelques mois plus tard, les deux sexes ont des difficultés à reconnaître une association objet-place.

Notre but dans cette étude, est donc de vérifier que dans un premier temps, la connexion impliquée dans la reconnaissance d'objet à 24h est effectivement perturbée chez les femelles mais pas chez les mâles. Par la suite, la communication sous-tendant la mémoire d'association objet-place serait à son tour altérée, cette fois chez les deux sexes. Pour mettre en évidence ces altérations différentielles de la connectivité en fonction du sexe et du développement de la maladie dès les stades les plus précoces, nous étudierons l'évolution au cours du temps de la connectivité entre différentes régions cérébrale à la fois fonctionnelle et structurelle, des souris modèle de la maladie d'Alzheimer via une approche comportementale visant à étudier l'efficacité de différentes connexions dans des tâches de mémoire. Les données mnésiques seront corrélées à des approches en Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) et à des investigations histopathologiques. Nos travaux devraient donc contribuer à mieux comprendre l'origine des différences liées au sexe au début d'une pathologie Alzheimer et plaideront en faveur de la mise en place de diagnostic et/ou de traitement personnalisés en fonction du sexe.

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

Remplacer : L'étude des relations entre les troubles de la mémoire et les anomalies du fonctionnement neuronal induits par une pathologie Alzheimer nécessite l'utilisation de l'animal vivant. Les modèles in vitro ou computationnels ne permettent pas à ce jour de rendre compte de la complexité des fonctions de la mémoire : ils ne reproduisent pas les changements d'activité des neurones dans chaque région du cerveau impliquée dans la mémorisation d'un événement et ils ne peuvent pas reproduire la réponse comportementale permettant d'évaluer la performance dans un test.

Réduire : Le projet étant une étude longitudinale impliquant des procédures non-invasives, il permet donc le suivi d'un même animal plusieurs fois et par conséquent une réduction du nombre d'animaux à inclure. Le nombre de souris est donc réduit au minimum d'animaux nécessaire afin d'assurer l'efficacité des tests statistiques et donner des résultats statistiquement fiables en fonction des

expériences réalisées : évaluation comportementale, suivi IRM, et analyse histopathologique. Ainsi pour l'ensemble des analyses, seulement 120 souris seront requises.

Raffiner. Les souris bénéficieront d'éléments d'enrichissement dans leur cage (matériel de construction du nid, un tube refuge et des boulettes de nourriture à manipuler dans la cage), ainsi qu'un suivi quotidien de leur état général. Elles seront maintenues en groupe social sauf pour la durée des tests de comportement. Tous les tests comportementaux sont basés sur le comportement d'exploration spontanée de la souris. Un suivi spécifique sera réalisé pour chaque procédure avec des points limites adaptés pour éviter toute souffrance.

18368 Un des défis majeurs sur la recherche de la maladie de Parkinson (MP) aujourd'hui est de déceler et traiter la maladie le plus tôt possible. Or, l'étude des gènes délétères identifiés chez des parkinsoniens permet de mieux comprendre la MP dès ses stades précoces. Parmi les gènes contribuant fréquemment au risque de développer la maladie figurent LRRK2, l'alpha-synucléine ou encore GBA1. Mieux comprendre leur fonction, permettra de mieux comprendre les mécanismes menant à la mort des neurones pour une majorité de patients. Dans cette étude, nous combinerons des techniques de traitements pharmacologiques et de transgénèse afin de comprendre leurs fonctions et voies de signalisation cellulaire dans lesquelles ils interviennent comme la synthèse des protéines, le trafic vésiculaire etc. Pour cela, plusieurs souches transgéniques de souris et de rats seront utilisées, impliquant les gènes cités plus hauts et d'autres intervenant dans le trafic cellulaire (VAMP7) et la traduction (MetRS). Ces animaux nous permettront d'étudier les modifications moléculaires, cellulaires et le comportement lié à la dérégulation de voies de signalisation dans la MP.

Un total de 5000 souris et 2500 rats seront inclus dans cette étude. Le respect du principe des 3R est garanti (explicité ci-dessous). D'une part, aucun test ne sera effectué pour lequel la réponse pourra être obtenue dans un système cellulaire (remplacement). L'étude portant sur l'analyse de régions du cerveau impliquées dans la MP et le comportement, les modèles chez l'animal sont les systèmes les plus adéquats pour ces études. D'autre part, les expérimentations seront sélectionnées principalement pour l'étude des phénomènes pour lesquels il existe une hypothèse claire provenant de données cellulaires et d'autres études chez l'animal (réduction). Finalement, un soin particulier sera pris à l'application des procédures afin d'obtenir les mesures les plus fiables possibles (raffinement).

Notre étude mènera à une meilleure compréhension des stades précoces de la MP, ainsi qu'au développement de nouveaux tests diagnostiques et de nouvelles stratégies thérapeutiques permettant de ralentir la progression de la maladie dès les premiers stades de la maladie.

18369 La nicotine est considérée comme l'un des principaux produits chimiques du tabac responsable de ses propriétés addictives. De plus, la nicotine améliore les capacités attentionnelles aussi bien chez l'homme que chez l'animal, une action psychoactive qui pourrait contribuer à l'initiation et au maintien de l'envie de fumer. En effet, les fumeurs deviendraient ultra sensibles aux stimuli associés à l'action de fumer (environnements, moments de la journée, odeurs, etc.). Récemment, nous avons mis en lumière l'importance du rôle de l'attention en tant que facteur de risque de la vulnérabilité à la dépendance à la nicotine. C'est dans ce contexte que nous proposons un projet de recherche qui a pour but d'identifier les bases neurobiologiques impliquées dans les processus attentionnels et responsables de la vulnérabilité à développer l'addiction à la nicotine. Le cortex préfrontal (PFC) est une des structures régulées par les effets de la nicotine et qui participe au contrôle de l'attention. Par conséquent le projet a pour objectif de questionner les mécanismes sous-jacents par l'utilisation de manipulations virales cellulaires spécifiques des populations neuronales du PFC impliquées dans les effets de la nicotine. Nous examinerons ces mécanismes par la mise en œuvre d'expériences combinant chez la souris des approches comportementales, optogénétiques (contrôle des neurones par une fibre optique) et électrophysiologiques (enregistrement de l'activité électrique des neurones du PFC). Les manipulations virales seront sans conséquences sur le phénotype comportemental des animaux sans l'activation optique spécifique.

Ce projet implique au total n=635 souris males et femelles, et nous mettons tout en œuvre pour respecter au mieux le bien-être animal et le principe des 3R. Le modèle animal ne pouvant être Remplacé, dans cette étude, par d'autres méthodes alternatives n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants, l'effectif des animaux a été Réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiques, et nous avons Raffiné nos procédures tout en tenant compte des variations interindividuelles. Les animaux sont hébergés dans des animaleries thermorégulées et disposent d'un milieu enrichi selon les normes dictées par les Directives Européennes. Les animaux sont manipulés régulièrement afin d'inhiber tout stress et sont observés quotidiennement afin de réagir au plus vite en cas d'apparition de signes de souffrance. Etant particulièrement vigilants à la prise en charge de la douleur, nous avons mis en place des points limites spécifiques et précoces, ainsi que des mesures prophylactiques et analgésiques adaptées.

18370 Contexte scientifique

: Les hormones thyroïdiennes interviennent dans de nombreux processus biologiques comme le maintien des constantes du milieu intérieur, le contrôle du métabolisme et le développement (dont celui du système nerveux central) mais aussi dans les transitions du cycle de vie avec la métamorphose chez les amphibiens et la naissance chez les mammifères. Leurs effets et leurs mécanismes d'action sont très divers et très conservés au cours de l'évolution. Cependant, des molécules, présentes à la fois dans les milieux anthropiques et naturels, sont suspectées d'avoir des effets sur la signalisation des hormones thyroïdiennes et par conséquent des effets néfastes/délétères, aussi bien chez l'humain que dans les écosystèmes. Il est aujourd'hui indispensable de pouvoir identifier les effets perturbateurs de ces molécules afin de pouvoir agir pour préserver la santé humaine et la biodiversité. L'Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OCDE) a validé des identifications. L'OCDE est une organisation internationale qui œuvre pour la mise en place de politiques meilleures pour une vie meilleure établissant des normes internationales et des lignes directrices pour les essais de produits chimiques. Cependant, ces tests réglementaires nécessitent des optimisations pour la détection des perturbations thyroïdiennes. Cette DAP concerne la production d'animaux pour appliquer les conditions expérimentales du protocole XETA (« Xenopus Eleutheroembryo Thyroid Assay » ou Essai thyroïdien sur éléuthéro-embryons de Xenopus) qui est un des essais validés par l'OCDE pouvant bénéficier de nouveaux critères d'évaluations. Dans ce contexte, le XETA a été conçu comme un test de dépistage de la perturbation thyroïdienne, assurant un débit moyen, pour des essais à court terme, utilisant sur toute la période du test des embryons libres dont la nutrition est toujours assurée par du vitellus. Ces animaux sont obtenus à partir de reproductions d'adultes hébergés dans notre établissement utilisateur d'animaux à des fins expérimentales. La procédure de reproduction est l'objet de notre demande.

Objectif du projet

: Contrairement aux études précédentes restreintes à quelques gènes choisis a priori, notre projet de recherche a pour objectif de mesurer l'impact de perturbateurs thyroïdiens sur l'expression de tout le génome et présager ainsi des effets jusque-là inaperçus. Ces résultats permettront d'optimiser les tests existants d'évaluation des dangers et des risques pour la santé humaine et l'environnement en incluant de nouveaux critères pour l'identification des perturbateurs thyroïdiens dans ces tests.

Balance dommages/bénéfices

: Le modèle utilisé pour ce projet est l'espèce d'amphibien *Xenopus laevis* pour plusieurs raisons : 1) les animaux proviennent d'un élevage et leur utilisation ne nécessite pas de prélèvement dans la nature, 2) les adultes reproducteurs peuvent être impliqués dans plusieurs projet, 3) il est un modèle d'étude des processus biologiques depuis plus d'un siècle, 4) son temps de génération est court, 5) son développement externe permet une observation directe (non invasive) tout en s'affranchissant de l'influence maternelle (comme chez les mammifères), 6) il est une espèce tétrapode proche de l'homme et la voie de signalisation thyroïdienne y est similaire, 7) son développement dont la métamorphose est dépendante des hormones thyroïdiennes et 8) il est un des modèles fortement soutenu par l'OCDE pour l'évaluation de la toxicité des perturbateurs

endocriniens. Les éléuthéro-embryons de Xénope seront obtenus par reproductions semi-naturelles d'adultes de type sauvage suite à une procédure correspondant à une injection hormonale qui n'a pas été montrée dommageable pour les animaux.

Conformité avec la règle des 3R

: Les conditions expérimentales du test XETA sont standardisées et ont été mises au point pour répondre à la règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer) tout en bénéficiant d'un pouvoir statistique suffisant. Ces conditions sont à l'origine de sa validation par l'OCDE. Il est impossible de s'exempter de l'utilisation d'animaux car la perturbation de la signalisation thyroïdienne peut agir aussi bien sur le contrôle de la synthèse et l'excrétion des hormones thyroïdiennes par la glande thyroïde, sur leur circulation dans le sang, et sur leur disponibilité et leurs actions au niveau des tissus cibles. Le nombre d'animaux utilisé pour les reproductions dépend du nombre d'éléuthéro-embryons nécessaire pour l'essai XETA. Nous allons tester quatre perturbateurs thyroïdiens connus et choisis dans le cadre du cluster de consortia européens EURION (European cluster to improve identification of endocrine disruptor, <https://eurion-cluster.eu/>) : le perchlorate de sodium (NaClO₄-), le propylthiouracile (PTU), l'acide iopanoïque (IOP) et le tetrabromobisphenol A (TBBPA). Elles ont déjà été testées dans le cadre du XETA et aucun effet néfaste sur les animaux n'a été observé pendant la durée du test. En groupant l'étude des 4 molécules à tester et ces différentes mesures, nous répondons à la règle des 3R en matière de réduction du nombre dans la mise en œuvre de la procédure de reproduction. De plus, comparée aux approches historiques, notre approche expérimentale basée sur une technologie permettant la mesure simultanée de l'expression de tous les gènes permet de réduire considérablement (au moins d'un facteur 100 à 1000) le nombre d'animaux utilisés par rapport à une mesure classique de l'expression des gènes. L'expérience devra être répétée avec 3 répliques biologiques (3 pontes différentes provenant de géniteurs différents). Enfin, considérant le taux de réussite des reproductions, que tous les animaux doivent provenir de la même ponte et que la ponte doit comporter au moins 80% d'animaux normaux et sains au même stade de développement, il faudra 15 femelles adultes et 15 mâles adultes. Nous attendons au moins une ponte de très bonne qualité par groupe de 5 pontes. La procédure employée pour obtenir les fécondations est légère et sans conséquence sur la forme ou le génome des grenouilles. Au cours de la procédure et la semaine qui suit, les reproducteurs sont suivis. En cas d'observation de points limites (mauvais état de la peau, perte de poids, défauts de nage, blessures, difficulté respiratoire, tumeur et hémorragie), les animaux sont mis à mort. Enfin, dans le but de raffiner et de réduire le nombre d'animaux utilisés dans des expériences, les adultes reproducteurs seront impliqués dans des reproductions ultérieures.

La force et la pertinence scientifique du projet reposent sur la complémentarité du protocole du XETA et des mesures du transcriptome à l'échelle du génome que nous allons réaliser sur ces animaux. Le nombre total d'animaux impliqué dans le projet EDC-OMICS-1 est donc de 30 individus.

18371 Les aérosols sont des particules en suspension dans l'air pouvant pénétrer dans les voies respiratoires. Afin d'étudier leurs effets par inhalation, des modèles animaux sont classiquement utilisés dans des études expérimentales chez les animaux. L'objectif de ce projet est de proposer un système d'administration d'aérosol prototype permettant le contrôle et le ciblage précis de la dose dans les voies respiratoires d'intérêt du macaque. Ce système pourra être utilisé pour étudier les thérapeutiques et les contremesures médicales. Dans ce contexte, le macaque est un modèle de choix car : 1) c'est une espèce de référence pour les études réglementaires pour les médicaments inhalés, 2) avec l'homme, c'est l'espèce de l'ordre des primates la mieux documentée d'un point de vue génomique et immunologique 3) le macaque a une anatomie pulmonaire, une physiologie respiratoire et des paramètres respiratoires proches de ceux de l'homme 4) il permet de tester des thérapeutiques avec des produits et dispositifs pour inhalation qui seront directement utilisés chez l'homme. Pour mettre au point ce système de génération d'aérosols, nous utiliserons une méthode alternative qui consiste en l'utilisation d'un modèle anatomique plastique imprimé en 3D des voies respiratoires du macaque. Le modèle 3D nécessite néanmoins d'être validé. Pour valider ce modèle, une étude comparative entre le dépôt d'aérosol obtenu avec le modèle 3D et le

dépôt obtenu avec les 3 macaques sera réalisée par imagerie scintigraphique. Les aérosols seront générés à l'aide trois nébuliseurs générant trois tailles différentes de particules afin de cibler trois zones de dépôts différentes dans les voies respiratoires. Sur la base de ces résultats, le système d'administration d'aérosol prototype sera développé puis évalué sur les 3 macaques.

Le plan expérimental établi répond à la règle des « 3R » : Les données obtenues seront indispensables pour prédire une exposition à des aérosols contaminants ou des aérosols thérapeutiques et prédire potentiellement des résultats de dépôt dans les voies aériennes de l'homme

-Remplacer : le modèle in vitro 3D est utilisé pour réduire le nombre d'expérimentation et l'utilisation d'animaux, en particulier dans le cadre du développement du générateur d'aérosols prototype.

Réduire: les animaux seront réutilisés au cours du projet en cas de procédures légères à modérées. Les groupes sont petits (N=3) mais permettront d'obtenir des résultats quantifiés et statistiques (statistiques non paramétriques).

-Raffiner: Toutes les procédures sont optimisées pour n'induire aucune détresse ou douleur, ou le cas échéant les supprimer. Les animaux seront hébergés par groupe de 3 en volières (enrichissement social) conformes aux normes en vigueur. Les animaux disposent dans leur hébergement de plateformes surélevées, de tunnels, de jouets et de piscine. L'alimentation couvre les besoins journaliers et est complétée par une distribution de friandises deux fois par jour. La nourriture pourra être cachée dans des jouets pour stimuler la recherche alimentaire. Les friandises distribuées sont différentes d'un jour à l'autre et le matin et le soir.

18372 Les maladies auto-immunes sont caractérisées par un dysfonctionnement du système immunitaire entraînant l'attaque par l'organisme de ses propres tissus. Il existe environ 80 typologies des maladies auto-immunes et une personne sur 12 en est affectée, représentant ainsi la troisième cause de morbidité dans le monde. A partir des années 2000 les médicaments issus de la biothérapie, notamment les anti-TNF α (anticorps monoclonaux qui visent le factor de nécrose tumorale alpha), ont révolutionné la prise en charge des maladies inflammatoires chroniques graves et invalidantes comme la polyarthrite rhumatoïde, l'ostéoarthrite, la dermatite de contact, le psoriasis rhumatoïde, la spondylarthrite ankylosante, ainsi que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin comme la rectocolite hémorragique et la maladie de Crohn. Les anti-TNF α sont en général bien tolérés mais ces traitements peuvent exposer à d'importants risques d'infection comme la tuberculose et d'autres infections opportunistes. De plus, avec le temps, l'apparition d'une immunisation progressive contre les anti-TNF α peut survenir et être ainsi à l'origine d'un possible échec thérapeutique. Malgré les avancements importants de ces dernières années, un pourcentage significatif des patients affectés par des maladies auto-immunes ne répond pas aux biothérapies. Notre programme de recherche vise à découvrir des molécules qui agissent via des mécanismes d'action innovants et qui peuvent ainsi représenter des options thérapeutiques pour tous les patients qui ne répondent pas aux biothérapies. Dans le cadre de ce projet, plusieurs milliers de molécules seront produites et testées dans une batterie de tests in vitro avant d'en sélectionner une dizaine pour l'évaluation in vivo. Après une première évaluation in vitro dans des tests cellulaires, les molécules actives montrant un profil pharmacocinétique approprié seront évaluées in vivo. Malgré certaines limitations, l'utilisation des modèles animaux dans le domaine des maladies auto-immunes sont des outils indispensables pour comprendre les mécanismes pathogéniques, identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, tester l'efficacité et la toxicité de thérapies anti-inflammatoires et immunomodulatrices innovantes. Nos molécules seront évaluées pour leurs capacités à rétablir l'homéostasie immunitaire chez ces animaux malades. Plusieurs modèles rongeurs de maladies auto-immunes ont été mis en place pour la polyarthrite rhumatoïde, pour l'arthrite psoriasique et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés au strict nécessaire, nous utilisons un logiciel de lois statistiques permettant de calculer le nombre minimum de souris nécessaire pour montrer que l'effet de nos composés est significatif par rapport aux animaux malades contrôles. Nous avons aussi mis en place une plateforme d'imagerie qui permet de suivre l'évolution de la maladie et de l'efficacité de nos composés sans avoir à mettre séquentiellement des animaux à mort. Afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse

infligées aux animaux, une anesthésie sera pratiquée et les procédures se dérouleront avec une surveillance journalière. Les antalgiques seront également administrés systématiquement en pré- et post-opératoire et pourront être administrés en cas de nécessité dans les autres procédures. Enfin, des points limites ont été établis, entraînant l'arrêt temporaire de la procédure pour l'animal et/ou son exclusion de l'étude. Enfin, la veille de la littérature nous permet de remplacer certains modèles ou procédures par de nouveaux modèles tout aussi pertinents mais présentant moins d'impact sur le bien-être animal. Afin de limiter le stress des animaux et de respecter leurs besoins, l'environnement sera enrichi par l'ajout d'igloo ou tunnel, de bâtonnets à ronger et du matériel de nidification. La densité dans les cages sera en conformité avec les recommandations et autant que possible, les groupes d'animaux dans les études resteront ceux formés pendant l'acclimatation.

Les animaux et leurs conditions d'hébergement (environnement, nourriture, eau de boisson) seront sous surveillance quotidienne. L'ensemble des animaux a été réévalué à 41410 animaux comprenant 33440 souris et/ou 7970 rats sur une période de 5 ans.

18373 L'eczéma est une maladie de la peau très fréquente d'origine allergique, aiguë ou chronique, caractérisée par une inflammation non contagieuse de la peau qui s'accompagne de rougeurs, de fines vésicules, de squames et de démangeaisons. Il peut commencer très tôt dans la vie et s'observe même chez les nourrissons. Les personnes atteintes connaissent des périodes communément appelées "poussées d'eczéma" durant lesquelles les symptômes s'aggravent. Ces poussées de durée variable sont entrecoupées de périodes de rémission.

Le mécanisme de l'eczéma n'est pas encore bien compris. Il toucherait à la fois le système immunitaire et les cellules de la peau qui agissent comme barrière pour les allergènes. L'eczéma serait un désordre de nature génétique, mais des facteurs environnementaux tels que le climat, temps froid et sec, la présence d'irritants chimiques ou le stress influenceraient son apparition.

C'est la maladie de la peau la plus fréquente : elle motive en effet jusqu'à 30% des consultations en Dermatologie. Dans les pays industrialisés, elle atteindrait de 15 à 30% des enfants et de 2 à 10% des adultes. Selon de récentes estimations, les cas d'eczéma auraient doublé voire même triplé depuis les 30 dernières années, et leur progression continue sans cesse.

Il existe plusieurs types d'eczéma dont la forme la plus courante est l'eczéma atopique ou dermatite atopique, forme chronique de cette pathologie, pouvant se compliquer avec des surinfections bactériennes favorisées par le grattage. L'eczéma atopique comporte au minimum 3 phases différentes : 1) apparition d'eczéma sans signes de sensibilisation, peut durer toute la vie chez 20 à 30 % des patients atteints de cette forme atopique ; 2) véritable forme atopique, avec sensibilisation, affecte 70 à 80 % des patients ; 3) forme touchant seulement les patients atteints d'une véritable forme atopique et se caractérisant par des signes de sensibilisation médiée par une immunoglobuline (IgE) à une protéine de l'organisme (autosensibilisation).

Le traitement des poussées de l'eczéma atopique se fait en utilisant des dermocorticoïdes sous stricte surveillance médicale et des antihistaminiques en cas de démangeaisons associées, des immunomodulateurs topiques permettant de diminuer l'activité du système immunitaire, ou des traitements par rayons ultraviolets (photothérapie ou photochimiothérapie). L'utilisation d'antibiotiques ou d'antiseptiques peut être nécessaire en cas de surinfection bactérienne, ainsi que l'utilisation d'antiviraux pour les surinfections virales.

Il est donc important d'avoir des modèles expérimentaux d'eczéma représentatifs de la pathologie humaine afin d'en comprendre les mécanismes et surtout d'évaluer de nouveaux candidats médicaments pour éradiquer.

Le but de ce projet est de valider d'un point de vue comportemental et analytique un modèle d'eczéma chez la souris, avant, si ce modèle est validé, d'évaluer l'efficacité d'un nouveau traitement innovant sous forme de vaccin sur cette pathologie. Nous utiliserons un total maximum de 64 souris femelles Balb/c âgées de 8 semaines pour l'ensemble de ce projet, 16 souris pour la 1ère étape de validation du modèle, et éventuellement 48 souris pour la 2ème étape d'évaluation de l'efficacité d'un nouveau traitement si celle-ci est réalisée.

Pour la 1ère étape, les 16 souris seront réparties en 4 groupes de traitement avec 4 souris par groupe : 2 groupes sans induction d'eczéma et 2 groupes avec induction d'eczéma, sans aucun traitement. L'application de l'agent inducteur d'eczéma (MC903) ou de son véhicule seul sera réalisée quotidiennement en 1 seule application ou en 2 applications afin de préciser les conditions expérimentales permettant d'obtenir le modèle expérimental souhaité.

Pour la 2ème étape, les 48 souris seront réparties en 6 groupes de traitement avec 8 souris par groupe : 1 groupe sans induction d'eczéma traité avec un véhicule neutre et 5 groupes avec induction d'eczéma traités respectivement avec un véhicule neutre, le composé à évaluer (FA006) à 3 doses différentes, et un composé de référence (U-50488).

Les procédures expérimentales appliquées seront : 1) le rasage des poils sous anesthésie gazeuse, 2) des applications cutanées pendant 8 jours d'une solution éthanolique contenant ou non l'agent chimique inducteur de l'eczéma (MC903), 3) le traitement des animaux par injection sous-cutanée des composés à tester 6 et 8 jours après le début de l'induction de l'eczéma, 4) l'évaluation comportementale des animaux dans un dispositif expérimental appelé open-field ou champ ouvert pendant 20 minutes, 24 heures après le dernier traitement avec enregistrement vidéo pour la quantification de différents paramètres, 5) un prélèvement de sang immédiatement après l'évaluation comportementale et avant la mise à mort des animaux pour le dosage de biomarqueurs sanguins. Des prélèvements cutanés seront ensuite effectués sur l'ensemble des animaux pour la réalisation d'analyses histologiques et immunohistochimiques sur des marqueurs spécifiques de l'eczéma.

Les animaux seront placés à 2 par cage (18. 9 x 29. 6 x 12. 8 cm) pour l'ensemble des groupes expérimentaux, en cycle de lumière inversé pour réaliser l'évaluation comportementale pendant leur phase active et ainsi respecter leur horloge biologique (chronobiologie), et des fibres de coton Cell Best SP seront placées dans leur cage comme enrichissement pour assurer leur bien-être (Raffinement).

Il n'existe pas de modèles in vitro permettant l'évaluation de l'efficacité de composés sur l'eczéma et sur la sphère comportementale (Remplacement) et nous utiliserons un nombre réduit d'animaux mais suffisant pour mettre en évidence des différences significatives selon notre expérience des modèles de dermatite atopique dans nos conditions expérimentales (Réduction).

Des observations quotidiennes des animaux seront effectuées tout au long de l'expérimentation, leur poids sera mesuré quotidiennement et l'atteinte des points limites définis (perte de poids de plus de 15% sur 3 jours ou de plus de 20% du poids maximum atteint au cours de l'étude, affaiblissement (cachexie), convulsions, tremblements, paralysie, vocalises...) entrainera la sortie d'étude et la mise à mort des animaux selon les recommandations éthiques.

18374 La greffe de peau ou transplantation cutanée est l'utilisation d'un morceau de peau pour recouvrir une plaie, soit dans un but de cicatrisation par le tissu apporté, soit comme pansement. Suivant l'origine du greffon on parle de prélèvement autologue (fait sur le receveur lui-même) ou de prélèvement hétérologue (fait sur une autre personne que le receveur). La xénogreffe désigne la transplantation d'un greffon où le donneur est d'une espèce biologique différente de celle du receveur. Elle s'oppose ainsi à l'allogreffe où le greffon vient de la même espèce que le receveur.

Les substituts cutanés ou dermes artificiels, sont des biomatériaux capables de remplacer une partie de la peau et constituent une alternative précieuse pour la gestion des plaies lorsque les thérapies standards sont un échec. Cependant, sélectionner le bon substitut n'est pas une décision thérapeutique aisée. Aujourd'hui, si les greffes autologues sont les greffes de première intention pour la couverture des plaies, elles se heurtent à l'écueil d'une disponibilité limitée de peau, en particulier dans la prise en charge des grandes brûlures et les procédures restent invasives et douloureuses. Des allogreffes et des xénogreffes peuvent pourvoir au remplacement temporaire de la peau, avant de laisser la place à une autogreffe. Subsiste évidemment les risques de rejet, douleurs et infection, et la formation de cicatrices.

De nombreux substituts cutanés biosynthétiques sont aujourd'hui disponibles, constitués de cellules humaines vivantesensemencées sur une matrice et nourries de protéines et facteurs de croissance

nécessaires pour mieux se développer et se multiplier dans le tissu souhaité, et des substituts cutanés à partir de cellules souches embryonnaires humaines sont produits par ingénierie tissulaire. Ils sont envisagés pour traiter les plaies chroniques qui ne cicatrisent pas, les greffes de tissus mous chez les patients présentant des brûlures à épaisseur partielle, des plaies chirurgicales, ulcères du pied diabétique, ulcères veineux...

Il est donc important et nécessaire d'évaluer ces nouveaux substituts cutanés sur des modèles de plaies simples et chroniques représentatifs chez l'animal qui pourront être utilisés par la suite chez l'Homme et ainsi permettre d'améliorer la cicatrisation des plaies.

L'objectif de notre projet est donc d'évaluer un nouveau substitut cutané sur deux modèles de plaie induite chez la souris afin de comparer l'évolution du greffon mis en place et de sélectionner pour les études suivantes l'un de ces deux modèles de plaie cutanée. Il nécessitera l'utilisation de 16 souris mâles Swiss Nude de 20-22 g, souris Nude pour éviter les risques de rejet.

Les procédures expérimentales seront appliquées : sous anesthésie gazeuse, induction d'une plaie cutanée ronde de 15 mm de diamètre ou carrée de 15 mm de côté, par excision cutanée complète sur le milieu du dos (Procédure expérimentale 1), suivi de la greffe d'un substitut cutané dans le lit de la plaie cutanée avec suture chirurgicale et, pour le modèle de plaie cutanée ronde uniquement, collage d'un anneau en silicone autour de la région greffée pour éviter la contraction de la plaie (Procédure expérimentale 2), puis placement pendant 2 semaines d'un pansement au-dessus de la région greffée, puis d'une compresse au-dessus du pansement pour absorber les exsudats = liquides organiques sortant de la plaie cutanée, d'un pansement de couverture et d'une bande de sparadrap pour maintenir le tout en place (Procédure expérimentale 3), sans que cela ne perturbe l'activité et le comportement des souris selon nos observations effectuées lors des études précédemment réalisées. Les régions greffées seront observées et photographiées chaque semaine pendant 2 semaines lors du change de pansement effectué 2 fois par semaine après placement des souris sous anesthésie gazeuse, afin d'évaluer la survie et la tolérance du greffon cutané (Procédure expérimentale 4).

L'ensemble des animaux sera mis à mort par injection intrapéritonéale d'une surdose d'euthanasique sous anesthésie gazeuse et un prélèvement cutané sera effectué au niveau de la zone de greffe cutanée pour la réalisation d'analyses biologiques (histologie et immunohistochimie) permettant d'évaluer les processus de régénération du tissu cutané (prolifération cellulaire, épithélialisation, vascularisation...).

Nous utiliserons le nombre minimum d'animaux nécessaire à la réalisation de ce projet mais permettant d'obtenir des résultats prédictifs et représentatifs (Réduction).

Les souris seront placées en cage individuelle (18. 9 x 29. 6 x 12. 8 cm) avec couvercle filtrant pour éviter qu'elles ne s'arrachent entre elles le greffon cutané, l'anneau en silicone, le pansement, la compresse, le pansement de couverture et la bande de sparadrap, en cycle de lumière inversé pour observer leur comportement pendant leur phase active et ainsi respecter leur horloge biologique (chronobiologie), et des bâtonnets d'ouate seront placés dans leur cage comme enrichissement pour assurer leur bien-être (Raffinement).

Les animaux seront observés quotidiennement tout au long de l'expérimentation, leur poids sera mesuré à chaque renouvellement de pansement (2 fois par semaine), et si une perte de poids supérieure à 20% par rapport au poids maximal est observée ou si des signes d'infection de la plaie ou des modifications du comportement des animaux sont observés (prostration, cachexie, vocalises, convulsions...), ceux-ci seront mis à mort dans des conditions éthiques.

Ce projet sera réalisé sur des animaux vivants car il n'est pas possible d'utiliser des modèles in vitro ou ex vivo pour évaluer la tolérance et l'efficacité de substituts cutanés sur des plaies cutanées chroniques (Remplacement).

18375 Les maladies du cerveau représentent un problème majeur de santé publique. La découverte de candidats médicaments et leur développement sont connus pour être très longs. La situation est encore plus dramatique pour les composés ciblant le système nerveux central ; le taux d'accès à la première administration chez l'homme et au dépôt de dossier d'autorisation de mise sur le marché

est plus faible que pour d'autres axes thérapeutiques. Le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant le système nerveux central exige une évaluation précise du mode d'action et de la neurotoxicité des composés en développement. Cette information doit être obtenue le plus tôt possible afin de remédier aux situations d'échecs au stade du développement clinique. Le manque d'efficacité et la présence de phénomènes inattendus de neurotoxicité sont les principales causes d'échec des projets de R&D pharmaceutiques au stade des essais cliniques. Il est donc important de développer une stratégie précoce permettant d'apprécier l'efficacité après le passage cérébral et d'évaluer la neurotoxicité d'un candidat médicament.

L'objectif de ce projet est de tester l'efficacité/la neurotoxicité de composés en développement. Nous procéderons à l'administration de composés sur des rongeurs (souris et rats) sauvages. Les modifications du réseau neuronal induites par l'administration unique ou répétée des composés par voie entérale ou parentérale seront évaluées, après la période d'administration, par des enregistrements électrophysiologiques sur animal vigile ou anesthésié. Ce projet, d'une durée de 5 ans, nécessitera 1515 rats et 2525 souris.

Associé à notre plateforme d'électrophysiologie in vivo (sur animal vigile ou anesthésié), il permettra de tester les effets neurotoxiques/neuroprotecteurs de composés en développement. L'électrophysiologie est une technique très puissante qui permet l'enregistrement de l'activité électrique à l'échelle d'un réseau de neurones. Plusieurs paramètres électrophysiologiques peuvent être mesurés sur un même animal :

- l'activité des neurones situés dans une structure cérébrale donnée.

- la plasticité synaptique (modulation des connexions entre les neurones dans le cerveau, les synapses étant les points de contacts entre les neurones) est considérée comme un élément fondamental de la mémoire et se mesure par la potentialisation à long terme.

- l'activité oscillatoire : l'activité globale des neurones d'une structure donnée oscillent selon certains rythmes, à différentes fréquences (de 0 à 150 Hz). Ces oscillations reflètent l'état de vigilance.

Pour les études sur l'animal vigile, suite au placement par chirurgie des électrodes d'enregistrement, il se peut que les animaux présentent des signes de douleur malgré les précautions prises pendant la phase de chirurgie (analgésiques, anesthésiques) et en post-opératoire (antibiotiques). Des points limites préalablement définis permettront d'assurer un suivi de l'état général des animaux et de mettre en place des interventions précoces en cas de souffrance.

Suite à l'administration des composés à tester, il se peut que des signes d'inconfort ou d'intolérance se manifestent. Dans ce cas, les points limites préalablement définis et adaptés à l'espèce et à chaque mode d'administration permettront d'assurer un suivi de l'état général des animaux et de mettre en place des interventions précoces et adaptées en cas de souffrance animale.

L'étude du système nerveux, de par sa complexité d'organisation, de développement et de fonctionnement, ne saurait être envisagée hors du contexte intégré retrouvé au sein de l'organisme entier. En ce sens, seules des approches menées chez un modèle animal, certes simplifié, peuvent améliorer la connaissance du cerveau humain et son développement, et ainsi aboutir au développement de nouvelles thérapies pour des pathologies neurodégénératives. Nos expérimentations seront réalisées chez le rat ou la souris ; ces rongeurs, de petite taille et d'élevage facile, possèdent un système nerveux dont le développement est extrêmement proche de celui du système nerveux humain, et dont l'organisation, certes simplifiée, est suffisamment complexe.

Nombre et type d'animaux, conditions d'hébergement et de soins (principe de réduction, remplacement et raffinement) : nos expérimentations, même si elles nécessitent l'utilisation d'animaux, sont pratiquées avec un souci permanent de réduction du nombre d'animaux et de bien-être pour nos animaux en expérimentation. Toutes les expériences sont réalisées dans le respect éthique de la règle des 3 R:

- remplacement: l'organisation des réseaux neuronaux et la plasticité synaptique peuvent être étudiées sur animaux vigiles ou anesthésiés par électrophysiologie in vivo. Elles ne peuvent pas être reproduites ni étudiées dans des modèles de cultures cellulaires in vitro. L'étude de l'effet de composés en développement nécessite l'administration de ces composés sur un organisme entier. Le rongeur représente un modèle de choix car il existe des protocoles bien établis permettant

d'étudier la plasticité synaptique, l'activité oscillatoire et les taux de décharge, couramment utilisés par la communauté scientifique d'après les données bibliographiques.

-réduction : le nombre de rongeurs utilisé a été réduit autant que possible, tout en étant suffisant pour l'obtention de résultats exploitables. Sur un même animal, nous pourrions enregistrer simultanément différents paramètres électrophysiologiques (plasticité synaptique, transmission synaptique de base, activité neuronale). L'évaluation du nombre d'animaux nécessaire a été effectuée par l'utilisation du programme GPower 3. 1. Les résultats seront analysés avec le logiciel GraphPad Prism. Nous adapterons les tests statistiques en fonction de la distribution des observables, qu'elle soit normale ou non.

-raffinement : à leur arrivée, les animaux seront hébergés dans des cages collectives avec un environnement enrichi (jouets, copeaux de bois à grignoter, contact visuel et olfactif entre les animaux, musique, commutation progressive de la lumière et interactions fréquentes avec les humains). Boisson et nourriture seront disponibles ad libitum.

Avant l'étape de chirurgie nécessaire au placement des électrodes d'enregistrement, les animaux seront acclimatés pendant une période d'au moins 5 jours.

Pendant l'étape de chirurgie, plusieurs mesures seront mises en place afin de réduire au maximum la douleur : utilisation d'anesthésiques et d'analgésiques, application de gel ophtalmique afin d'éviter le dessèchement de la cornée, maintien d'une température constante.

Pour les études sur animal vigile, après l'étape de chirurgie, les animaux seront isolés afin d'éviter tout dommage au niveau des implants ou l'apport de germes susceptibles de provoquer une infection.

Avant le début d'administration des composés, une période de récupération post-chirurgicale d'au moins une semaine sera respectée. Pendant la période d'administration des composés, une observation journalière des animaux sera mise en place. Des points limites préalablement définis et adaptés à chaque mode d'administration permettront d'assurer un suivi de l'état général des animaux et de leur bien-être (souffrance, stress, angoisse). En cas d'altération de l'état de l'animal, la surveillance sera rapprochée et les animaux seront soignés en fonction de la sévérité de la douleur observée. Si les signes de souffrance persistent, les animaux seront mis à mort.

18376 *Mycobacterium avium* est un pathogène respiratoire chez les patients porteurs de bronchopathies chroniques obstructives mais également responsable de bactériémie et de maladie disséminée chez les patients immunodéprimés. Bien que la clarithromycine soit une molécule incontournable dans le traitement de ces pathologies, le traitement reste complexe (polythérapies), long (9-12 mois), à faible niveau de preuve et souvent très mal toléré. A ce jour le traitement optimal (choix des molécules, nombre de molécules à utiliser, durée du traitement,...) n'est pas défini et de nouveaux antibiotiques potentiellement susceptibles de raccourcir le traitement n'ont pas été testés cliniquement faute d'étude préclinique. De plus, on note l'émergence de souches résistantes aux antibiotiques et de nouvelles molécules actives sont donc nécessaires. Il a été récemment décrit que l'utilisation d'un modèle murin d'infection pulmonaire reproduisait l'effet bénéfique de la clarithromycine et certaines associations semblaient prometteuses dans cette indication. Le choix des molécules, le nombre de molécules à utiliser et la durée optimale de traitement reste à définir d'abord sur un modèle murin qui pourra ensuite guider les essais cliniques.

Afin d'étudier l'apport de nouvelles molécules, nous proposons dans le cadre d'un projet de 5 ans une étude expérimentale de 5 mois comprenant 130 souris. Il est prévu 5 groupes de traitement (durées de traitement de 1 à 4 mois) comprenant chacun 20 souris et une groupe contrôle comprenant 30 souris. Les molécules à l'étude seront les suivantes : CLR=clarithromycine ; RIF=rifampicine ; EMB= éthambutol ; MFQ=Méfloquine ; EMQ=érythroméfloquine (énanthiomère de la MFQ). Les groupes de traitement seront les suivants : CLR+RIF+EMB (réfèrent), CLR+MFQ+RIF, CLR+EMQ+RIF, CLR+MFQ+EMB, CLR+EMQ+EMB. La MFQ et son énanthiomère sont connus pour avoir une action sur *M. avium* mais l'étude d'une synergie avec le traitement de référence ou en remplacement de la RIF n'a pas été évalué.

Le calcul d'effectif des groupes a été conduit de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux à utiliser. Il est prévu d'infecter expérimentalement les souris par voie aérosol pour éviter le stress et la douleur d'une injection intraveineuse et de leur administrer par gavage 5 groupes de traitements. Les données pharmacodynamiques et pharmacocinétiques de la méfloquine et ses dérivés ont déjà été publiées, manque maintenant l'efficacité de ces molécules en combinaison. Il n'existe pas à ce jour de méthodes alternatives pour mesurer l'efficacité des combinaisons de médicaments contre cette mycobactérie qui remplacerait la souris ou qui réduirait le nombre de souris à utiliser.

Les souris infectées seront traitées avant l'apparition de signes cliniques de la maladie, les souris contrôles (non traitées) seront surveillées attentivement pour évaluer et déceler tout signe douloureux qui nécessiterait une euthanasie précoce (points limites spécifiques définis). De plus, des travaux précédents faits chez l'animal sur ce type d'infection démontre que même s'il existe des lésions pulmonaires et des bactéries sur les cultures des poumons de souris infectées, celles-ci ne présentent (contrairement à la tuberculose) aucun signe clinique de douleur, d'altération de l'état général ni même de modification du comportement.

De plus les animaux bénéficieront d'enrichissement de leurs cages (litières foisonnantes et absorbantes, caches, fond musical...), de nourriture et boisson ad libitum et d'un marquage individuel pour le suivi de leur bien-être.

18377 Les cancers sont aujourd'hui la première cause de décès en France, et des modalités thérapeutiques innovantes doivent être proposées. Dans ce contexte, l'un des développements les plus intéressants dans le domaine des thérapies anticancéreuses est celui des anticorps monoclonaux dont l'efficacité clinique est maintenant prouvée depuis les années 80, conduisant à une utilisation thérapeutique de plus en plus large d'anticorps.

Les anticorps monoclonaux ont de multiples applications en recherche et en diagnostic, en clinique humaine, en exploitant la reconnaissance de protéines en biologie, ou encore peuvent être utilisés comme médicaments.

Le but de ce projet est de générer des anticorps monoclonaux à potentiel thérapeutique chez la souris contre un antigène donné, lequel est impliqué dans un processus pathologique humain. Les anticorps générés chez l'animal seront ensuite testés dans des modèles in vitro pour valider la cible dans une approche d'immunothérapie.

Des alternatives in vitro sont également mise en œuvre mais compte tenu de la complexité des anticorps, les méthodes substitutives actuelles ne permettent pas d'assurer la génération de novo d'anticorps dirigés contre un antigène précis répondant aux critères des projets thérapeutiques. Les approches in vitro et in vivo sont à ce jour complémentaires pour garantir la plus grande diversité et l'obtention de candidats pouvant répondre aux cahiers des charges des aires thérapeutiques (diversité, cross-réactivité, activité).

Ce projet couvre l'utilisation de souris dans le cadre de protocoles d'immunisation. Ces protocoles d'immunisation correspondent classiquement à trois injections par voie intrapéritonéale et un prélèvement sanguin en fin d'étude entraînant des contraintes légères à l'animal (contention, piqûre). Les protocoles d'immunisation nécessitant des injections multiples sont réalisés sous anesthésie générale. Les animaux sont observés quotidiennement et toute perte de poids ou signe clinique (d'apparition très rare) sont pris en charge par l'équipe vétérinaire et le responsable de l'étude. De plus, une attention particulière est apportée aux conditions d'hébergement et à l'enrichissement du milieu.

Le nombre d'animaux utilisés a été optimisé afin de générer un pool d'anticorps de qualité et de diversité requises pour la sélection des meilleurs anticorps thérapeutiques en 2-3 mois. Il est anticipé un nombre de 100 études sur la période du projet à raison de 1 à 3 groupes / étude et de 2 à 5 d'animaux par groupe. Nous prévoyons ainsi l'utilisation de 1500 souris pour la mise en œuvre de ce projet.

18378 L'objectif de ce projet est de produire un principe actif de médicament à usage humain (sérum anti-thymocytaire de lapins). Ce médicament qui est l'un des médicaments majeurs actuellement prescrits dans la prévention et le traitement du rejet de greffes d'organes chez l'Homme est utilisé dans plus de 60 pays dans lesquels il fait l'objet d'une Autorisation de Mise sur le Marché.

Le nombre de transplantations / greffes d'organes est en forte augmentation dans le monde, principalement pour certains pays comme les USA, la Chine et l'Inde. Si le nombre de greffes est plutôt stable en Europe, l'accent est mis sur une minimisation du risque de rejet en mettant un œuvre les traitements à efficacité démontrée, en particulier le sérum anti-thymocytaire. Outre la criticité de la survie des patients greffés, cette gestion du risque est étroitement liée à une utilisation optimale des greffons, considérant le manque chronique de donneurs et les délais d'attente parfois dramatiques. Le nombre de greffes d'organes (rein, cœur, foie, poumon, pancréas, intestin) à l'échelle mondiale était d'environ 100. 000 en 2010 et il approche 200. 000 en 2019, niveau qui sera rapidement dépassé.

Outre cette indication de traitement antirejet, une autre indication thérapeutique importante, de type "life-saving" fait l'objet d'une demande croissante dans certains pays pour le traitement de l'aplasie médullaire. Ici aussi certains pays à forte population, comme la Chine, voient leurs besoins fortement augmentés.

Le médicament concerné (à partir de sérum anti-thymocytaire de lapins) est produit exclusivement en France et, à l'exception d'un site de production en Belgique, la totalité du principe actif est produite en France.

Les chiffres relatifs aux greffes sont présentés dans un graphe illustrant l'évolution du nombre à l'échelle mondiale et sur une carte visualisant la répartition mondiale. Ces deux éléments d'information sont consultables sur le site du GLOBAL OBSERVATORY ON DONATION AND TRANSPLANTATION (<http://www.transplant-observatory.org>) dont deux membres importants sont l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) et le Conseil de l'Europe (via le EDQM ou "European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare").

Pour la fabrication de ce médicament qui est composé d'anticorps polyclonaux, actuellement, la technique consiste à immuniser des animaux avec l'antigène pour qu'ils produisent les anticorps d'intérêt. Il n'existe pas à ce jour de méthode alternative valable et validée. Notre projet fait appel au lapin qui répond très bien aux immunisations, et permet d'obtenir un sérum de grande qualité. Cette production de sérum à visée thérapeutique devrait nous amener à utiliser 239 000 lapins sur les 5 années à venir. Il s'agit d'une estimation du nombre nécessaire et minimum d'animaux qui seraient utilisés pour répondre à la demande mondiale des organismes de soins médicaux pratiquants les greffes d'organes. Le nombre de lapins utilisés dans ce projet est directement proportionnel au nombre de patients greffés au niveau mondial. En revanche, si la demande est inférieure, un nombre moins important de lapins sera utilisé.

Depuis l'obtention des premières Autorisation de Mise sur le Marché il y a 30 ans, les méthodes de production ont été constamment améliorées pour d'une part intégrer toutes les réglementations et bonnes pratiques applicables (hébergement, formation du personnel, prise en compte de la souffrance animale, bien-être des animaux) et d'autre part, limiter le nombre d'animaux utilisés grâce à l'amélioration des rendements de purification du sérum. Les lapins sont hébergés en groupes sociaux sauf lorsqu'ils sont incompatibles. Les immunisations et les prélèvements sont réalisés par du personnel expérimenté. Les injections et prélèvements sont peu invasifs. Durant leur séjour dans le centre de production, on fournit aux lapins des moyens de grignoter, se cacher, et des plateformes permettant aux lapins de se percher, pour répondre à leur besoins comportementaux élémentaires.

18379 La grippe est une infection virale aiguë qui se propage facilement d'une personne à une autre et qui peut toucher n'importe qui dans n'importe quel groupe d'âge. D'après l'OMS, la grippe est un problème de santé publique sérieux qui provoque des maladies graves et des décès dans les populations à plus haut risque. Au niveau mondial, elle est responsable de 250 000 à 500 000 décès par an.

Le moyen le plus efficace de se prémunir de la maladie ou d'une issue grave est la vaccination. Des vaccins sûrs et efficaces existent et sont utilisés depuis plus de 60 ans. Cependant, les virus grippaux peuvent développer une résistance à ces médicaments. La recherche de vaccins ou molécules ayant une efficacité supérieure à celle des vaccins actuellement sur le marché reste donc indispensable.

Ce projet a pour objectif de développer et de caractériser des modèles infectieux chez la souris et le furet après infection du virus de la grippe dans le but d'évaluer l'efficacité de produits antiviraux. De plus, la caractérisation d'une co-infection chez la souris après infection de grippe puis de bactérie 7 jours suivants l'infection virale sera réalisé dans l'objectif d'évaluer l'efficacité de produits pour lutter contre la réponse immunitaire.

Lors de ce projet, l'imagerie médicale pourra être utilisée afin de suivre l'infection in-vivo et/ou la biodistribution de produits antiviraux. Ces techniques présentent l'avantage d'être non invasives (requiert seulement l'anesthésie des animaux) et ne nécessitent pas de sacrifices d'animaux au cours du temps (suivi des mêmes animaux au cours du temps, diminution de l'impact de la variabilité individuelle). Elles permettent ainsi de diminuer le nombre d'animaux nécessaire et sont donc éthiques.

Différentes études seront réalisées au cours de ce projet. Le nombre de groupe sera variable, pour chaque étude, en fonction du nombre de conditions expérimentales à tester. Un nombre maximal de 1000 souris et de 300 furets, dans l'ensemble du projet, pourra être utilisé.

Afin de répondre aux objectifs de ce projet, le recours à l'expérimentation animale est nécessaire car il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode alternative permettant de modéliser de manière fiable l'efficacité et/ou la biodistribution de produits antiviraux dans un organisme entier vivant. Les espèces souris et furet ont été choisies car ce sont les modèles classiquement utilisés dans les études sur la grippe.

Des critères d'interruption ou « points limites » seront définis tout au long de ces études. Des méthodes permettant de prévenir l'apparition de ces points limites et d'essayer dans la mesure du possible de les traiter seront mises en place. Un suivi clinique quotidien des animaux sera réalisé afin de détecter tout signe anormal et ainsi prendre les mesures nécessaires (mises en place de traitement ou mise à mort des animaux) le plus rapidement possible.

Ce projet pourra permettre de proposer sur le marché de nouvelles molécules antivirales.

18380 Ce projet de recherche porte sur les leucémies (cancer des cellules de la moelle osseuse et du sang) et en particulier sur les Leucémies Aiguës Myéloïdes (LAM). Ce type de cancer est couramment traité par chimiothérapie combinant deux molécules : la doxorubicine et la cytarabine. Néanmoins, le mode d'action de ces molécules est encore mal connu. Les connaissances actuelles montrent qu'un certain traitement anti-cancéreux agit sur une protéine présente naturellement dans les cellules normales et dont la fonction est fréquemment affectée dans les leucémies. Nous souhaitons donc déterminer ici si le mécanisme d'action de ces molécules est dépendant de cette protéine. Mieux comprendre comment ces traitements fonctionnent nous permettrait d'identifier les points faibles des cellules cancéreuses et ainsi d'améliorer les traitements actuels et/ou d'en trouver de plus efficaces.

Pour mener à bien ce projet, nous utiliserons un modèle de souris développant une maladie semblable aux LAM humaines. Nous avons choisi des souris femelles de 6 à 8 semaines possédant une composition de moelle osseuse proche de celles des patients développant ce type de leucémie, afin d'être dans des conditions comparables aux études préalablement menées dans ce domaine et pouvant être hébergées ensemble sans risque de lutte liée à des comportements de domination. Ce modèle consiste à injecter par voie intraveineuse (injection dans la veine de la queue sur souris éveillées) à des souris normales des cellules leucémiques exprimant ou non la protéine possiblement impliquée dans la réponse thérapeutique. Nous aurons ainsi cinq lots de souris développant des leucémies. Nous suivrons la prolifération des cellules leucémiques avant et/ou après traitement en réalisant un prélèvement sanguin ou un prélèvement de moelle osseuse sous anesthésie générale si le premier n'est pas assez informatif (une expérience pilote sera menée pour

le déterminer). Ces prélèvements seront espacés d'au moins un mois (prélèvement sanguin) ou deux semaines (prélèvement de moelle osseuse) s'ils doivent être réalisés sur un même animal. Les souris seront ensuite traitées ou non par les deux molécules d'intérêt (seules ou en combinées) administrées soit par injections intra-péritonéales ou intraveineuses quotidiennes pendant maximum 5 jours (les injections étant non douloureuses, elles seront réalisées sur souris éveillées sans analgésie). Les agents thérapeutiques administrés ont déjà fait l'objet d'études antérieures démontrant l'absence de douleurs associées aux doses utilisées. Les organes contenant des cellules leucémiques comme la moelle osseuse ou encore la rate des souris seront analysés après euthanasie des souris pour évaluer l'effet des traitements dans les deux lots de souris.

Ce projet de recherche s'inscrit dans le respect de la règle des 3 R (Remplacement, Réduction, Raffinement).

En termes de remplacement, nous avons réalisé au préalable le maximum de tests in vitro. Cependant le recours à un modèle animal est maintenant nécessaire afin d'analyser le processus complexe de progression tumorale dans un système physiologique qui tient compte de l'environnement dans lequel ces cellules se développent.

En termes de réduction du nombre d'animaux utilisés, une estimation des effectifs nécessaires pour mener l'étude a été faite en tenant compte de données antérieures, ainsi qu'une simulation statistique afin de garantir l'obtention de résultats statistiquement recevables. Chaque groupe sera donc constitué de 6 souris. Nous utiliserons au maximum 624 souris sur 2 ans que durera le projet, réparties en un groupe contrôle et 3 groupes test (2 molécules thérapeutiques utilisées seules ou combinées). Six temps d'analyse (entre 30 min post-traitement et 7 jours) seront réalisés pour chacun des 5 modèles de souris développant des leucémies.

Nous attacherons une grande importance au bien-être des animaux inclus dans ce projet. En termes de raffinement, les animaux seront hébergés en groupes pour respecter leur comportement naturel. Les animaux seront surveillés quotidiennement, et une grille d'évaluation, tenant compte de leur apparence et de leur comportement notamment, sera tenue chaque semaine de façon à définir des points limites de douleur/souffrance suffisamment précoces pour déclencher le recours à l'euthanasie si ces points limites étaient atteints. Ce suivi clinique sera quotidien lors de la phase de traitement. Aucun antalgique ou analgésique ne peut être administré sans induire un stress oxydant, auquel est très sensible la protéine étudiée. Une expérience pilote sera menée pour évaluer si le prélèvement sanguin est suffisamment informatif pour éviter d'avoir recours au prélèvement de moelle osseuse sous anesthésie générale. Les procédures n'excéderont pas 3 mois. Les souris seront systématiquement euthanasiées en fin de procédure.

18381 L'angiogenèse est le processus de formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux déjà en place. Ce processus est fondamental pour la cicatrisation des tissus et le développement embryonnaire. Cependant, l'angiogenèse joue aussi un rôle dans l'évolution du cancer, des pathologies inflammatoires chroniques et des maladies de la rétine). D'autre part, La fibrilline-1 (Fbn-1) est une protéine qui assure un rôle de soutien des tissus. Sachant que d'autres protéines de soutien participent activement au processus angiogénique, nous avons envisagé que la Fbn-1 pouvait aussi y jouer un rôle. Nous avons vérifié cette hypothèse en mettant en évidence un défaut d'angiogenèse dans la rétine dans des souris porteuses d'une mutation du gène codant pour la Fbn-1 (souris génétiquement modifiées : Fbn1C1039G hétérozygotes présentant un phénotype dommageable ; l'établissement de ce modèle murin a fait l'objet d'une DAP autorisée cf. autorisation APAFIS#19728-2019031211027363v3). D'autre part, nous avons observé qu'une molécule de synthèse, correspondant à une partie de la protéine Fbn-1, stimule l'angiogenèse dans des tests in vitro.

Dans ce contexte, le projet vise à valider in vivo, l'effet observé in vitro pour 1/ comprendre comment la Fbn-1 stimule le processus angiogénique et 2/ à évaluer le potentiel thérapeutique de la Fbn-1. En particulier, nous évaluerons l'effet d'un apport de Fbn-1 sur l'angiogenèse de la rétine, chez les souris mutantes.

L'angiogenèse de la rétine chez la souris est un modèle de référence pour étudier l'angiogénèse car le processus commence juste après la naissance et progresse de manière très contrôlée et reproductible, permettant une analyse précise. Pour cette étude, nous prévoyons d'utiliser 56 animaux (4 lots de 14 souris). En pratique, la procédure que nous souhaitons réaliser consiste en l'administration, au niveau des yeux des souris, de molécules apparentées à la Fbn-1, générées au laboratoire, puis à examiner leurs effets sur la croissance des vaisseaux sanguins. Les procédures seront réalisées par du personnel formé à l'expérimentation animale et en accord avec la règle des 3R qui préconise : le Remplacement des animaux par une méthode alternative quand cela est possible : nous sommes contraints d'utiliser un modèle animal car seuls les modèles d'angiogenèse in vivo récapitulent toutes les étapes du processus (qui impliquent de nombreux types cellulaires) et permettent d'évaluer l'effet global et les éventuels effets secondaires d'une molécule. ; la Réduction du nombre d'animaux : nous allons inclure 56 animaux dans cette étude repartis en 4 groupes de 14 animaux. Pour chaque groupe, nous avons pris en compte : (1) la difficulté d'administration locale de la molécule (intraoculaire), (2) des difficultés inhérentes à la microdissection et à la fixation des rétines néonatales et (3) de la variabilité expérimentale. D'autre part, le sexe des animaux n'étant pas un critère d'exclusion, le nombre de portées sera réduit ; le Raffinement favorise le comportement naturel des animaux pour éviter tout stress (nous serons, dans ce cadre, attentifs à l'enrichissement du milieu (litière, abris) mais également nous veillerons au bon comportement de la mère vis-à-vis des souriceaux. Des points limites seront établis afin d'éviter toute souffrance inutile des animaux (poche de lait, non isolement)). La procédure d'injection sera réalisée sous anesthésie locale et une médication adéquate sera administrée. Des observations régulières seront réalisées afin de s'assurer du bien-être des animaux.

18382 L'inflammation à bas bruit est une caractéristique pathologique d'un large éventail de maladies chroniques, telles que le syndrome métabolique, les cancers, la maladie d'Alzheimer, la stéatose hépatique non alcoolique, le diabète sucré de type 2 ou encore la maladie de Crohn. L'objectif de ce projet est de tester l'efficacité d'un nouveau vaccin peptidique inhibant la production de cytokines centrales dans ces mécanismes inflammatoires dans un modèle d'inflammation à bas bruit chez le macaque cynomolgus.

Ce projet sera divisé en deux phases (procédures) : la première permettra de mettre au point le modèle d'inflammation à bas bruit. Pour cela, après une période d'acclimatation suffisante, du lipopolysaccharide purifié (LPS, également appelé endotoxine) sera administré par voie intraveineuse (infusion lente) en très faible concentration à des macaques cynomolgus non naifs afin d'induire une réponse inflammatoire. 6 animaux seront inclus dans cette procédure et répartis en trois groupes de dose différente. Les groupes seront décalés d'une semaine chacun afin de pouvoir adapter la dose en fonction des résultats du groupe précédent. Des prélèvements de sang seront réalisés à différents moments afin de suivre l'évolution hémato-biochimiques des animaux et d'évaluer différentes cytokines. Des mesures de températures, d'ECG et de pression artérielle seront réalisées à plusieurs reprises pour évaluer la réaction physiologique des animaux.

La seconde permettra de tester un vaccin peptidique visant l'interleukine 6 (IL-6) dans ce modèle d'inflammation à bas bruit. Pour cela, l'inflammation sera induite de la même façon (la dose choisie dépendra des résultats de la première procédure), puis le vaccin (ou le véhicule pour le groupe contrôle) sera injecté à trois reprises par voie sous-cutanée sur une période de plusieurs mois. Du LPS sera à nouveau injecté aux animaux afin d'observer l'effet du vaccin, qui devra en théorie "amortir" la réponse inflammatoire, comparée à la première injection. 9 animaux seront inclus dans cette procédure et répartis en deux groupes (groupe test n=6 et groupe contrôle n=3). Des prélèvements de sang seront réalisés à différents moments afin de suivre l'évolution hémato-biochimiques des animaux et d'évaluer différentes cytokines. Le nombre et le moment des analyses et des prises de sang lors de cette seconde étude seront évalués en fonction des résultats de la première procédure.

Réduction :

Ce projet prévoit l'utilisation de 15 macaques cynomolgus issus d'un élevage agréé (6 animaux réutilisés pour la procédure 1 et 9 animaux naifs pour la procédure 2). Le nombre d'animaux utilisés

a été réduit au minimum nécessaire à l'obtention de résultats interprétables et transposables à l'homme. Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés, les 6 animaux utilisés lors de la procédure 1 seront réutilisés d'études antérieures. Une évaluation scientifique des résultats de la procédure 1 mènera ensuite à la décision d'engager ou non la procédure 2, si les expérimentateurs sont confiants dans l'utilité du modèle.

Remplacement :

La preuve d'efficacité in vivo chez l'animal est indispensable à la poursuite du développement de nouvelles thérapeutiques. Afin de valider l'efficacité d'un nouveau vaccin peptidique et avant de le tester chez l'Homme, il est nécessaire de l'évaluer avec un modèle animal pertinent. Dans ce contexte, il est donc judicieux d'utiliser un modèle animal qui mime les mécanismes biologiques observables chez l'Homme. La réaction des macaques à l'injection de LPS en termes de mécanismes inflammatoires est beaucoup plus proche de celle de l'homme que celle d'autres espèces animales, et cette espèce est donc nécessaire pour la mise en place d'un modèle visant des procédés et des niveaux inflammatoires très fins.

Raffinement :

Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux. Le personnel est entièrement formé à la réalisation des actes spécifiques sur le modèle PNH. Le vétérinaire est garant du bien-être des animaux qui seront sous sa responsabilité.

Le design général du protocole vise à maintenir le nombre de gestes expérimentaux au minimum tout en garantissant le succès de l'étude. Le design "en escalier" va permettre de raffiner la dose de LPS à injecter en itérant la dose sur trois groupes distincts, afin d'atteindre une inflammation la plus faible possible tout en restant visible. La sélection de la dose du premier groupe a été basée sur une analyse de la littérature décrivant l'injection de LPS chez l'humain et le macaque, et en calculant une dose théorique visant à obtenir une faible augmentation des niveaux de cytokines chez les animaux. Les analyses des biomarqueurs de l'inflammation vont reposer sur des méthodes avancées, comme la hsCRP qui permet de détecter des niveaux d'inflammation en dessous des seuils de mesure de la CRP classique.

Les animaux seront suivis individuellement et quotidiennement tout au long de l'étude afin de détecter tout signe de douleur et/ou de détresse et de le prendre en charge. Des mesures supplémentaires de températures, ECG et pressions artérielles ont été ajoutées au protocole afin de suivre au plus près la clinique des animaux. Des mesures préventives et correctives de diminution de la douleur et du stress seront également définies, qu'ils soient liés au protocole ou non. L'administration de LPS étant réalisée sur animal vigile placé en siège à contention, pendant une durée de 4h, les animaux seront progressivement habitués à rester calmes en siège à contention grâce à un programme d'entraînement complet défini à l'avance.

Des points limites sont définis pour décider de sortir l'animal de l'étude si des effets inattendus apparaissent. Dans ce cas, le vétérinaire sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés.

À l'issue de la procédure 1, le design de la procédure 2 sera revu afin de ne réaliser que les analyses qui paraîtront nécessaires à l'objectif scientifique (décalage potentiel et réduction du nombre de prise de sang).

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

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

18383 Malgré les avancées dans le traitement des cancers, les patients porteurs de tumeurs cérébrales les plus agressives (glioblastomes) présentent un pronostic très sombre. L'échec des traitements radiothérapeutiques des pathologies cérébrales est principalement corrélé à la radiosensibilité des

tissus cérébraux sains péri-lésionnels qui limite la dose de rayonnement déposable au niveau de la tumeur. Des nouvelles méthodes de radiothérapie expérimentale, à haut débit de dose, fractionnée spatialement ou spatialement homogène, sont développées pour permettre d'augmenter la dose déposée à la tumeur, tout en limitant les effets secondaires au niveau du tissu sain. Nous avons précédemment montré que ces types d'irradiations permettent de ralentir la croissance de tumeurs cérébrales chez le rongeur. Nous avons posé l'hypothèse que ces irradiations permettent de mieux préserver les tissus cérébraux sains qu'une radiothérapie hospitalière, et ce même à long terme. Nous cherchons de plus à déterminer si les réponses biologiques des tissus aux hauts débits de dose sont les mêmes qu'aux débits conventionnels (hospitaliers). Le présent projet consiste à augmenter le nombre d'animaux de certains groupes afin de compléter l'étude et d'augmenter la robustesse des nos précédents résultats en cours d'exploitation.

Remplacement : Le projet portant sur l'étude de la réponse d'organe entier et de tissus complexes (cérébraux), il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique. Réduction : Le nombre d'animaux utilisé a été évalué grâce des méthodes statistiques, ce qui nous a permis de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées. Le nombre minimum d'animaux permettant de réaliser l'expérience sans compromettre les objectifs du projet sera ainsi utilisé. Raffinement : L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance. Dans ces conditions le nombre maximal d'animaux nécessaire à l'intégralité de ce projet est de 32. Aucune procédure expérimentale n'excède un niveau de sévérité de classe modérée.

18384 Notre ADN est une structure linéaire 3D complexe dont les extrémités sont protégées par plusieurs protéines nécessaires pour éviter sa dégradation dans le temps (vieillesse). Parmi celles-ci, une protéine est particulièrement importante car elle serait impliquée dans d'autres phénomènes sans rapport avec la protection de l'ADN: le développement neuronal et le maintien de la santé cellulaire à long terme. Par conséquent, ce projet vise à déchiffrer le rôle de cette protéine dans des processus tels que la formation de la mémoire et le métabolisme, connus pour être altérés au cours du vieillissement.

La compréhension de ces mécanismes pourrait conduire à la découverte de thérapies potentielles contre les neuropathologies liées à l'âge, comme le déclin de la mémoire et le dysfonctionnement métabolique, ainsi qu'à leur prévention.

Une approche expérimentale en conditions physiologiques est nécessaire et indispensable pour valider notre hypothèse concernant le rôle de cette protéine dans le vieillissement neuronal et nécessite l'utilisation d'animaux.

Nous utiliserons des souris de 3 mois pour vérifier notre hypothèse, le nombre de souris nécessaire sera de 320 sur 2 ans.

Les souris recevront un produit inhibiteur des gènes analysés par chirurgie avant de les soumettre, 3 semaines plus tard, à différents tests comportementaux (le test de l'espace ouvert, le test de la boîte noire, le test de la reconnaissance d'un nouvel objet, le test de la reconnaissance de la location d'un objet, le test du conditionnement de la peur dans un contexte spécifique, le test de la piscine de Morris) ou bien à des mesures de métabolisme et de prise alimentaire (consommation oxygène, boisson, nourriture) en utilisant des cages métaboliques.

Pour respecter le principe des 3R (remplacement, raffinement, réduction), le nombre de souris utilisées sera réduit à son minimum (analyses de paramètre multiples pour chaque souris et utilisation de tests statistiques adaptés).

- Remplacement : Pour réaliser les tests de comportement et mesurer le métabolisme, nous devons utiliser des modèles in vivo.

- Réduction : L'étude sera arrêtée si les expérimentations initiales invalident l'hypothèse de travail. Des prélèvements auront lieu pour des analyses histologiques, de biologie cellulaire et moléculaire afin d'extraire le maximum de données de chaque expérimentation. Un nombre minimal et

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

- Raffinement : La chirurgie aura lieu dans un cadre stéréotaxique sous anesthésie générale profonde pour éviter toute douleur et des antalgiques sont prévus en pré et post-opératoire. Pour assurer le bien-être des souris, elles seront placées en cage groupées dans un milieu enrichi. Les souris seront sous surveillance journalière et des points limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

En résumé, ce projet pourrait permettre de conduire au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques ou préventif pour ralentir et limiter les issues du vieillissement neuronal.

18385 La lissencéphalie est une pathologie neuro-développementale entraînant une déficience intellectuelle et un handicap profond. Elle est caractérisée au point de vue anatomique par un cerveau lisse ne présentant pas les circonvolutions habituelles qui permettent son bon fonctionnement.

Cette maladie génétique est causée majoritairement par des mutations dans un seul gène.

Des études récentes ont montré un rôle potentiel de ce gène dans la formation d'un groupe de progéniteurs qui sont considérés comme étant essentiels à la formation des circonvolutions du cortex.

Nous souhaitons dans ce projet tester si les mutations retrouvées chez les patients empêchent ou altèrent la génération de ces progéniteurs spécifiques et conduiraient à l'absence ou à un défaut de formation des circonvolutions pouvant expliquer la formation d'un cerveau lisse.

Pour cela nous allons utiliser une technique de chirurgie permettant de modifier génétiquement une partie des cellules progénitrices du cerveau au cours du développement chez la souris. A l'heure actuelle, il n'existe pas de méthode de remplacement permettant de reproduire in vitro la complexité du cortex en développement, ce qui rend l'utilisation d'un modèle animal indispensable à la réalisation de ce projet. De plus, le cerveau de ces animaux se forme de manière très similaire aux autres mammifères ce qui en fait un très bon modèle d'étude.

Durant les 2 années que dure ce projet nous allons utiliser 8 femelles gestantes et 48 embryons, soit 56 animaux au total.

L'utilisation de l'expérimentation animale pour nos travaux est rendue nécessaire par la complexité de l'environnement cortical qui ne peut pas être recréé par des approches in vitro. Toutefois, ce travail est organisé au maximum dans le respect de la règle des «3R » (remplacer, réduire, raffiner) :

- Remplacer : tous les tests de mise au point des constructions utilisées seront effectués sur des modèles cellulaires in vitro.

- Réduire : nous diminuerons au maximum le nombre d'animaux expérimentés tout en atteignant la significativité statistique.

- Raffiner : nous veillerons en continu au bien-être des animaux par l'utilisation d'analgésiques et d'anesthésiques lors de la procédure opératoire et par un enrichissement de leur environnement dans les cages d'hébergement. Une grille de suivi contenant des points limites détaillés sera mise en place et permettra un suivi quotidien attentif des animaux après la chirurgie. L'atteinte d'un ou de plusieurs points limites entraînera l'euthanasie des animaux concernés.

À terme, les résultats de ces travaux nous permettront de mieux comprendre les mécanismes à l'origine de l'apparition de la lissencéphalie chez l'homme.

18386 Le projet porte sur les leucémies (cancer des cellules de la moelle osseuse et du sang) présentant la mutation d'un gène retrouvée très fréquemment dans les cellules leucémiques. Des études récentes ont montré qu'elle pouvait conférer une sensibilité à différents agents thérapeutiques. Nous nous attacherons à comprendre comment ces traitements agissent sur ces leucémies en particulier et quels sont leurs effets sur la protéine mutante. Les études préalablement menées in

in vitro nous ont fourni des résultats prometteurs pour mieux comprendre ces mécanismes. La poursuite d'études in vivo afin de mieux comprendre les voies d'actions de ces médicaments, d'optimiser leur posologie et de tester leur combinaison demeurent indispensables pour tenter d'améliorer les conditions thérapeutiques, tout en se rapprochant des situations retrouvées chez les patients. Les animaux utilisés seront des souris qui, après irradiation sublétales pour faciliter et homogénéiser la prise de greffe entre individus, seront greffées par injection intraveineuse de cellules leucémiques afin de reproduire la leucémie humaine. Elles seront ensuite traitées ou non par différents agents thérapeutiques administrés quotidiennement sur toute la durée de la procédure soit par voie orale, injections intraveineuses ou intra-péritonéales sur animaux vigiles, soit par implantation d'une capsule-médicament directement sous la peau en une seule intervention. La chirurgie sera réalisée sous anesthésie générale accompagnée d'une analgésie adaptée. Les injections seront réalisées sans anesthésie. Les agents thérapeutiques administrés ont déjà fait l'objet d'études antérieures démontrant l'absence de douleurs associées aux doses utilisées. Ils sont tous déjà utilisés chez les patients en clinique.

Ce projet et la constitution des groupes d'animaux seront réalisés en accord avec la règle des 3R : Nous avons au préalable testé nos molécules d'intérêts ex vivo sur un maximum de modèles cellulaires cultivables en laboratoire (cellules isolées à partir de patients, cellules souches embryonnaires);

Les groupes d'animaux seront réduits au minimum après estimation des effectifs basée sur les données antérieures du laboratoire et une simulation statistique afin de garantir l'obtention de résultats statistiquement recevables. Nous utiliserons au maximum 1546 souris sur les 5 ans que durera le projet.

Les animaux seront hébergés en groupe pour respecter leur comportement grégaire. Nous aurons recours à l'anesthésie/analgésie pour toute intervention le nécessitant. Une grille d'évaluation de leur comportement sera tenue et différents critères seront scorés de façon à définir des points limites de douleur/souffrance suffisamment précoces pour déclencher le recours à l'euthanasie si ces points limites étaient atteints et qu'aucun traitement n'interférant pas avec l'expérimentation menée ne pouvait y remédier.

Les procédures n'excéderont pas 5 mois dans la grande majorité des cas et pourront aller jusqu'à 2 ans lors des quelques expériences de survie après traitement. Les souris seront systématiquement euthanasiées en fin de procédure.

18387 La recherche biomédicale et la compréhension des pathologies humaines ont largement bénéficié des connaissances acquises chez le rongeur (souris), un modèle animal de petite taille et facile à manipuler génétiquement. Plusieurs décennies de recherche en immunologie ont permis d'appréhender dans le détail les étapes du développement des leucocytes, les rôles respectifs des différentes sous-populations lymphocytaires, les mécanismes orchestrant la régulation de l'immunité, ainsi qu'un grand nombre de pathologies humaines – lorsqu'elles peuvent être modélisées dans un modèle murin. Cependant, soixante-cinq millions d'années d'évolution divergente séparent le rongeur et l'Homme, et des différences notables existent entre les systèmes immunitaires de ces deux espèces. De plus, la coévolution des pathogènes humains avec leur hôte induit un tropisme marqué – voire exclusif – pour l'espèce humaine. L'étude de certains pathogènes causant des maladies infectieuses particulièrement dévastatrices chez l'Homme – par exemple les virus de l'immunodéficience humaine, de l'hépatite B et C, ou encore Plasmodium – est par conséquent souvent limitée par l'absence de modèles animaux totalement représentatifs de la situation humaine ou d'un coût raisonnable, lorsqu'ils existent.

Par ailleurs, dans le contexte des pathologies tumorales, les nouvelles immunothérapies, permettant de combattre les tumeurs impliquent les cellules immunitaires humaines qui ont des spécificités propres à l'espèce humaine. De plus, les tumeurs humaines ont des particularités propres à chaque individu et la greffe de tumeur humaine, notamment primaire, dans des souris immunodéficientes reconstituées avec un système immunitaire humain permet d'étudier les interactions système immunitaire/tumeur dans un contexte humain.

Enfin, les limitations techniques ou éthiques empêchant la menée d'études expérimentales prospectives directement chez l'Homme ou même chez des grands primates sont nombreuses, et il existe de fait un besoin pressant pour de nouveaux modèles expérimentaux spécifiquement adaptés à la recherche en immunologie humaine.

Depuis quelques années, l'utilisation de rongeurs humanisés émerge comme une approche particulièrement attrayante pour l'étude in vivo du développement et de la fonction des cellules du système immunitaire humain, que ce soit pour la recherche fondamentale, des études pré-cliniques ou des applications bio-industrielles. Ces modèles doivent notamment permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, définir les biomarqueurs des pathologies humaines étudiées et comprendre les mécanismes fondamentaux de ces pathologies.

Dans le cadre de la présente demande d'autorisation de projet utilisant des rongeurs de laboratoire et s'inscrivant dans la démarche 3R ('Réduction, Raffinement, Remplacement), nous développerons et distribuerons des modèles de rongeurs humanisés pour le système immunitaire et tumorale ('raffinement'), avec une double perspective :

(i) mettre en place une infrastructure de production industrielle permettant de répondre aux exigences réglementaires, tout en maîtrisant au plus près les volumes de production ('réduction' optimisée après plus de 20 ans de développements technologiques) ;

(ii) établir une plate-forme préclinique attrayante et pertinente pour le développement et le criblage de nouvelles approches thérapeutiques, entre autres pour éviter le recours aux primates non-humains (pertinence ; considérations éthiques de 'remplacement' ; coût).

Ces techniques d'humanisation ne présentent que peu d'effets nocifs sur les animaux. Cependant, l'utilisation d'analgésiques adaptés aux rongeurs est effective afin de soulager les animaux dans le cas de souffrances passagères. .

Les rongeurs humanisés générés seront produits dans des conditions permettant leur distribution à d'autres utilisateurs du secteur académiques et du secteur industriel (société de biotechnologie ; prestataires de services en biologie).

Il est prévu de produire en moyenne 7080 animaux par an soit 35400 animaux pour 5 ans.

Outre la valence « réduction » qui est optimisée après plus de 20 ans de développements technologiques, le degré de gravité de procédure associé à ce projet est de niveau « modéré »

18388 Notre projet vise à étudier le rôle d'une protéine donnée au cours du stress métabolique au sens large. Basé sur des résultats préliminaires au laboratoire, nous pensons que notre protéine d'intérêt pourrait avoir un rôle prépondérant dans trois types cellulaires au cours du stress métabolique, l'adipocyte, le macrophage et l'hépatocyte. Basé sur le système CRE-LOX, nous utiliserons des modèles génétiques ou nous délétions spécifiquement notre protéine cible dans chacun de ces types cellulaires. Nous bloquerons aussi son action par l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique (les inflachromènes) sur des souris sauvages C57Bl/6J. Ces souris représentent donc l'unique modèle pour étudier de manière intégrée le rôle de notre protéine d'intérêt dans la progression du stress métabolique associé à l'obésité (principe de remplacement). Un très large panel de challenges nutritionnels sera appliqué régime hyperlipidique (60% ou 45%), régime hyperlipidique déficient en choline, régime cétogénique, mise à jeun, mise à jeun puis renourris. Au cours de ces challenges, nous évaluerons la prise de poids, de masse grasse et l'altération de l'homéostasie glucidique de manière non invasive (MiniSpec, test de tolérance au glucose, pesée etc). Compte tenu de la variabilité des paramètres biologiques généralement observée au sein d'un groupe homogène et de la durée des protocoles, des groupes de 10 animaux seront formés afin de pouvoir mettre en évidence des différences statistiques (principe de réduction). L'étude nécessitera au total 1660 animaux. Les souris devenant obèses après quelques semaines de régime gras, seront hébergées par cage de 3 individus. Les souris soumises à d'autres types de régime n'entraînant pas d'obésité pourront être hébergées par cage de 5 individus. Les lignées sauvages et transgéniques de souris utilisées dans cette étude, sont toutes sur fond génétique C57Bl/6J, classiquement utilisée dans les études du métabolisme, dont les mâles répondent très bien au régime gras notamment. Les procédures seront réalisées dans le respect du bien être animal, sous

anesthésie lorsque nécessaire pour limiter la souffrance, la douleur ou l'angoisse des animaux, et en respectant des points limites préalablement définis (principe de raffinement).

18389 Des défauts génétiques du gène Nod2 ont été associés avec le développement de la maladie de Crohn (MC) qui reste un enjeu socio-économique et médical croissant au sein des pays industrialisés et tout particulièrement dans le Nord-Ouest de la France. Le gène Nod2 code pour un récepteur aux bactéries particulièrement exprimé au sein des cellules phagocytaires.

Nos travaux récents mettent en exergue des perturbations de la flore intestinale en absence du gène Nod2 à l'origine d'un risque accru d'inflammation et de tumorigénèse intestinale chez la souris. Cependant, cet équilibre complexe avec la flore intestinale fait intervenir des mécanismes encore largement non élucidés.

Dans ce contexte, nous suspectons un rôle déterminant de l'expression monocytaire de Nod2 sur les relations mutualistiques avec la flore intestinale, ainsi que l'implication de Nod2 sur la fonctionnalité des monocytes sanguins recrutés sur le foyer inflammatoire. En effet, le compartiment macrophagique représente une des sous-populations leucocytaires les plus abondantes dont le renouvellement est continuellement assuré par les monocytes circulants.

Notre intention est d'apporter une meilleure compréhension des mécanismes par lesquels l'expression monocytaire de Nod2 contrôle les relations mutualistiques avec la flore intestinale en combinant la technologie Cre-Lox à des modèles précliniques d'inflammation et de tumorigénèse intestinale. Pour cela, un programme de recherche a été élaboré en trois volets pour permettre :

1. identifier la (les) populations phagocytaires par laquelle (lesquelles) NOD2 limite la réponse inflammatoire et la progression tumorale tout en favorisant la régénération épithéliale.
2. définir les mécanismes par lesquels Nod2 conditionne le recrutement et la fonctionnalité des monocytes sanguins recrutés au cours de l'inflammation et de la tumorigénèse intestinale.
3. évaluer l'effet anti-inflammatoire et anti-cancéreux d'injection de cellules mononucléées (monocytes ou précurseurs de cellules dendritiques conventionnelles) exprimant NOD2.

Les expériences de ce projet impliqueront un maximum de 2480 souris. Un suivi strict des souris sera effectué par du personnel formé et habilité. Il est à noter aussi que préalablement aux expériences sur animaux, des études in vitro et in vivo ont permis de définir les méthodes de raffinement (utilisation de l'endoscopie pour évaluer la progression tumorale et le moment optimal pour l'autopsie) et de réduction (par une analyse multiparamétrique sur chacune des souris).

Outre ces aspects fondamentaux sur la compréhension du mutualisme entre l'hôte et le microbiote, les connaissances apportées par ce projet permettront d'envisager des approches thérapeutiques plus efficaces pour lutter contre la maladie de Crohn et le cancer colorectal qui reste un enjeu socio-économique et médical croissant.

18390 La vaccination est la stratégie la plus efficace pour la prévention des maladies infectieuses chez les animaux d'élevage. L'ampleur, la qualité et la durée de la réponse des anticorps aux vaccins varient selon le vaccin et entre les individus. On en sait peu sur les mécanismes sous-jacents, qui impliquent de multiples facteurs, notamment l'âge, le sexe, l'état de santé, la génétique de l'hôte et le microbiote. En outre, le microbiote intestinal joue un rôle crucial dans le développement et la régulation du système immunitaire et, par conséquent, sa composition pourrait affecter la réponse des individus aux vaccinations. L'identification des marqueurs prédictifs d'une grande réactivité à la vaccination sera cruciale pour les programmes de sélection. Combiner la sélection génétique pour une efficacité vaccinale plus élevée avec des stratégies nutritionnelles visant à moduler le microbiote intestinal en favorisant la réponse immunitaire de l'hôte pourrait être d'autant plus efficace. Dans ce projet, nous étudierons les effets combinés des variations génétiques de l'hôte et de la composition du microbiote sur la réponse immunitaire de l'hôte d'animaux vaccinés avec un virus inactivé (virus de la maladie de Newcastle), afin d'identifier des biomarqueurs prédictifs de l'ampleur de la réponse à la vaccination. Pour ce faire, nous analyserons l'influence du microbiote intestinal précoce (en altérant fortement le microbiote par l'ingestion d'antibiotiques avant la vaccination) sur les réponses immunitaires à la vaccination chez les animaux répondeurs faibles ou

élevés. Enfin, à terme ce projet fournira des biomarqueurs issus de la description du microbiote ou de l'immunité prédisant la réponse vaccinale chez les poules pondeuses. L'expérience préliminaire décrite dans ce document permettra de tester deux modèles d'ingestion d'antibiotiques pour altérer la composition du microbiote intestinal et, de ce fait, la réponse vaccinale à un vaccin contre le virus de la maladie de Newcastle. Elle nous permettra aussi d'identifier les dates optimales de prélèvement pour le suivi de la réponse vaccinale et l'évaluation de paramètres immunitaires, afin d'optimiser l'application de la règle des 3R dans une expérimentation de plus grande ampleur. Un objectif secondaire de cette expérience pilote sera également d'évaluer l'intérêt de mesurer de nouveaux paramètres immunitaires juste après la vaccination en comparant un lot d'animaux non traités vaccinés avec un lot d'animaux non vaccinés en vue d'expérimentations à plus grande échelle. L'effectif total de poulettes utilisées pour le projets est 204.

Respect de la règle des 3R :

- Remplacer : Pour évaluer l'effet des variations génétiques et du microbiote intestinal sur la réponse vaccinale il faut disposer de mesures individuelles sur les animaux. Par ailleurs le statut immunitaire et la réponse vaccinale impliquent des voies physiologiques dans l'organisme entier. Le modèle le plus adapté pour évaluer les effets sus-mentionnés sur le poulet est donc le poulet lui-même.

- Réduire : Le nombre d'animaux nécessaire à la réalisation de cette expérience a été déterminé suite à estimations basées sur la littérature publiée sur l'effet de l'ingestion d'antibiotiques sur la composition du microbiote et sur les résultats de nos propres expérimentations visant à étudier le microbiote intestinal. Enfin cette expérimentation est elle-même un moyen d'optimiser le nombre d'animaux à étudier lors d'une expérimentation de plus grande ampleur, sur la base de la variabilité des paramètres mesurés.

- Raffiner : Les poussins sont élevés en parquets collectifs, avec des enrichissements du type ficelles, balles en plastique, bloc à piquer. Ils seront visités 2 fois par jour et toute manifestation de symptômes persistants tels que définis dans le point limite engendrera la mise à mort des animaux par le personnel qualifié. Les animaux seront manipulés par des personnes qualifiées, notamment pour les prises de sang.

18391 Le coronavirus nommé «SARS-CoV-2» est à l'origine d'une pneumonie atypique pouvant être mortelle. En janvier 2021, plus de 2 millions de personnes sont décédées de cette infection. Les premiers vaccins, basés majoritairement sur l'induction d'anticorps dirigés contre la protéine d'enveloppe du virus provenant de Wuhan en Chine, viennent d'être autorisés. Les anticorps générés par la vaccination sont capables de neutraliser le virus mais pas de détruire les cellules infectées. Par ailleurs, des virus variants portant des mutations sur la protéine d'enveloppe commencent à émerger. Les anticorps induits par les premiers vaccins ne neutralisent pas totalement ces nouveaux variants et pourraient donc à terme ne plus protéger de l'infection par ces nouveaux virus mutants.

Le but de ce projet est donc de trouver une stratégie vaccinale plus globale qui permettra de neutraliser tous les virus variants. Pour cela, nous allons utiliser une technologie qui a déjà fait ses preuves dans des essais précliniques et qui mise sur l'induction d'une réponse cellulaire capable d'éliminer les cellules infectées. Cette technologie, basée sur des petits fragments de protéines que l'on émulsifie avec un adjuvant, permet de cibler en même temps plusieurs protéines du virus tout en s'affranchissant des mutations qui pourraient intervenir au cours du temps. Un vaccin induisant une réponse cellulaire contre des fragments de protéines conservés chez les coronavirus aura également l'avantage de pouvoir protéger contre un large éventail de coronavirus. Pour démontrer l'efficacité de ce vaccin, nous utiliserons une lignée de souris qui mime les réponses immunitaires induites chez l'homme. Par contre, la souris de type sauvage n'est pas naturellement infectable par le SARS-CoV-2. Afin d'évaluer la protection contre ce virus, les souris seront donc prétraitées par un vecteur adénoviral codant pour le récepteur humain du SARS-CoV-2.

Dans une première procédure de sévérité légère incluant 20 souris mâles et femelles adultes, nous validerons l'induction d'une réponse cellulaire par notre vaccin. Une deuxième procédure de sévérité modérée sur 360 souris adultes des deux sexes nous permettra d'évaluer l'effet protecteur

des vecteurs vaccinaux sélectionnés contre l'infection par la souche originale du coronavirus SARS-CoV-2 et contre ses variants.

Ce projet a été conçu dans le respect des règles de 3R comme suit :

Remplacer: Aucun modèle in vitro ne permet à ce jour d'étudier la vaccination contre cette infection.

Réduire: Pour calculer la taille des groupes d'animaux infectés par le SARS-CoV-2, nous avons utilisé les données statistiques types d'expériences antérieures. Nous avons planifié d'inclure le nombre minimal d'individus/groupe expérimental qui permettra une analyse statistique pertinente et concluante basés sur des tests statistiques appropriés, recommandés par un expert en bio-statistiques. Afin de limiter le nombre de souris, les peptides inclus dans les vaccins ont été sélectionnés grâce à des programmes informatiques. Le nombre estimé d'animaux utilisés dans ce projet est de 380 souris, inclus dans 2 procédures expérimentales sur une période de 5 ans.

Raffiner: Les souris de type sauvage sont relativement résistantes à l'infection SARS-CoV-2. Par contre, elles peuvent être rendues susceptibles à l'infection grâce à un prétraitement qui n'induit pas de pathologie notable. Aucun dommage pour les animaux n'est donc attendu. Cependant, certains signes cliniques ont été définis comme points limites. Les animaux seront mis à mort s'ils atteignent ces points limites. La cage des animaux comportera, comme élément d'enrichissement, du coton dentaire pour que les animaux puissent construire un nid.

Les expériences ne nécessitent aucune médication et seront réalisées par des expérimentateurs formés.

18392 La formation initiale et continue des personnes qui interviennent en médecine vétérinaire et en recherche animale, qu'il s'agisse des étudiants vétérinaires ou des soigneurs, techniciens et concepteurs qui utilisent des animaux à des fins scientifiques nécessite l'apprentissage de gestes techniques pour manipuler les animaux ou pratiquer les expériences dans de bonnes conditions.

Après avoir appris les bases par des méthodes alternatives comme les vidéos, les mannequins ou les pièces anatomiques, les apprenants ont besoin de pratiquer ces gestes chez un animal vivant pour acquérir un geste efficace sans stress ni pour l'animal, ni pour l'opérateur.

Les formations prévues dans ce projet portent sur des actes techniques peu ou pas invasifs tels que la contention, l'administration de substances (liquide physiologique puis si besoin anesthésique et/ou analgésique), les prélèvements sanguins sur animal vigile ou anesthésié ou la pose de cathéter et sur actes techniques plus invasifs sur animaux anesthésiés et sous couverture analgésique telles que les incisions et sutures cutanées, les cathétérismes veineux ou les intubations (procédure 2).

Les techniques enseignées respectent l'état de l'art, et en particulier les recommandations publiées par les associations professionnelles.

Les formations respectent les 3R en intégrant toujours une partie de simulation, de démonstration par vidéo ou d'utilisation de pièces anatomiques (Remplacement) et en réduisant au minimum le nombre d'animaux selon les besoins de la formation et le nombre de stagiaire (Réduction). La réduction du nombre d'animaux est également permise par la réutilisation d'animaux d'étude et la réutilisation d'animaux d'une formation à une autre pour les chiens ; cette réutilisation n'est possible qu'après avis vétérinaire et avis de la SBEA. Le principe de raffinement est respecté de plusieurs manières : hébergement des animaux en groupes sociaux, en fonction de leurs besoins éthologiques, avec enrichissement adapté ; période d'acclimatation respectée à l'arrivée des animaux ; anesthésie locale et systémique ; ratio enseignant/stagiaire élevé ; fiche de suivi des animaux pour respecter des temps de repos entre les formations.

Au total sur 5 ans, tous programmes de formation confondus, nous estimons que nous utiliserons 250 souris, 250 rats, 50 lapins, 5 porcs et 30 chiens. Toutefois le nombre de chiens peut être inférieur puisque ce sont des animaux que nous possédons au sein d'un effectif permanent, que nous gardons plusieurs années pour les travaux pratiques peu invasifs puis qui sont adoptés par des particuliers.

18393 L'étude d'un gène humain que ce soit sur le plan fondamental ou dans le cadre d'une pathologie humaine nécessite la validation de son mode d'action dans un contexte physiologique proche de celui de l'Homme. De la même façon, la mise au point de médicaments requiert des études approfondies ainsi que de nombreuses validations (toxicologiques par exemple) in vivo. Les modèles transgéniques souris et rat (selon l'étude) représentent aujourd'hui une étape indispensable qui répond aux nécessités scientifiques et/ou légales (dans le cas de médicament) d'étude ou de validation.

Le projet vise à générer des modèles de recherche sur mesure pour les laboratoires de recherche académiques et privés.

Les modèles de recherche décrits dans ce projet sont des rongeurs génétiquement modifiés

L'ensemble des animaux nécessaire pour la création de ces modèles est inclus dans ce projet, aussi bien les reproducteurs que leur descendance à phénotype dommageable. Cela représente au maximum un total de 44040 souris et 2752 rats pour 5 ans.

La réalisation de génotypage des animaux est une étape non invasive. Une petite partie des animaux fait l'objet d'une procédure chirurgicale invasive (réimplantation d'embryons pour les femelles et castration pour les mâles).

A ce jour l'utilisation de modèles animaux transgéniques, bien que complétée par des techniques in vitro, est indispensable à l'étude du mode d'action des gènes. En effet les mutations génétiques engendrent des modifications biologiques et physiologiques complexes qui ne peuvent être étudiées que sur des êtres vivants.

Le nombre d'animaux utilisé est réduit au minimum nécessaire. La très grande maîtrise aussi bien des modèles transgéniques que des techniques de reproduction et de transgénése permettent de réduire à la fois le nombre de reproducteurs nécessaires ainsi que le nombre de descendants (3R).

Enfin, en ce qui concerne le raffinement, les animaux sont hébergés dans des cages avec enrichissement et en groupes stables chaque fois que cela est possible. L'ensemble des chirurgies réalisées sont parfaitement maîtrisées et réalisées sous anesthésie générale.

18394 La pollution atmosphérique contribue au développement de pathologies cardio-respiratoires et au cancer du poumon. Un des composants majeurs de cette pollution atmosphérique sont les particules fines en suspension dans l'air. Du fait de leur finesse, ces particules fines sont capables de pénétrer profondément dans l'appareil respiratoire.

Des données scientifiques montrent un lien direct entre la pollution atmosphérique et les infections respiratoires par le virus de la grippe.

Notre objectif dans ce protocole sera d'étudier si une exposition aux particules fines de l'air de Paris modifie les réponses de l'hôte contre le virus de la grippe et favorise une infection par le virus de la grippe. Nous étudierons aussi l'efficacité de la N-acétylcystéine (un médicament utilisé en clinique) pour réduire les effets des particules atmosphériques sur la réponse des cellules immunitaires qui nous aident à lutter contre le virus de la grippe.

D'un point de vue pratique, des souris seront traitées par voie respiratoire avec des particules fines recueillies à partir de l'air de Paris ou avec des particules fines de carbone commercialisées. Ces traitements seront effectués sur des animaux anesthésiés. Nous allons effectuer les instillations des particules par voie respiratoire afin de favoriser la distribution des particules au niveau des poumons. Nous allons traiter les souris une fois ou trois fois (à trois jours d'intervalle) avec les particules, pour modéliser soit une exposition unique, soit une exposition répétée aux particules environnementales. Par la suite, nous analyserons les conséquences de l'exposition aux particules sur l'activité des cellules immunitaires (macrophages, lymphocytes) et l'inflammation des poumons à 1 jour, 2 jours, 4 jours ou 15 jours après le traitement afin de voir les effets des particules à court terme et à long terme. Un groupe de souris sera traité avec le médicament (la n-acétylcystéine) par voie intrapéritonéale, pour contrer les éventuels effets des particules. L'injection en intrapéritonéale est un geste non douloureux qui ne nécessite pas d'anesthésie. Pour certains groupes de souris, les souris seront infectées par le virus de la grippe par voie intranasale un jour après le dernier

traitement aux particules, et euthanasiées 4 jours, 8 jours ou 14 jours après infection. Des analyses sur l'activation des cellules immunitaires et les charges virales seront effectuées, après infection, aux jours indiqués. Un prélèvement sanguin à l'œil est prévu avant euthanasie sur des souris infectées par le virus de la grippe pour étudier la production d'anticorps dirigés contre le virus.

Dans ce projet, l'ensemble des expérimentations a été mis au point afin de respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement (règle de 3R) pour permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal.

Par rapport au remplacement, la mise en place d'une réponse immunitaire induite par une exposition aux particules environnementales ou par une infection virale est un ensemble de processus complexes qui ne peuvent pas être récapitulés *in vitro*. Nous utilisons donc un modèle de souris qui est un animal utilisé dans les laboratoires de recherche et qui permet l'utilisation de nombreux outils disponibles pour l'exploration immunologique du modèle (mesure de la production d'anticorps, recrutement et activation de cellules immunitaires). De plus, l'infection par voie respiratoire du modèle souris fait intervenir de nombreux mécanismes physiopathologiques rencontrés dans l'infection humaine que nous ne pouvons pas reproduire par des techniques *in vitro*.

Nous avons estimé un nombre de 504 animaux pour les 5 années de durée du projet. Ce nombre a été calculé pour avoir 6 souris par groupe expérimental avec des expériences de 6 groupes (36 souris par expérience).

Pour ce qui concerne le raffinement, les souris seront hébergées dans des cages propres (2-6 souris par cage) sur portoir ventilé dans une salle réservée à l'hébergement de souris. Une observation journalière sera assurée par le personnel animalier. Comme mesure d'enrichissement de l'environnement de la cage nous mettrons du coton. Une période d'acclimatation (d'au moins 7 jours) sera respectée avant le début du protocole. L'administration des particules par voie respiratoire et le prélèvement du sang au niveau de l'œil seront effectués sous anesthésie générale (mélange d'anesthésique et antidouleur) pour réduire la douleur et la souffrance des souris. Suite au prélèvement du sang, l'animal sera euthanasié pour l'analyse de l'activité des cellules immunitaires. Pour les infections par voie respiratoire, les souris seront soumises à une anesthésie légère gazeuse et de courte durée pour assurer une respiration calme et ample et favoriser une distribution du virus homogène et reproductible dans les poumons.

Le raffinement sera aussi assuré par une surveillance quotidienne des animaux par le personnel de l'animalerie et un suivi clinique assuré par l'expérimentateur deux fois par semaine après administration des particules, puis quotidien à partir de 4 jours après l'infection car les infections par les virus respiratoires de notre étude entraînent une perte de poids progressive de la souris notamment 6 jours après l'infection. Pour le suivi clinique, les souris seront observées et pesées. Une feuille de suivi de procédures sera disponible à l'animalerie pour suivre les procédures. Cette feuille sera signée par l'expérimentateur à chaque acte réalisé sur la souris. Un numéro de téléphone de contact sera disponible sur la feuille.

Tous les gestes nécessaires à la réalisation de ce projet seront faits sur des animaux anesthésiés sauf l'injection en intrapéritonéale.

Ce protocole inclut des points limites qui seront évalués pendant le suivi clinique à l'aide d'une grille de score. Si le score limite est atteint, les animaux seront euthanasiés. A la fin de chaque procédure, les souris seront euthanasiées pour l'analyse de l'activité des cellules immunitaires.

18395 * Contexte de la recherche

Dans le domaine de la cancérologie de la face et du cou, nous sommes souvent amenés à utiliser du matériel de reconstruction osseuse pour stabiliser l'os de la mâchoire après que nous ayons dû en retirer une partie, souvent atteinte par le cancer. Ce matériel se présente sous la forme de petites plaques qu'on peut visser directement sur l'os amputé afin de solidifier à nouveau la mâchoire. Il s'agit d'un matériel utilisé aussi fréquemment en neurochirurgie, dans le cadre de malformations ou de déformations de la voûte crânienne. Actuellement, ces petites plaques ne sont fabriquées que d'un seul matériau, le plus souvent un métal (le titane ou des alliages à base de titane) ou un polymère. Un polymère est un matériau léger, composé d'un enchevêtrement de grosses

molécules. Pour être optimal, un matériau dans lequel nous fabriquons du matériel de reconstruction osseuse doit être biocompatible (c'est à dire qu'on doit pouvoir l'implanter sans que le corps le rejette) et doit avoir des caractéristiques les plus proches possibles de celles de l'os. Ces caractéristiques sont par exemple la flexibilité ou la solidité. C'est le problème des matériaux qu'on utilise actuellement, qui, bien que biocompatibles, présentent des caractéristiques différentes de celles de l'os. Cela est à l'origine de problèmes limitant les chances de succès de la reconstruction osseuse. Les matériaux sandwich, qui sont composés d'une couche de polymère enfermée entre deux couches de titane sont très utilisés dans l'industrie aéronautique. Ils sont intéressants car en faisant varier les épaisseurs des couches en question, on peut faire varier les caractéristiques du matériau et ainsi se rapprocher le plus de celles de l'os : c'est pourquoi nous avons mis au point une technique permettant de fabriquer des matériaux sandwich biocompatibles.

* Résumé de la recherche

Le but de cette recherche est de tester chez le rat ces plaques de reconstruction mandibulaire et crânienne composées de ce nouveau matériau sandwich innovant. Cette étude sera effectuée sur 36 rats adultes Wistar Han de 400 grammes environ. La moitié d'entre eux, soit 18 rats, bénéficiera de l'implantation du matériau au niveau de la voûte crânienne, ainsi qu'au niveau de la mandibule qu'on aura auparavant sectionné en deux, pour reproduire une facture ; l'autre moitié, soit 18 rats bénéficiera de l'implantation de plaques de titane (le matériau utilisé actuellement auquel nous souhaitons comparer le nouveau matériau) au niveau de la voûte crânienne et de la mandibule. Nous surveillerons ensuite les rats pendant 3 mois au cours des quels nous observerons leur tolérance au matériel récemment implanté. Toutes les mesures nécessaires seront prises pour assurer le bien-être des rats. Les rats bénéficieront d'examens d'imagerie qui nous serviront à mieux évaluer l'efficacité du matériel. A la fin de l'étude nous réaliserons des analyses sur l'os des zones opérées. Si le matériau est aussi efficace que le titane conventionnel, il sera considéré comme prometteur.

* Application de la règle des 3R

1) Remplacement

Malgré des tests in vitro du matériau qui se sont révélés prometteurs, les tests de compatibilité et d'intégration ne peuvent être faits que sur l'animal avant une implantation chez l'homme. Le choix de l'espèce se porte sur le rat, un animal chez qui de les procédures expérimentales d'intérêt dans notre étude ont déjà été décrites avec succès.

2) Réduction

Le nombre d'animaux choisi est basé sur un test statistique permettant d'utiliser le plus faible nombre d'animaux en ayant des résultats valides. Les modèles d'implantologie crânienne et de mandibulectomie sont décrits chez le rat. De plus, nous avons choisi de réaliser les procédures au niveau de la voûte crânienne et de la mandibule chez les mêmes rats, plutôt que d'utiliser deux groupes de rats, ce qui nous permet de réduire de 50 % le nombre d'animaux utilisés.

3) Raffinement

Dans le cadre du respect du bien-être animal, les cages seront conformes à la réglementation et les rats seront deux par cage, afin de respecter le besoin d'interaction sociale de cette espèce, tout en limitant le risque de rixe et d'ouverture des plaies chirurgicales. Les cages seront stockées sur des étagères ventilées dans une salle dont la pression, l'humidité et la température seront contrôlées. Les rythmes nycthémeraux seront respectés et les cages seront changées deux fois par semaine. Un enrichissement des compartiments sera réalisé en ajoutant des cachettes, du papier et du coton afin de permettre la nidification. Les croquettes des rats seront humidifiées et placées dans des coupelles au sol pour faciliter leur alimentation après cette chirurgie mandibulaire. Avant toute procédure, une période d'acclimatation de deux semaines sera respectée à la réception des animaux et ils seront manipulés plusieurs fois avant l'opération afin de les habituer aux manipulateurs. L'intervention chirurgicale sera effectuée sous anesthésie générale à l'isoflurane et l'efficacité de cette dernière sera évaluée par absence de réflexe de pincement aux pattes. Une analgésie sera mise en place pendant la chirurgie ainsi qu'en post-opératoire sur cinq jours au moins afin de limiter la douleur. Les points limites seront une perte de poids supérieure à 20 % par

rapport au poids initial et ce malgré une prise en charge adaptée, une exposition de l'implant, un défaut de cicatrisation supérieur à 50 %, un écoulement oculaire, une léthargie, une posture cambrée, un déséquilibre à la marche ou toute autre difficulté de déplacement, des difficultés de comportement comme par exemple pour le toilettage. Si l'un de ces symptômes venait à apparaître, l'animal sera euthanasié après une anesthésie générale.

* Enjeux en matière de cancérologie et de santé publique

L'utilisation de plaques conçues à partir d'un tel matériau présente de nombreux avantages par rapport aux plaques qu'on utilise actuellement, du fait de leur plus grande proximité avec l'os. De ce fait, cela se traduirait par un bénéfice direct pour nos patients en cancérologie orale chez qui nous implantons régulièrement de telles plaques pour stabiliser un os amputé ou reconstruit. Par ailleurs, les applications de ce matériau s'étendent au-delà du domaine de la cancérologie, notamment dans les domaines de la traumatologie et de la reconstruction des malformations faciales ou crâniennes.

18396 Les syndromes myéloprolifératifs sont un ensemble de maladies chroniques du sang. On distingue trois grandes formes de pathologies: la polyglobulie de Vaquez (PV), la thrombocythémie essentielle (TE), la myélofibrose primaire (MFP).

L'âge médian du diagnostic de ces troubles varie entre 60 et 67 ans. La PV est plus fréquente chez les hommes (H) que chez les femmes (F), sont touchés 0. 4-2. 8 pour 100 000 personnes par an. La TE est plus fréquente chez les femmes, sont touchés 1 et 2. 5 pour 100 000 personnes par an. La myélofibrose quant à elle touche 0. 8 à 2. 1 pour 100 000 personnes par an.

Plus de 95% des patients atteints de ces troubles sont porteurs de la mutation activatrice JAK2 V617F. D'autres altérations moléculaires de ce gène sont décrites ainsi que des mutations dans le gène de la calréticuline (CALR). Les patients présentent une réduction de leur espérance de vie. Leur décès est souvent lié à des hémorragies, des événements thromboemboliques ou à une leucémie (cancer du sang).

Bien que plusieurs approches thérapeutiques soient actuellement disponibles pour les patients, elles n'empêchent pas l'évolution de ces pathologies, indiquant que de nouvelles thérapies sont nécessaires. D'autre part, en raison de l'hétérogénéité des signes cliniques des patients et de leurs réactions aux traitements, les approches thérapeutiques potentielles sont difficiles à évaluer. Par conséquent, des modèles murins mimant les syndromes myéloprolifératifs ont été générés. Plusieurs études ont montré qu'il s'agit de modèles représentatifs des syndromes myéloprolifératifs humains, de sorte que la recherche de cibles thérapeutiques potentielles et l'étude des mécanismes de l'hémostase et de la thrombose à l'aide de ces modèles est justifiée dans le développement de cette recherche translationnelle. L'avantage de ces modèles physiologiques est de pouvoir modifier génétiquement les cellules sanguines et d'analyser les réponses du système circulatoire ou des différents organes. Il reste en effet impossible de par de simples méthodes de culture cellulaires de mesurer l'impact de thrombose sur le cerveau ou le cœur.

L'objectif du présent projet est de maintenir en élevage et de produire des lots expérimentaux de souris, modèles de syndromes myéloprolifératifs avec ou non une mutation additionnelle susceptible d'apaiser leur phénotype. Les animaux générés dans ce projet seront destinés à l'étude de traitements contre ces pathologies sanguines. Afin de satisfaire au raffinement, l'hébergement des animaux sera réalisé dans des locaux appropriés, avec un enrichissement systématique des cages (bâtons de bois à ronger et matériel de nidification) et un personnel habilité qui réalisera les différentes procédures en respectant les règles d'éthiques, le bien-être animal et le principe des 3R. Nos surveillances quotidiennes nous permettront d'identifier d'éventuels rats en souffrance et de prendre les mesures nécessaires (surveillance accrue, mise à mort dans les cas les plus graves). Pour pouvoir constituer les lots requis pour ces études, nous estimons qu'est nécessaire sur 5 années de recherche un total de 269 811 animaux, dont 66 947 seront des modèles in vivo mimant les troubles myéloprolifératifs.

18397 L'objectif de ce projet est de produire un médicament recombinant à usage humain à partir de lait de lapines. L'AMM définit le protocole de production du médicament et fige les modalités d'obtention de la matière active.

Les lapines utilisées pour ce projet, sont porteuses d'un gène leur permettant de produire une protéine thérapeutique dans leur lait. Elles sont traitées régulièrement (sur une période de 3 semaines) et la protéine d'intérêt est purifiée. Comme dans une production laitière classique, les animaux nés permettent d'induire et de maintenir la lactation mais n'ont pas vocation à être maintenus en production. Ainsi, à la fin des 3 semaines de traite, ces lapereaux sont euthanasiés.

550 femelles reproductrices par an donc 2750 sur 5 ans seront utilisées pour ce projet. Ce nombre peut varier car il est déterminé en fonction du nombre de litres de lait à fournir donc en fonction de la demande du fabricant du médicament. Environ 130050 lapereaux seront euthanasiés à la fin des campagnes de traite et environ 2000 animaux seront utilisés dans le cadre du renouvellement des différents cheptels.

Le recours au lapin en tant que bioréacteur a été évalué pendant la phase de développement. La lapine est dotée d'une glande mammaire qui possède toute la machinerie cellulaire permettant d'apporter les modifications post-traductionnelles nécessaires à l'activité biologique des protéines recombinantes humaines.

La mise en oeuvre de la règle des 3R est suivie de la manière suivante :

Réduction : depuis le début de cette activité, les méthodes de production ont constamment été améliorées et continuent de l'être afin d'obtenir la plus grande quantité de matière active par animal et donc de limiter le nombre de sujets utilisés.

Remplacement : A ce jour, il n'y a pas de modèle alternatif au lapin pour la production de cette protéine thérapeutique.

Raffinement : les animaux sont hébergés dans des cages adaptées, respectant les normes de bien-être animal, et bénéficient d'un enrichissement. Une surveillance quotidienne des animaux par des personnes expérimentées et formées est réalisée et est suivie via des fiches.

De plus, pour la prise en compte et l'évaluation de la souffrance animale, une grille de points limites a été mise en place. Elle permet de stopper l'expérimentation sur tout animal ayant dépassé le seuil de point limite.

18398 L'impératif d'une aquaculture durable conduit à orienter l'alimentation des poissons vers la substitution de la farine de poisson par des farines végétales. Toutefois, ce remplacement est limité par des niveaux trop faibles en acides aminés (AA) dans les matières premières végétales, tels que la lysine et l'arginine. S'agissant d'AA essentiels, qui ne peuvent être synthétisés par l'organisme, leurs suppléments en quantité adéquate dans les aliments composés de farine végétale permettent d'assurer la croissance des salmonidés sans pour autant pallier totalement le retard de croissance observé. Particulièrement concernée par cette problématique, de par son régime carnivore stricte, la truite arc-en-ciel fait l'objet de nombreuses études en ce sens afin de pérenniser l'élevage de cette espèce.

L'analyse approfondie d'articles précédemment publiés, nous a amenés à proposer l'hypothèse selon laquelle des différences de biodisponibilités entre les AA dits « libres », apportés sous forme purifiée, et ceux dits « liés », provenant de la digestion de la fraction protéique de l'aliment, pourraient engendrer un déséquilibre au niveau de l'intestin et perturber ainsi leur absorption notamment du fait de défauts dans l'activité de certains transporteurs d'AA. In fine, les AA libres seraient moins bien absorbés par l'organisme ce qui conduirait à une moins bonne croissance des poissons. Afin d'étayer notre hypothèse, et en parfaite adéquation avec la règle des « 3R », nous avons initié des expérimentations in vitro, à l'aide de cultures de lignées cellulaires, dont les résultats préliminaires obtenus jusqu'à présent valident cette hypothèse. Ainsi, nous montrons qu'un déséquilibre en arginine et/ou lysine induit une perturbation de l'expression des certains transporteurs d'AA, dont les conséquences fonctionnelles conduisent à la diminution de l'activité d'une protéine clef dans la prolifération cellulaire et la croissance des organismes, à savoir la protéine mTOR (pour « mechanistic Target Of Rapamycin »). Un des transporteurs a

particulièrement retenu notre attention : le transporteur d'AA cationiques (TAAC) appelé y+LAT2, dont le gène correspondant est très fortement dérégulé par le déficit en arginine et/ou lysine, et qui présente la particularité de prendre en charge le transport d'AA cationiques en échange d'un AA neutre. Au vu des caractéristiques du transporteur y+LAT2, nous pensons que le défaut de croissance des truites nourries avec des régimes à base de végétaux pourrait être corrigé si un AA neutre supplémentaire (telle que la glutamine) était apporté sous forme libre afin de stimuler l'absorption des AA cationiques libres.

L'objectif de cette étude sera donc d'évaluer la validité de cette hypothèse, mais cette fois-ci, in vivo sur des truites arc-en-ciel. Au-delà de l'amélioration que notre hypothèse pourrait apporter à l'élevage de la truite arc-en-ciel, cette étude ambitionne de promouvoir l'utilisation de techniques dites in vitro afin de « pré-tester » des hypothèses de façon simple, reproductible et efficace mais surtout en parfaite adéquation avec la nécessité de limiter, à la portion congrue, les expérimentations animales.

Pour cela, 405 truites juvéniles (env. 40g) seront distribuées dans 15 bassins (27 truites/bassin), c'est-à-dire une biomasse d'élevage classique. Les poissons seront nourris pendant 12 semaines avec 5 aliments différents (3 bassins/aliment): le premier, de type commercial (constitué de farines et huiles de poissons), représentera le contrôle positif qui nous permettra de mesurer notamment, pour la première fois, les taux d'expressions des différents TAAC dans des tissus de poissons nourris de façon optimale. Le second aliment sera formulé sur la base d'un régime constitué à 100% de protéines végétales et dénommé Vegan 0. Ce régime, déficient en arginine et lysine, représentera un des deux contrôles négatifs indispensables à l'analyse et l'interprétation des résultats. Le 3ème aliment reprendra la formulation du régime Vegan 0 auquel nous ajouterons de la glutamine (l'acide aminé neutre susceptible de stimuler l'absorption des AA cationiques libres supplémentés). Cet aliment, nommé Vegan Q, constituera le second contrôle négatif de cette expérience, indispensable à l'analyse et l'interprétation des résultats de cette expérience. Le 4ème aliment reprendra également la formulation du régime Vegan 0 auquel nous ajouterons de l'arginine (R) et de la lysine (K) afin de couvrir les besoins théoriques de la truite. Cet aliment (nommé Vegan RK) représente l'aliment dont nous recherchons actuellement à améliorer les propriétés nutritionnelles à travers la formulation du 5ème et dernier aliment. Celui-ci, nommé Vegan RKQ, sera formulé sur la base du régime Vegan RK, lequel sera supplémenté de Glutamine (Q) dont nous cherchons à évaluer la capacité à stimuler l'absorption de l'arginine et la lysine afin de pourvoir de façon optimale aux besoins métaboliques de la truite.

Durant les 12 semaines de cette expérience, les poissons seront pesés toutes les 3 semaines afin de mesurer les performances de croissances associées aux différents régimes testés et ainsi évaluer dans un premier temps, et sur la base de ce critère, la véracité de notre hypothèse de travail. Au terme de cette expérience, les poissons seront anesthésiés par balnéation dans de la benzocaïne puis l'euthanasie sera réalisée par surdosage du produit anesthésiant. Différents tissus seront alors collectés afin d'évaluer, sur la base de critères moléculaires et cellulaires, la pertinence de notre hypothèse. De plus, nous estimerons le niveau de corrélation de ces résultats avec nos observations issues d'expérimentations in vitro afin de valider tout ou partie des protocoles expérimentaux réalisés in vitro dans le but qu'ils se substituent aux expérimentations animales dans un futur proche.

Ce projet se conforme entièrement à la règle des « 3R » : Remplacement : les effets physiologiques escomptés ne peuvent être observés qu'in vivo. Raffinement : Aucun prélèvement ne se fera sur animaux vivants. Durant toute la durée de l'expérimentation, depuis l'arrivée des poissons jusqu'à l'échantillonnage, une très grande attention sera portée sur le bien-être des poissons grâce à la surveillance de nos animaliers qui ont reçu les formations nécessaires et indispensables à ce suivi. Réduction : Le nombre de régimes alimentaires différents utilisés au cours de cette expérimentation a été réduit au strict minimum tout en permettant d'assurer une interprétation des résultats scientifiques pertinente. De même, le nombre de poissons prélevés est calculé ad minima compte tenu de la variabilité individuelle observée lors d'analyses antérieures

18399 La maladie de Verneuil, ou hidrosadénite suppurée (HS), est une maladie chronique et invalidante de la peau évoluant par poussée et caractérisée par l'apparition récurrente d'abcès douloureux au niveau des plis. Cette maladie se déclare généralement à l'âge adulte et touche environ 1% de la population avec différents stades de sévérité. Si le pronostic vital n'est pas mis en jeu dans cette maladie, elle est très douloureuse et handicapante d'un point de vue social et peut s'accompagner d'un syndrome dépressif. Les traitements prescrits, anti-inflammatoires ou antibiotiques, permettent une rémission provisoire mais jamais de guérison. La physiopathologie de l'HS reste largement méconnue et aucun modèle animal n'existe à ce jour pour l'étudier.

Récemment, une étude menée sur des patients atteints d'HS a permis de mettre en évidence une altération du métabolisme du tryptophane (Trp), suggérant un défaut d'absorption intestinale. Le Trp est un amino-acide essentiel requis pour la synthèse d'un neurotransmetteur jouant un rôle dans l'anxiété et pour la synthèse de métabolites impliqués dans la régulation de la réponse immune et du microbiote cutanés.

Le microbiote cutané dégrade normalement le Trp de l'hôte en métabolites capables de se lier au récepteur d'aryl hydrocarbure (AHR), un facteur de transcription régulant l'inflammation tissulaire. Des résultats précédents suggèrent qu'une disponibilité réduite en Trp dans la peau des patients HS pourrait fournir un avantage de croissance sélective à certaines bactéries indépendantes du Trp tels que *Staphylococcus aureus*, un colonisateur commun des lésions cutanées HS, induisant ainsi un défaut de ligands AHR d'origine bactérienne.

Sur la base de résultats obtenus chez l'homme, le présent projet vise à tester chez la souris le nouveau concept que des altérations systémiques du métabolisme du Trp peuvent induire :

- une altération du microbiote cutané
- une diminution de la production de métabolites bactériens activant AHR dans la peau
- des défauts de l'immunité cutanée antibactérienne.

Pour vérifier ces hypothèses, nous induirons une déficience en Trp chez la souris, par une alimentation spécifique dépourvue en Trp. Nous étudierons l'impact d'un tel régime alimentaire sur le métabolisme, le microbiote et le statut immunitaire de la peau chez des souris type sauvage ou déficientes pour le récepteur AHR. Nous évaluerons également si ce régime alimentaire induit un comportement d'anxiété et/ou un syndrome dépressif par des tests comportementaux et corrélerons ces données avec les niveaux circulants et cérébraux de métabolites du Trp. Nous déterminerons dans quelle mesure une déficience en Trp altère la réponse immunitaire à une inflammation ou à une infection cutanée.

Des essais cliniques actuellement en phase 2/3, démontrent l'efficacité de crèmes contenant un ligand naturel d'AHR pour le traitement du psoriasis et de la dermatite atopique. Dans le cadre de ce projet, nous mesurerons l'effet de l'application cutanée quotidienne de ce ligand sous forme de crème sur le microbiote cutané et déterminerons si ce traitement améliore la réponse immunitaire à une inflammation cutanée.

Ainsi ce projet ouvrira la voie à des essais cliniques explorant le potentiel thérapeutique de ce ligand dans l'HS.

Il nous permettra de tester l'hypothèse selon laquelle une dérégulation du métabolisme du Trp pourrait jouer un rôle clé dans la pathogénèse de HS.

Les animaux utilisés seront des souris adultes (6-12 semaines), femelles, de lignée standard (C56Bl/6Jrj) ou d'une lignée génétiquement modifiée, déficiente pour AHR (individus homozygotes et hétérozygotes) sans phénotype dommageable.

Le nombre total d'animaux prévu sur 5 ans est de 1221 souris dont 885 C56Bl/6Jrj et 336 souris déficientes pour AHR. Ce nombre pourra être réduit à 901 souris au total en fonction des résultats de nos études pilotes.

Le protocole comprend 5 procédures expérimentales de niveau de sévérité modérée concernant 828 animaux et 1 procédure avec niveau de sévérité légère concernant 393 animaux. Tous les animaux seront mis à mort à la fin de l'étude.

Les dommages attendus sont une perte de poids pour les souris qui suivront un régime alimentaire pauvre ou déficient en Trp sans autres signes évidents de souffrance comme décrit dans la littérature.

L'injection d'un agent infectieux ou inflammatoire n'entraînera qu'une inflammation locale modérée et les animaux seront mis à mort 24h après injection.

Enfin les tests comportementaux pourront générer un stress modéré.

Les souris seront surveillées, observées et pesées de façon bihebdomadaire, les animaux seraient mis à mort si la perte de poids engendrée atteignait un point limite ou s'ils présentaient des signes de mal-être. Elles seront habituées à être manipulées avant les tests comportementaux afin de réduire le stress.

Les études pilotes prévues nous permettront d'affiner au mieux les protocoles afin de déterminer la durée suffisante et nécessaire des régimes alimentaires et du traitement, de déterminer le site à privilégier pour l'étude de la réponse cutanée à des challenge infectieux et inflammatoires. Si l'étude pilote confirme la validité du modèle, nous choisirons l'oreille comme site d'injection, ce qui nous permettra d'utiliser les animaux comme leur propre contrôle et de réduire ainsi de manière importante le nombre d'animaux.

Le recours à l'animal est nécessaire. Grâce à des études précédentes menées sur des échantillons humains, une altération systémique du métabolisme du Trp a été associée à un défaut d'activation de la voie AHR. Ce projet vise à valider l'hypothèse selon laquelle un déficit en Trp et/ou en AHR pourraient contribuer à la pathogénèse de HS. Pour cela nous avons besoin d'un organisme entier dans lequel nous combinerons déficiences métabolique en Trp et génétique en AHR.

Le nombre d'animaux que nous estimons nécessaire repose sur notre expérience de la conception d'études de ce type. Nous avons consulté un biostatisticien pour être sûrs d'utiliser le nombre minimum d'animaux nécessaire pour atteindre l'objectif fixé.

18400 Cette recherche a pour objectif de mesurer l'effet de la lumière artificielle nocturne sur les variations journalières de teneurs en corticostérone (hormone de stress) chez le crapaud commun, *Bufo bufo*. Cette recherche est à la fois fondamentale, car elle permet d'évaluer l'impact de la pollution lumineuse sur la synthèse hormonale de ces animaux et a pour but la conservation des espèces car les résultats obtenus serviront à ajuster les préconisations de gestion des populations auprès des gestionnaires de territoires naturels. Aucun animal n'est mis à mort dans ce projet et tous les individus seront relâchés sur leur site de capture après vérification de leur état général.

Ces cents dernières années, la pollution lumineuse nocturne a augmenté de façon spectaculaire dans de nombreuses parties du monde. Du fait de l'urbanisation croissante, de nombreuses zones humides, ayant une importance écologique considérable notamment en tant que réservoir de biodiversité, se retrouvent dans des aires urbaines et péri-urbaines exposées à cette pollution. Le crapaud commun, *Bufo bufo*, est une espèce d'amphibien largement répandue en Europe que l'on retrouve régulièrement dans les zones humides soumises à la lumière artificielle nocturne. Au printemps, les adultes migrent des zones forestières où ils ont passé l'été vers les plans d'eau où ils peuvent se reproduire. Durant cette migration, les adultes qui se déplacent la nuit sont soumis à de la pollution lumineuse. Plusieurs études menées sur différents modèles humains et animaux montrent que la lumière artificielle nocturne inhibe la synthèse nocturne de mélatonine, hormone impliquée dans de très nombreuses fonctions dont la synthèse de glucocorticoïdes. Les glucocorticoïdes sont particulièrement intéressantes à étudier dans un contexte de pollution lumineuse car ces hormones sont représentatives de l'état de stress des animaux. Elles impactent directement les capacités de reproduction des organismes.

Dans cette expérimentation, 80 adultes mâles *Bufo bufo* seront prélevés sur le terrain (conformément à l'autorisation préfectorale) dans une zone indemne de pollution lumineuse au moment de la période de reproduction (mars-avril, selon les conditions météorologiques) et maintenus, proche du lieu de capture, dans une animalerie ectotherme. Les animaux seront répartis individuellement dans des caisses (47 x 36 x 25 cm) contenant 10 cm de litière naturelle humidifiée tous les jours pour qu'ils puissent s'enterrer en journée. Ces caisses seront maintenues dans une

salle de l'animalerie dont la température et l'humidité relative seront quotidiennement contrôlées. Les caisses seront exposés à l'un des deux traitements lumineux nocturnes (40 crapauds/traitement) : éclairage témoin (12h jours/12 heures de nuit) et pollution lumineuse nocturne correspondant au halo lumineux des grandes villes (12h jours/12 heures à 0. 1 lux) pendant 12 jours. Cette durée correspond en moyenne au temps passé par les mâles à migrer, chercher une femelle et s'accoupler. Durant l'expérimentation, les crapauds seront nourris ad libitum tous les jours avec des grillons domestiques et nous nous assurerons qu'ils s'alimentent correctement (disparition des grillons dans la caisse en 24 h). Ce mode d'hébergement, couramment utilisé dans notre équipe, permet de limiter le stress lié à la captivité.

Afin d'obtenir une cinétique de sécrétion hormonale, un prélèvement salivaire sera effectué sur les individus avant (jour 0 : J0) et à la fin de l'expérimentation (jour 12 : J12) en introduisant pendant 30s un coton dans la bouche du crapaud. Chaque crapaud ne sera prélevé qu'une fois à J0 et une fois à J12. A titre d'exemple, les 5 crapauds A témoin et les 5 crapauds A soumis à de la pollution lumineuse seront prélevés à 7h, les 5 crapauds B témoin et les 5 crapauds B soumis à de la pollution lumineuse seront prélevés à 10h et ainsi de suite sur 24h. La salive récoltée permettra de doser les glucocorticoïdes salivaires par un dosage antigénique. L'impact de la pollution lumineuse sera ensuite évalué en comparant le niveau glucocorticoïdes avant et après l'exposition aux traitements lumineux entre les crapauds témoins et ceux soumis à la pollution lumineuse.

Notre projet répond au maximum aux exigences de remplacement, réduction et raffinement :

1) Remplacement

La synthèse hormonale implique des phénomènes de régulation complexes, non modélisables, car s'appliquant à des organismes vivants dans leur intégrité et leur complexité. Ainsi, aucune expérience *in silico* ou *in vitro* ne permet d'accéder à ce type de données. Il n'existe donc aucune méthode alternative à la réalisation de ce projet. De fait, l'utilisation du modèle animal est incontournable.

2) Réduction

Toutes les procédures expérimentales qui seront mises en œuvre ont été optimisées statistiquement, de façon à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés et prélevés dans la nature tout en obtenant des résultats significatifs (5 crapauds prélevés à 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22 heures et minuit) à J0 et à J12). Grâce à ce dispositif expérimental, chaque crapaud ne sera prélevé que 2 fois en début et fin d'expérimentation. La quantité de salive prélevée (entre 10 et 20 mg selon les individus) étant largement supérieure à la quantité nécessaire pour réaliser les analyses (environ 8 mg), ce matériel biologique supplémentaire sera conservé au congélateur -80° afin de pouvoir réaliser par la suite et, en fonction des résultats obtenus dans cette étude, des analyses complémentaires ciblées sur d'autres hormones.

3) Raffinement

Le bien-être des animaux est une condition sine qua non de chaque étape de l'expérimentation. Les conditions d'hébergement, couramment utilisées et maîtrisées dans notre équipe, sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute angoisse que pourraient ressentir les animaux. En particulier la température de l'eau, source de stress importante chez ces animaux sera contrôlée deux fois par jours. Par ailleurs, le bien-être animal sera assuré par la présence de personnel compétent 7J/7J pour l'observation et le soin des animaux.

18401 La présente demande concerne la validation préclinique *in-vivo* de nouveaux dispositifs implantables de la société qui développe, produit et commercialise des prothèses cardiaques actives, notamment : sondes de stimulation cardiaque traditionnelle (fils électriques mis en place dans le cœur pour créer la contraction en cas de ralentissement important du cœur), sondes de stimulation ventriculaire gauche pour le traitement de certaines formes d'insuffisance cardiaque, sondes de défibrillation et défibrillateurs sous-cutanés pour le traitement de la mort subite cardiaque à cause de troubles du rythme graves, stimulateurs cardiaques sans sondes placés directement dans le cœur par voie de cathéter pour éviter les complications à long terme liées aux sondes traditionnelles, capteurs hémodynamiques permettant le diagnostic d'insuffisance cardiaque et le

réglage automatique des prothèses cardiaques implantées, tous systèmes incluant leurs dispositifs d'implantation, leurs programmes informatiques et leurs protocoles de télécommunication avec l'extérieur pour un meilleur suivi du patient (télécardiologie).

La recherche comportera des tests de faisabilité aigus, des essais aigus et des essais chroniques: les tests de faisabilité, pour adaptation éventuelle à l'espèce envisagée sans démonstration statistique, et les essais aigus, pour déterminer les performances de différents designs de matériels. Les essais chroniques évalueront les complications de la phase post-opératoire précoce. Ces essais préliminaires d'innocuité et d'efficacité sont requis avant d'envisager une évaluation clinique sur l'homme, et à terme une éventuelle commercialisation.

Afin de tester les dispositifs, l'utilisation d'animaux est indispensable. La validation des dispositifs sera pratiquée chez le mouton ou le porc, l'espèce animale étant choisie en fonction du matériel testé dans des conditions anatomiques et physiologiques qui doivent être les plus proches de celles de l'homme. Le REMPLACEMENT de l'utilisation d'animaux ne peut donc pas être envisagé dans le cadre de nos études, car il n'est pas possible de remplacer les essais in-vivo pour reproduire la physiologie complexe d'un corps entier. Ces essais sont par ailleurs requis par les Agences Réglementaires.

Le nombre d'animaux prévu est de 69, ce qui est le minimum pour réaliser ces études. Le nombre défini est REDUIT au minimum pour pouvoir tester l'ensemble des paramètres permettant de répondre aux objectifs, plusieurs objectifs d'analyse pouvant être combinés chez le même animal.

Tout au long de la réalisation des expérimentations, toutes les mesures seront prises pour répondre au bien-être des animaux par des mesures de RAFFINEMENT, notamment par la qualité d'accueil et d'hébergement des animaux, la pratique systématique de l'anesthésie générale, de méthodes chirurgicales mini-invasives, et le sacrifice par des méthodes non traumatiques. Des points limites sont définis tout au long du projet et seront suivis de manière rigoureuse par du personnel compétent et soucieux du bien-être animal.

Dans le cadre des essais chroniques, le contrôle du bien-être est particulièrement soigné avec une gestion attentive de la douleur (suivi quotidien, examen vétérinaire pour une prise en charge adaptée), de l'hébergement (enrichissement adapté à l'espèce), de l'alimentation. Les données physiologiques sont recueillies de manière non invasive et adressées par voie de télétransmission, totalement discrète, indolore et sans contrainte physique chez l'animal, ce qui permet un suivi constant des animaux pour une meilleure prise en charge en cas du moindre signe anormal.

18402 La radiothérapie est un outil incontournable dans la prise en charge thérapeutique des cancers. La principale difficulté dans la mise en place des protocoles de radiothérapie est de cibler la tumeur tout en épargnant au maximum les tissus sains environnants. Ces tissus sains irradiés sont responsables du développement de séquelles aiguës (dans les semaines suivant la radiothérapie) et/ou tardives (des mois voire des années après la radiothérapie).

Le cancer pulmonaire est un des cancers les plus diagnostiqués et est associé à un taux de mortalité qui reste encore aujourd'hui très élevé. Les progrès dans la prise en charge thérapeutique de ce type de cancer sont néanmoins importants et les patients peuvent développer des effets secondaires impactant fortement leur qualité de vie, de type pneumopathie radique ou fibrose pulmonaire radio-induite.

Un des objectifs du laboratoire est de comprendre les mécanismes du développement des effets secondaires des expositions médicales aux rayonnements ionisants. Dans ce cadre, des modèles précliniques d'irradiation pulmonaire chez la souris ont été mis en place au laboratoire. Le premier modèle utilisé est une exposition du thorax entier aux rayonnements ionisants, qui génère de la fibrose sur l'ensemble du parenchyme pulmonaire et mime les irradiations thoraciques en champ large. Le second modèle est une irradiation ciblant un petit volume pulmonaire et mimant le traitement des tumeurs broncho-pulmonaires précoces par l'utilisation de la radiothérapie en conditions stéréotaxiques.

Au cours des précédentes études au laboratoire, nous avons mis en évidence des modifications importantes du nombre de cellules club (qui sont des cellules de l'épithélium bronchiolique) en

réponse à l'irradiation. Nous souhaitons avec le présent projet explorer plus précisément l'importance de ces cellules dans le développement des lésions radiques pulmonaires. Pour appréhender le rôle de ces cellules dans différents contextes pathologiques, il existe un modèle de déplétion transitoire des cellules club in vivo par injection intrapéritonéale unique de naphthalène. La déplétion se fait en 48 à 72h et l'épithélium bronchiolique est régénéré ensuite en 2 semaines.

Dans ce projet, l'objectif est d'exposer le système pulmonaire aux rayonnements ionisants (en utilisant les deux modèles cités ci-dessus) à deux moments différents : au moment de la déplétion effective des cellules club et au moment où l'épithélium bronchiolique est recolonisé. Ce projet se déroulera sur une durée totale de 3 ans.

Les modèles d'irradiation sont reproductibles et maîtrisés depuis plusieurs années par le laboratoire. Le recul acquis permettra de mettre en évidence des différences au niveau de la sévérité des lésions induites en fonction de la présence ou non de cellules club au sein de l'épithélium bronchiolique.

Le nombre total de souris utilisées pour ce projet sera de 128. La réponse globale du tissu pulmonaire aux rayonnements ionisants ne peut être appréhendée qu'in vivo, au sein d'un système biologique intégré. Les modèles utilisés sont connus et le nombre d'animaux pour chaque test optimisé pour obtenir des résultats statistiquement robustes tout en évitant d'utiliser un nombre trop important d'animaux. Enfin, les animaux sont suivis quotidiennement (plus si nécessaire) et des décisions d'euthanasie anticipée sont prises en cas de souffrance et d'inconfort sévère des animaux. Les conditions de soins et d'hébergement des animaux sont adaptées aux procédures réalisées afin de limiter au minimum la souffrance animale (mise en place de grilles de score, suivi des animaux, anesthésie pour les irradiations, hébergement en groupe avec enrichissement).

18403 L'obésité, favorise le développement de l'insulino-résistance (IR) qui constitue le principal facteur de risque du diabète de type 2 (DT2). Bien que les mécanismes reliant ces pathologies soient encore mal connus, il est actuellement établi que l'altération des sécrétions du tissu adipeux au cours de l'obésité contribue au développement d'une inflammation chronique qui favorise l'installation de l'IR et du DT2. Parmi ces sécrétions, la résistine a récemment été proposée comme un facteur causal de l'IR et l'inflammation périphérique induite par l'obésité. Cependant, le mode d'action de cette hormone au niveau central n'est pas encore totalement élucidé.

Dans le contexte d'obésité nutritionnelle, il a récemment été mis en évidence que la consommation d'un régime riche en lipides (HFD) entraîne une inflammation rapide de l'hypothalamus, une région du cerveau impliquée dans la régulation de la prise alimentaire, associée à une intolérance au glucose qui s'observent dès les premiers jours de consommation du régime HFD. Plus récemment, nous avons mis en évidence une expression endogène de la résistine dans l'hypothalamus qui est fortement augmentée après seulement 3 jours de régime HFD suggérant que la surexpression de la résistine au niveau hypothalamique pourrait être directement impliquée dans l'installation de l'inflammation hypothalamique et l'intolérance au glucose induite par le régime HFD. Ce projet vise donc à vérifier la relation causale entre la résistine hypothalamique et les effets délétères précoces du régime HFD. Dans un premier temps nous étudierons l'impact de l'ablation spécifique de la résistine dans l'hypothalamus sur le développement l'inflammation hypothalamique et l'intolérance au glucose induites par la consommation du régime HFD pendant 3 et 8 jours. Parallèlement, nous déterminerons l'impact de la perfusion centrale de résistine sur l'inflammation hypothalamique et ses conséquences sur la sensibilité à l'insuline. L'utilisation des animaux dans ce projet se justifie car il n'existe à ce jour aucune méthode de substitution n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude de l'impact physiologique d'un dérèglement nutritionnel. Le modèle animal envisagé dans cette étude est un modèle souris (souche C57BL6) qui est particulièrement bien documenté dans la littérature pour ce type d'étude. Le nombre d'animaux est minimalisé en vue d'appliquer les réglementations européennes en terme de réduction. Aussi certaines expérimentations seront réalisées sur les mêmes groupes de souris tant que celles-ci se révèlent non douloureuses, non stressantes pour l'animal. Des tests statistiques paramétriques et non paramétriques seront effectués en fonction de leur pertinence et du type de données à analyser, afin de travailler au mieux avec de petits échantillons. L'objectif de Raffinement et d'enrichissement

sera pris en compte afin de s'assurer du bien-être des animaux. en effet Les animaux seront hébergés dans des cages conventionnelles par groupes de 4 à 5 souris afin d'éviter le stress de l'isolement. L'eau et la nourriture seront fournies ad-libitum. l'enrichissement est assuré avec des copeaux en bois et ou coton. Par ailleurs, lors des procédures expérimentales, les animaux seront surveillés au quotidien et des points limites bien établis seront strictement respectés. Le recours à l'anesthésie et analgésie sont prévus pour éviter toute souffrance des animaux. Un total de 186 souris sera utilisé, divisé en lots de 6 animaux pour chaque condition expérimentale. Le nombre de souris utilisé a été rationalisé en se basant sur la littérature et nos études antérieurs. En effet, notre expertise dans ce domaine nous a permis de définir le nombre de 6 animaux / groupes comme le nombre minimum de souris à utiliser pour pouvoir mettre en évidence une différence statistiquement significative sur les différents paramètres étudiés.

18404 Le diabète est défini par une hyperglycémie chronique. La maladie se développe à cause d'une déficience relative ou absolue de la sécrétion de l'insuline et/ou de l'action de l'insuline. Il existe plusieurs types de diabète. Le diabète de type 2 (DT2) est la forme la plus fréquente (plus de 90 % des cas) et est souvent associée à d'autres pathologies telles que la stéatose hépatique non alcoolique (NASH). Au vu des conséquences sur la santé des patients de plus en plus nombreux, cette maladie pose un problème de santé publique majeur. Les traitements actuels reposent sur des médicaments délivrés par voie orale et par voie sous-cutanée, dont l'efficacité dépend de leur association avec une alimentation équilibrée et une activité physique régulière. Malheureusement, tous les antidiabétiques oraux sont globalement incapables d'assurer un contrôle à long terme de la glycémie, et sont parfois suivis d'effets secondaires. Il est ainsi urgent d'enrichir l'offre thérapeutique permettant d'améliorer la sécrétion de l'insuline et de préserver la masse des cellules β -pancréatiques, afin de ralentir la progression de la maladie.

Dans ce contexte, notre laboratoire recherche des nouvelles molécules aux effets sécrétagogues et protecteurs sur les îlots de Langerhans, capable d'améliorer la glycémie de modèles de diabète. En particulier, des résultats préliminaires robustes obtenus à partir d'expériences in vitro montrent qu'un analogue de la dermaseptine B2 (DSB2) et un mimétique du facteur de croissance hépatique (K1K1), respectivement, potentialisent la sécrétion de l'insuline en réponse au glucose, et protègent les îlots humains de la mort provoquée par la glucolipotoxicité.

-L'analogue de DSB2 : le (D-Lys6)-LHRH-DRS-B2 (HB2) est connu pour ses propriétés antimicrobiennes et anticancéreuses déjà démontrées chez l'homme et la souris. Nous avons testé le rôle de la DSB2 et de son analogue HB2 sur la sécrétion d'insuline en réponse au glucose dans des îlots humains, de donneurs diabétiques et non diabétiques. L'effet observé est comparable voire supérieur à celui d'un autre analogue du GLP-1 utilisé en clinique, le Liraglutide.

-Le deuxième peptide est un analogue du facteur de croissance hépatique (HGF). L'HGF, via l'activation de son récepteur c-Met, est bien connu pour favoriser la sécrétion d'insuline en améliorant la survie des cellules β -pancréatiques et la sensibilité à l'insuline systémique dans divers modèles de souris diabétiques. Cependant l'utilisation thérapeutique de l'HGF est limitée par sa grande instabilité et sa faible biodisponibilité. Pour contourner le problème, nous avons développé un peptide, le K1K1, qui mime efficacement l'HGF sur l'activation de la signalisation c-Met des cellules du foie. Nos résultats montrent également un même effet trophique de cet analogue sur la prolifération in vitro de cellules β -pancréatiques.

L'objectif de ce projet est d'évaluer in vivo les substances K1K1 et HB2 comme nouveaux candidats thérapeutiques pour l'amélioration du métabolisme glucidique dans des modèles murins de diabète tels que les souris diabétiques et obèses db/db, les souris soumises à un régime riche en gras et les souris NOD.

Plusieurs travaux ont déjà apporté la preuve de concept préclinique de l'utilisation de l'alginate comme véhicule, pour la délivrance in vivo de peptides, améliorant l'efficacité thérapeutique de ceux-ci. Les études montrent que les nanoparticules d'alginate, n'induisent pas de cancers, de réactions allergiques ou sanguines. L'association des peptides avec ces nanoparticules (non toxiques) permettent de réduire les quantités à administrer chez l'animal et ainsi les potentiels effets indésirables liés aux doses injectées. Dans la perspective d'optimiser la posologie des molécules,

l'effet thérapeutique des peptides associés avec des nanoparticules d'alginate sur le métabolisme glucidique des rongeurs diabétiques sera aussi recherché suivant les 2 études :

- 1) Etude de l'effet de HB2, et de son analogue DSB2, administrés avec ou sans nanoparticule sur le métabolisme glucidique dans des modèles de rongeurs diabétiques (souris db/db, souris "HFD").
- 2) Etude de l'effet du K1K1, administré avec ou sans nanoparticule, sur le métabolisme glucidique dans les modèles de rongeurs de DT 2 (souris db/db, souris "HFD") ou de DT 1 (souris NOD). Etude post-mortem des effets des peptides sur l'évolution de la NASH dans cellules hépatiques et sur la masse β -pancréatique.

Dans cette étude, le concept des 3R sera respecté :

- Réduire : Les résultats originaux seront systématiquement vérifiés dans la littérature afin d'éviter la répétition d'études antérieures. Le nombre de souris sera également limité car la majorité des expériences, notamment les mesures de la glycémie, la lipidémie, la tolérance au glucose, la tolérance à l'insuline ainsi que les isolements post-mortem des organes comme les îlots de Langerhans, le foie et le muscle, seront réalisés sur un même individu. Enfin, dès que possible, le groupe contrôle sera commun à plusieurs études.

- Raffiner : Les protocoles pour mesurer le profil métabolique peuvent induire un minimum de stress et de douleurs. Les souris étant manipulées tous les jours, ce stress sera ainsi diminué. Enrichissement du milieu dans les cages. Nous serons attentifs si les animaux souffrent ou présentent un comportement anormal en lien avec le responsable du bien-être animal suivant les paramètres cliniques définissant les points limites : Perte de poids de 15% ou plus, diminution de la prise de nourriture, changement de comportement. . .

- Remplacer : Tout essai d'une substance sur un animal aura été préalablement étudié in vitro sur des cellules de lignées β -pancréatiques.

Afin d'obtenir une différence reproductible et statistiquement significative entre les groupes, 5 animaux par lot expérimental sont nécessaires.

Procédure 1 : 13 lots de souris db/db , soit 65 , à répéter 3 fois, soit 195 animaux

Procédure 2 : 11 lots de souris db/db, 6 lots de souris NOD soit 85 animaux à répéter 3 fois, soit au total 255 animaux

Procédure 3 : 13 lots de souris C57Bl6N, et 11 lot de souris C57Bl6N soit 65 + 55 = 120 animaux à répéter 3 fois, soit au total 360 animaux

Au total : 810 animaux :

18405 L'insuffisance cardiaque est une pathologie sévère caractérisée par une incapacité du cœur à assurer sa fonction de pompe et à irriguer correctement les organes périphériques. Cette déficience est due à des facteurs divers et variés. Ainsi, une diminution des capacités bioénergétiques et de thermorégulation, une modification des propriétés contractiles, une altération de l'architecture cellulaire du muscle cardiaque lié à une anomalie du cytosquelette conduisent à des phénomènes de remodelage cardiaque aboutissant dans un deuxième temps à l'insuffisance cardiaque. D'autre part, une altération des propriétés mécaniques des vaisseaux provoquent aussi des altérations de la fonction cardiaque. Au niveau moléculaire, ce phénomène de remodelage est caractérisé par une altération des programmes d'expression des gènes cardiaques avec notamment l'expression de gènes cardiaques fœtaux. L'induction de ces gènes est régulée par une série de facteurs de transcription comme SRF et Bcl11b/Ctip2. Ces deux facteurs font l'objet d'étude au sein de notre équipe. L'altération du cytosquelette et l'interaction cellule-matrice extracellulaire conduisent aussi à des phénomènes de remodelage cardiaque. Ainsi une anomalie des gènes codant pour les filaments intermédiaires comme la Desmine, la Synémine et la Vimentine peuvent conduire à des pathologies cardiaques et des problèmes de thermorégulation. D'autre part, l'altération des interactions cellule-matrice extracellulaire liée à des dysfonctionnements des intégrines pourrait aussi contribuer aux phénomènes de remodelage cardiovasculaires. L'objectif de notre étude est d'analyser les fonctions cardiaques et musculaires de Bcl11b, SRF, de la Synémine, de la Desmine, de la Vimentine et de l'intégrine α V à travers l'inactivation de ces gènes chez la souris. Nous

avons appliqué à ce projet les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement. Nous avons réalisé des expériences préliminaires en cultures cellulaires qui confirment l'importance de ces gènes pour la régulation de l'activité transcriptionnelle dans les cardiomyocytes et le muscle et le maintien de l'architecture cellulaire. Pour le présent projet, le choix de l'expérimentation animale se justifie par le fait qu'il n'est pas possible de reproduire en culture la fonction cardiaque, vasculaire et musculaire telle qu'elle se retrouve dans l'animal entier (organisation structurale, régulations neuro-hormonale, thermorégulation, influence de la dépense énergétique globale de l'organisme, interaction cellule-matrice extracellulaire). L'utilisation du même matériel biologique pour 3 types d'analyse (morphologie, ARN et protéine) permet de diviser par trois le nombre de souris nécessaire. Le principe de réduction est appliqué par le calcul de puissance statistique de nos tests basés sur des expériences de même type dans d'autres modèles de souris qui nous permettent de réduire à 10 souris par groupe d'âge, le nombre de souris utilisées. Ce projet nécessitera l'utilisation de 6 lignées de souris. 80 souris par lignée ainsi qu'un nombre équivalent en souris contrôle seront utilisées. D'autre part afin de mesurer par télémétrie la température des souris en continu et ceci pour les souris déficientes en filaments intermédiaire (Desmine, Synémine et Vimentine), 10 souris par lignée ainsi qu'un nombre équivalent en souris contrôle seront nécessaires. Ainsi 1020 souris sont prévues pour l'ensemble du projet. L'implantation des pompes sera réalisée sous anesthésie gazeuse (Isoflurane) en quelques minutes. Du METACAM en sous cutané (agit 30 minutes après) sera injecté au préalable pour réduire l'inflammation et les douleurs. L'injection est répétée à 24 et 48h après la procédure pendant la phase de cicatrisation et adaptation de la souris à la pompe. L'évolution du phénotype des souris sera surveillée selon une grille de suivi qui sera mise en place. L'administration d'analgésique sera envisagée en cas de besoin. Enfin, la définition du point limite est clairement établie à partir d'un seuil d'insuffisance cardiaque observé qui déclenchera l'arrêt de l'expérience et l'euthanasie.

18406 L'équipe s'intéresse aux bases neurales de la navigation spatiale. Lorsque nous effectuons un chemin familier, nous nous repérons grâce aux objets présents autour de nous, mais aussi à l'aide des mouvements de notre propre corps. Nous sommes ainsi capables de représenter notre corps dans l'espace tout en bougeant. Cette carte mentale est formée par l'action de nombreuses structures cérébrales qui interagissent les unes avec les autres et nous permettent d'avancer vers un but de manière optimale. Nous avons ainsi montré que le cervelet intervient dans la construction mentale de la représentation de l'espace dont le siège se situe au niveau de la formation hippocampique. De plus, nous avons récemment proposé différentes structures intermédiaires reliant le cervelet à cette formation hippocampique. Nous cherchons maintenant à déterminer les voies et les mécanismes permettant au cervelet de participer à cette représentation mentale. Pour cela nous réaliserons chez la souris, d'une part des injections stéréotaxiques de traceurs (chirurgies) et d'autre part nous enregistrerons l'activité neuronale lors d'une tâche de navigation spatiale (comportement). Nous utiliserons sur 5 ans un total de 236 souris. La règle des 3R a été prise en compte pour la mise en œuvre du projet et sera appliquée sur le terrain : 1) remplacement, les études *in vitro* et les animaux invertébrés ne permettent pas l'étude des comportements complexes; le rongeur est donc l'espèce la plus appropriée pour ce type d'études ; 2) réduction, le nombre d'animaux prévu est inspiré du nombre d'animaux utilisé dans des travaux précédents de l'équipe et réduit au maximum pour nous permettre de générer des données statistiques solides 3) raffinement, Les animaux sont placés dans des cages (58x38x20cm), en communauté de 2 à 5, dans des conditions d'hébergement contrôlées (12:12 h cycle lumière/sombre, 22°C ± 2°C, humidité de 65%). L'eau, la nourriture et un nid végétal, seront placés dans chacune des cages. Lorsque la procédure nécessite l'isolement d'un animal, un jouet d'exploration supplémentaire (cube, tunnel ou abri) est placé dans la cage de manière à lui offrir plus d'enrichissement. Les animaux sont suivis quotidiennement par les mêmes manipulateurs. Des points limites sont définis, afin de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la douleur ou l'angoisse des animaux. .

18407 Le coronavirus SARS-CoV-2 est une menace pour la santé mondiale et la disponibilité d'un vaccin efficace induisant une réponse immunitaire spécifique, forte et durable contre ce pathogène est une urgence. Le vaccin candidat doit générer et maintenir une réponse à la fois humorale et cellulaire

au niveau systémique et sur les surfaces muqueuses, portes d'entrée et site de multiplication initial du virus. Ce projet repose sur la collaboration et l'expertise développées par deux équipes de recherche dans le domaine de la vaccination et de l'étude de la réponse immunitaire. 1/ Développement et validation de VLP (Virus Like Particle) dans le domaine de la vaccination contre le papillomavirus. 2/ Développement et validation de vaccins sous-unitaires par voie muqueuse dans le domaine de la vaccination contre la toxoplasmose.

Dans le cadre du développement d'un vaccin muqueux anti-SARS-CoV-2, le pouvoir immunogène de nos candidats vaccins a d'ores et déjà été validé en modèle murin BALB/c. Des études sont actuellement en cours afin de déterminer la ou les stratégie(s) (parmi celles présentées ci-après) qui seront retenues pour l'évaluation de la protection en modèle infectieux. Le modèle d'infection de référence est établi depuis quelques mois sur des souris C57Bl/6 exprimant le récepteur humain ACE2, récepteur majeur de la protéine S du SARS-CoV-2 présent sur les cellules épithéliales (notamment pulmonaires).

Cette première étude nécessitera l'utilisation de 408 souris au maximum dans le respect de la règle des 3R.

- Remplacement : Pour ce projet, il n'existe pas de méthode de substitution qui pourrait restituer fidèlement un modèle de régulation complexe permettant la validation de notre stratégie.
- Réduction : Le nombre d'animaux est calculé au plus juste à l'aide d'outils statistiques garantissant une puissance de test de 80% minimum en s'appuyant sur les données de la littérature et l'expérience des différents partenaires de ce projet.
- Raffinement : Les souris sont hébergées en accord avec la réglementation française et bénéficient d'un enrichissement social et physique (objets en cellulose pour faire un nid ou à ronger) dans la zone d'hébergement défini par la structure chargée du bien-être animal de l'établissement. Un suivi quotidien de l'état de santé des animaux sera réalisé avec une surveillance systématique de points limites.

18408 L'insuffisance rénale aiguë est une pathologie fréquente associée à un risque vital immédiat et à un risque de maladie rénale chronique à plus long terme. Elle représente de ce fait un problème majeur de santé publique. L'épuration extra-rénale (EER) constitue l'une des pierres angulaires de sa prise en charge thérapeutique, dont les modalités de mise en œuvre restent débattues. Nous avons montré en clinique humaine qu'une stratégie d'initiation « d'attente » de l'épuration extra-rénale (c'est-à-dire réservée à des critères d'urgence) au cours de l'insuffisance rénale aiguë permettait d'éviter le recours à une épuration extra-rénale dans plus de 50 % des cas pour une mortalité similaire, comparativement à une stratégie d'initiation « précoce ». Nous avons aussi constaté que cette stratégie « d'attente » était associée à une meilleure récupération rénale comparativement aux patients ayant été épurés précocement, nous amenant à proposer le concept de lésions rénales induites par l'épuration extra-rénale.

L'objectif de notre projet est de confirmer expérimentalement l'hypothèse de lésions rénales induites par l'épuration extra-rénale au cours de l'insuffisance rénale aiguë et d'en étudier les mécanismes physiopathologiques.

Nous souhaitons donc mettre au point un modèle animal d'hémodialyse chez le rat après une agression rénale aiguë d'origine septique par injection intra-péritonéale de lipopolysaccharide (LPS), l'hémodialyse étant ici testée comme « second hit » d'agression rénale aiguë. Afin de distinguer les effets de chaque potentielle agression sur la fonction rénale, certains groupes de rats recevront une circulation extra-corporelle avec ou sans contact avec une membrane de dialyse voire une EER complète, qu'ils aient reçu préalablement ou non une injection de LPS. Des périodes de récupération de 24 heures seront prévues entre chaque type d'agression subi par l'animal. Enfin, un groupe de rats fera l'objet d'une procédure SHAM. Il est difficile d'envisager des méthodes de remplacement pour notre projet, l'étude des effets de la dialyse ne pouvant être réalisée in vitro sur des lignées de cellules rénales ou au cours d'une étude clinique chez l'homme du fait des gestes invasifs engendrés. Pour cela, nous prévoyons d'utiliser 240 rats Sprague Dawley®. Il s'agit du nombre minimal estimé d'animaux nécessaires pour étudier notre hypothèse et qui permet de

satisfaire au mieux le principe de réduction. Il tient compte des variations inter-individuelles et inter-expériences de la pathologie rénale engendrée ainsi que de la nécessité d'utiliser des tests statistiques non paramétriques. Il est nécessaire de prévoir 30 animaux dans chaque groupe (8 groupes au total) compte tenu des adaptations de dose de LPS à prévoir et de la nécessité d'effectuer les expériences deux fois. Ainsi, 120 rats recevront une injection intra-péritonéale de LPS, puis un cathétérisme et une ligature de l'artère carotide interne gauche, de l'artère et de la veine fémorales droites seule (n = 30 rats) ou associée à une circulation extra-corporelle seule (n = 30 rats) ou associée à une circulation extra-corporelle avec mise en contact du sang de l'animal avec une membrane de dialyse (n = 30 rats) ou encore associée à une hémodialyse complète (n = 30 rats). 120 autres rats subiront les mêmes procédures sans avoir été exposés préalablement au LPS.

Afin de garantir le bien-être animal et le respect du principe de raffinement, les animaux seront hébergés dans notre animalerie au sein de cages ventilées avec un enrichissement comprenant des morceaux de bois pour leur permettre de ronger et des billes de cellulose pour leur permettre de fabriquer des nids. Les expérimentations seront les plus courtes possibles avec une euthanasie prévue 48 heures après le début du protocole, ce qui correspond à la durée minimale nécessaire à l'apparition de lésions rénales dans les suites d'une agression. Une anesthésie ainsi qu'une antalgie pré- et post-opératoires sont prévues lors des procédures de cathétérisme, de circulation extra-corporelle avec ou sans dialyse et de ligature des vaisseaux. Une surveillance pluri-quotidienne du bien-être animal par les responsables du projet est aussi prévue pendant les phases d'attente intercalées entre chaque procédure.

18409 L'obésité, qui est classée en tant qu'épidémie depuis 1997 par l'OMS, touche plus de 1,9 milliards d'adulte dans le monde. L'obésité qui se caractérise par une surcharge pondérale est un facteur de risque majeur du développement de nombreuses complications, dont la dyslipidémie, l'insulino-résistance menant au diabète de type 2, la stéatose hépatique ou encore le développement de maladies cardiovasculaires ou de divers cancers.

Dans ce contexte, la production intestinale de glucose (PIG) est une fonction particulièrement intéressante, puisqu'elle contrôle positivement le métabolisme et exerce des effets « anti-obésité » et « anti-diabète ».

Grâce à un modèle murin d'activation de la PIG (depuis le stade in utero), nous avons montré que cette fonction exerce des effets protecteurs vis-à-vis du développement de l'obésité et ses complications majeures (dont la stéatose hépatique, le diabète) induits par 5 mois de régime hypercalorique riche en gras et en sucres.

Dans un objectif thérapeutique qui pourrait être appliqué à l'homme, il est maintenant crucial de déterminer si l'activation de cette fonction est capable de corriger l'obésité et ses complications (dont le diabète et la stéatose hépatique) déjà installés par un régime hypercalorique. Pour cela, nous disposons au laboratoire d'un modèle de souris d'activation de la PIG à un moment choisi (par l'injection de tamoxifène ; souris I. G6pcsurexp. Ind).

Plus précisément, nous induirons un surpoids chez des souris I. G6pcsurexp. Ind (PIG non activée au départ) et contrôles grâce à l'apport d'une alimentation riche en gras et en sucres pendant 3 mois. Après ce temps, les souris recevront du tamoxifène afin d'activer la PIG chez les souris I. G6pcsurexp. Ind. Le régime hypercalorique sera poursuivi pendant 2 mois supplémentaires.

Cette étude nous permettra de déterminer si l'activation de la PIG est capable de corriger les troubles métaboliques provoqués par 3 mois de régime hypercalorique.

Ce temps de régime assez court n'entraînera pas de troubles majeurs chez les animaux. En effet, après 5 mois de régime au total, les souris présenteront un surpoids pouvant être accompagné d'un prédiabète et d'une légère stéatose hépatique.

Les souris seront élevées et hébergées par groupe 3-4 souris par cage en milieu enrichi (coton de nidation, bois à ronger) et contrôlé. Aucun des modèles murins utilisés dans cette étude ne présente de signe de stress, ni de douleur par rapport aux souris contrôles.

Ce projet sera réalisé selon le respect de la règle des 3R (remplacement, réduction, raffinement) :

Remplacement :

Cette étude nécessite l'utilisation de modèles animaux puisque la fonction étudiée, la PIG, a des impacts sur l'ensemble du métabolisme de l'organisme et implique des dialogues entre organes. En effet, le glucose produit par l'intestin est détecté au niveau des senseurs de glucose dans les vaisseaux qui vont transmettre un signal nerveux au niveau du cerveau. En réponse, le cerveau va émettre des signaux nerveux en périphérie, régulant en particulier le métabolisme du foie.

Réduction :

Le nombre de souris a été calculé au plus juste à partir des connaissances des pathologies étudiées, des modèles animaux, et du métabolisme glucidique, mais aussi des résultats d'études précédentes ayant permis de valider la preuve de concept. Afin de pouvoir faire une analyse statistique, des groupes de 10 à 20 souris seront analysés. Au total, ce projet nécessitera l'obtention de 216 souris mâles transgéniques et contrôles.

Raffinement :

Les souris seront hébergées par groupe, dans un milieu enrichi pour favoriser la nidation. Les animaux seront observés quotidiennement et pesés régulièrement pour suivre leur prise de poids. Les procédures sont maîtrisées par les personnes en charge de l'expérimentation animale.

Les souris seront mises à mort à la fin du protocole ou lors de l'atteinte d'un point limite défini dans le projet selon les méthodes autorisées par la législation.

18410 La dépression touche environ 350 millions de personnes dans le monde dont la moitié n'a pas accès à un traitement efficace (source rapport OMS 2012). La résistance aux antidépresseurs est de plus en plus décrite et par conséquent, il est important de trouver une alternative plus efficace pour les patients pharmaco-résistants. Ces dernières années, des progrès considérables ont été accomplis en stimulant électriquement (grâce à la stimulation cérébrale profonde) ou superficiellement (par la stimulation magnétique trans-crânienne répétée) des zones du cerveau qui présentent une activité déficitaire chez les personnes déprimées, induisant une rémission totale et durable chez des patients ne répondant à aucune pharmacothérapie. Cependant, la stimulation cérébrale profonde est une méthode très invasive à laquelle peu de patients acceptent d'avoir recours, et la discrimination spatiale de la stimulation magnétique transcrânienne est médiocre, ce qui en limite aussi l'utilisation. Récemment, il a été montré que la stimulation ultrasonore peut modifier l'activité électrique cérébrale, en étant très précise et non invasive. Cependant, cette méthode n'a pas encore été utilisée pour induire une réversion des états dépressifs.

L'objectif de cette étude sera donc de démontrer la faisabilité de la stimulation cérébrale par onde ultrasonore de régions précises du cerveau (comme par exemple le cortex cingulaire antérieur, le noyau accumbens ou l'habenula latérale) dans un modèle animal de dépression et si cette stimulation permet de reverser de façon durable les symptômes de la dépression. Cette étude vise à trouver une alternative de traitement chez des patients dépressifs pharmaco-résistants.

Ce projet vise à développer une alternative thérapeutique aux patients pharmaco-résistants. Pour cette expérience, 712 souris seront nécessaires.

En application de la règle des 3 R au modèle utilisé dans l'étude :

Raffinement : le stress appliqué aux animaux peut être qualifié de moyen. Les conditions d'élevage des animaux non stressés seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu. Les expérimentateurs sont experts dans la préhension/contention des souris et sont soucieux d'éviter tout stress lors de la réalisation des procédures. Afin de prévenir l'éventuelle douleur lors de l'injection un anesthésique local en gel sera appliqué au niveau du site d'injection. Les animaux recevront un traitement analgésique avant, juste après l'intervention, un traitement anti-inflammatoire 24-48 heures plus tard, puis si nécessaire un traitement antibiotique. Chaque animal est placé sur une couverture chauffante pour éviter toute hypothermie. Les cornées sont protégées de la déshydratation. L'anesthésie gazeuse est ici privilégiée pour mieux contrôler la

profondeur d'anesthésie et pour une meilleure récupération post-opératoire Une surveillance post-opératoire d'une semaine est réalisée pour suivre chaque souris et intervenir si nécessaire.

Remplacement : aucune méthode alternative in vitro n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée. Le stress chronique chez l'animal, comme modèle de pathologie psychiatrique humaine, repose sur l'observation du comportement de l'animal vivant. Aucun marqueur cellulaire in vitro n'est disponible. De plus, les dosages biologiques requièrent des prélèvements frais qui ne peuvent être réalisés que sur animaux sacrifiés avec délai post-mortem et conditions de prélèvement contrôlés.

Réduction : les effectifs sont optimisés, les observations comportementales nécessitent une taille d'effectifs suffisant compte tenu de la variabilité inter-individuelle (n=16 sujets par groupe). De plus, la rationalisation des procédures permet d'optimiser l'utilisation des échantillons cérébraux prélevés.

18411 L'acide γ -aminobutyrique ou GABA est un acide aminé dont le rôle est essentiel dans le monde vivant. Le GABA est un neurotransmetteur qui module l'activité du système nerveux. Le récepteur du GABA est probablement le récepteur le plus répandu dans le système nerveux des mammifères. Il a été récemment montré que certaines protéines (modulateur des récepteurs du GABA) pouvaient avoir un impact sur l'appétit et être un stimulateur lipogénique chez la souris c'est-à-dire entraîner une formation de gras. Cette découverte pourrait être importante et utilisée pour améliorer les traitements anti-cancéreux. En effet, il existe de nombreux cas dans lesquels le traitement anti-cancéreux comme les chimiothérapies doivent être abandonnées en raison d'effets secondaires graves impactant la qualité de vie du patient comme une perte d'appétit associée à des vomissements et des nausées. Cette anorexie (perte ou forte diminution de l'appétit) peut persister relativement longtemps. C'est pourquoi, Il est important d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques qui pourraient déboucher dans le futur vers un traitement pharmacologique efficace de l'anorexie du malade cancéreux. Ce protocole permettrait de savoir si en modulant l'activité des récepteurs du Gaba, nous pouvons empêcher cette anorexie. En effet, nous espérons pouvoir développer un traitement préventif de cette anorexie. Nous aimerions moduler l'activité des récepteurs du Gaba et ensuite étudier le devenir des animaux soumis à une chimiothérapie.

Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des expérimentations a été mis au point afin de respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement et de permettre ainsi une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal. Remplacement : l'utilisation d'animaux vivants est indispensable car seul un animal vivant, entier, peut permettre d'étudier la modulation du récepteur du GABA qui implique l'appétit, l'absorption des aliments et le comportement des individus. Cet environnement est impossible à reproduire dans toute sa complexité et dans sa régulation in vitro ou ex vivo. Ce projet se dessine sur 3 ans et implique l'utilisation (au maximum) de souris immunocompétentes C57Bl/6 (n = 840) ou ICR (n=260). Les souris immunocompétentes sont des souris classiques avec un système immunitaire fonctionnel. Réduction : Les expérimentations seront regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. L'étude sera arrêtée si la procédure initiale invalide l'hypothèse de travail. Plusieurs tissus seront prélevés et soumis à diverses analyses (immunologiques, histologiques ou de biologie cellulaire et moléculaire) pour extraire le maximum de données de chaque expérimentation. Ces tissus seront également partagés avec nos collaborateurs dans le but de réduire le nombre d'animaux utilisés. Raffinement : Les conditions d'hébergement seront conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposeront de nourriture et d'eau ad libitum; le milieu est enrichi à l'aide de sizzlets et matériel de nidification). Les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux (points limites surveillés, anesthésie des animaux, utilisation de cages préchauffées et de lampes chauffantes. . .). Les animaux seront observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être. La mise en place d'une grille de suivi stricte des points limites permettra d'éviter au maximum le stress et/ou la douleur au cours de l'expérimentation. De plus, le personnel impliqué dans ce projet est qualifié sur le plan technique et

formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale. Il assure également une veille scientifique continue, évitant toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature.

18412 L'impact cardiaque, vasculaire et rénal de la COVID-19 est fréquent et important dans les formes sévères de la maladie. Notre projet vise à comprendre les altérations cardiovasculaires et rénales qui se développent pendant la pathologie et nous donnera des bases pour les études futures sur les conséquences cardiovasculaires de la COVID-19. Notre étude a aussi pour but de différencier les altérations cellulaires dues à l'infection directe par le virus de celles dues à l'orage inflammatoire en comparant deux modèles de souris exprimant l'ACE2 humaine (le récepteur du SARS-Cov2) soit dans les cellules épithéliales uniquement (souris K18-hACE2), soit dans toutes les cellules exprimant l'Ace2 (souris hACE2-ki). Après avoir infecté des souris de chacune des deux souches, nous étudierons la structure et la fonction au niveau pulmonaire, cardiaque et rénal. Dans un premier temps, nous testerons les effets de différentes doses de virus sur la survie et les altérations tissulaires chez les souris transgéniques afin de définir la dose induisant une pathologie sur les souris mais avec une survie d'environ 50% afin de pouvoir étudier des altérations cardiovasculaires chez les souris ayant survécu. Dans un deuxième temps, nous étudierons en fonction du temps les altérations dans les différents tissus d'intérêt. Les souris des deux lignées seront infectées à la dose déterminée précédemment et étudiées à différents temps (8 groupes). Ces expériences seront reproduites 2 fois pour pouvoir étudier différents paramètres. Le syndrome métabolique est un facteur de risque majeur pour la sévérité du Covid19. Il est défini par une obésité abdominale combinée à des altérations métaboliques (hypertriglycéridémie, hypercholestérolémie, hyperglycémie) ou une hypertension artérielle. Nous étudierons aussi l'effet de ce syndrome métabolique sur les altérations des tissus chez les souris infectées. Enfin, nous étudierons la fonction coronaire chez des souris infectées à deux temps qui auront été choisis en fonction des résultats obtenus aux différents temps.

Nous utiliserons 494 souris sur 3 ans. Nous étudierons les mâles car mâles et femelles répondent différemment et les mâles sont plus sensibles à l'infection. Dans nos protocoles et analyses, nous prendrons les mesures suivantes pour appliquer la règle des trois R :

1-Remplacement: Compte tenu de la complexité des effets pathologiques de l'infection au Sars-Cov2 chez l'homme, il n'y a pas de possibilité d'utiliser des méthodes alternatives pour comprendre ces effets au niveau de l'organisme et au niveau tissulaire. Cependant, dès que nous aurons identifié les types cellulaires mis en cause dans les différents tissus d'intérêt, cela permettra ensuite d'effectuer des études in vitro sur l'effet de l'infection sur la fonction cellulaire.

2-Réduire: Les mêmes animaux seront utilisés pour des études aussi bien au niveau rénal, que pulmonaire et cardiaque afin de réduire le nombre d'animaux utilisés

3-Raffinement:

a-Les volumes injectés seront établis en accord avec le volume sanguin et le poids de l'animal afin d'injecter les plus petits volumes possibles.

b-Nous prélèverons de nombreux tissus chez les animaux euthanasiés afin d'évaluer les altérations. Les tissus seront fixés pour préparation en paraffine et aussi congelés pour extraire les ARN messagers (ARNm) et les protéines.

c-Les animaux avant infection sont stabulés en animalerie conventionnelle et ceux infectés sont stabulés en confinement A3. Ils seront stabulés en groupe (2 à 6 souris par cage) en portoirs ventilés avec : -enrichissement de la sciure avec des lanières de papier kraft, -enrichissement de l'environnement structurel et social favorisé par des activités physiques et cognitives (des jeux cartonnés), -accès à l'eau et à la nourriture ad libitum. La température et l'hygrométrie sont contrôlées et monitorées. Le cycle d'éclairage est de 12h par jour (6h-18h).

d- Une surveillance quotidienne sera effectuée par les zootechniciens ou par les responsables de projet pendant laquelle les points limites seront évalués : - perte de poids -lésion cutanée, - incapacité à se déplacer, -toiletage et -posture de l'animal. De manière globale, le comportement et l'aspect physique et expression faciale seront analysés. Dans le cas où un de ces points limites

serait atteint, des procédures d'euthanasie appropriées afin de réduire la souffrance seront mises en place.

18413 L'équipe s'intéresse au rôle cognitif du cervelet, et notamment à son influence sur nos capacités de navigation spatiale. Lorsque nous effectuons un trajet familier nous nous repérons aux objets présents autour de nous mais également aux mouvements de notre propre corps. Nous sommes ainsi capables de nous représenter notre corps dans l'espace tout en nous déplaçant. Cette carte mentale est formée grâce à l'action de nombreuses structures cérébrales interagissant entre elles et nous permettant ainsi de nous déplacer vers un but de manière optimale. Des données de la littérature indiquent qu'un déficit de plasticité au sein des cellules de Purkinje du cervelet (CPs) conduit à un dysfonctionnement de certains types de neurones codant l'espace dans l'hippocampe, le thalamus et certaines régions du cortex. De plus l'altération de la plasticité des CPs entraîne un déficit dans la réalisation des trajets vers un but. Afin de compléter ces découvertes, nous souhaitons maintenant étudier l'influence d'une perturbation d'un autre type de cellules du cervelet, les cellules granulaires, sur les processus cognitifs. Ces cellules expriment Shank3, une protéine qui est altérée chez les patients atteints du syndrome de Phelan McDermid. Ce syndrome se traduit par des altérations motrices et cognitives et pour certains des patients par l'apparition de troubles du spectre autistique. Nous souhaitons donc caractériser dans ce projet les conséquences morphologiques et comportementales, chez la souris, d'une délétion de Shank3 au sein du cervelet. L'étude des bases neurales qui sous-tendent les capacités de cognition spatiale et nos interactions sociales ne peut pas être modélisée *in vitro* et requiert de manière indispensable l'utilisation d'animaux capables de telles performances et modifiés génétiquement de manière à en étudier les mécanismes sous-jacents. Le nombre d'animaux utilisés dans notre projet est réduit à son minimum dans la limite de ce qui est permis pour obtenir des résultats scientifiquement valides. Ainsi, il est nécessaire de reproduire les résultats de manière indépendante et d'avoir plusieurs échantillons pour éviter les différences dues à la variabilité biologique. Ce projet qui s'étale sur 5 ans, a pour objectif de réaliser des tests d'exploration fonctionnelle sur un total de 424 souris. En effet, notre procédure expérimentale se fera sur des lots de $n = 10$ à 12 animaux par génotype, sexe et type de tâche comportementale, ce qui, pour une étude comportementale comme celle-ci représente le nombre classique d'animaux nécessaire à valider statistiquement d'éventuels effets. Les données quantitatives obtenues feront l'objet d'une analyse de variance suivie de tests post-hoc lorsque ce test sera significatif. Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux. Des points limites ont été définis et une surveillance est mise en place pour surveiller l'état de santé des animaux. Ils sont, dès leur arrivée, habitués à la manipulation pour limiter le stress. Les animaux sont hébergés en groupe (3-4 souris par cage) et leur milieu est enrichi avec du nid végétal. Toutes les conditions sont réunies pour prendre en compte la douleur de l'animal et quand cela est nécessaire une anesthésie / analgésie est pratiquée.

18414 L'État de Stress Post-Traumatique (ESPT ou PTSD, pour Post-Traumatic Stress Disorder, APA 1994) est une pathologie psychiatrique qui touche 8 à 12% de la population générale.

Le PTSD se caractérise par une constellation de symptômes qui surviennent après l'expérience d'un événement traumatique pouvant être léthal, causer une blessure grave ou menacer l'intégrité physique. Ce traumatisme va provoquer une réaction de peur intense, un sentiment d'impuissance ou d'horreur. La symptomatologie du PTSD se définit alors par un syndrome de reviviscence traumatique, un évitement et émoussement affectif et une activation neurovégétative.

L'efficacité des thérapies pharmacologiques (antidépresseurs) ou psycho-cognitive reste cependant relative et limitée. L'amélioration de l'arsenal thérapeutique dans le traitement du PTSD représente donc un enjeu de santé publique majeur. Ces dernières années, les techniques de neurostimulation sont en train d'émerger. Au laboratoire, nous avons mis au point le traitement par Stimulation Transcrânienne Ultrasonore répétée (rTUS) du cortex infralimbique dans le traitement de la dépression. C'est une technique qui offre l'avantage d'être non-invasive

L'objectif de cette étude sera de tester l'efficacité d'une stimulation rTUS du cortex infralimbique dans le traitement du PTSD.

Pour cette expérience, 124 souris réparties en 8 lots expérimentaux de 15 souris mâles et 4 souris servant à la validation des paramètres de stimulation rTUS sont requises.

En application de la règle des 3 R au modèle utilisé dans cette étude :

Raffinement : le stress traumatique appliqué aux animaux peut être qualifié de moyen, en raison de sa brièveté. Les conditions d'élevage des animaux seront optimales au regard des normes en vigueur. Tous les animaux seront hébergés ensemble, stressés et non stressés, avec enrichissement du milieu. Les expérimentateurs sont experts dans la préhension/contention des souris et sont soucieux d'éviter tout stress lors de la réalisation des procédures. Les injections quotidiennes d'antidépresseur ont été remplacées par un traitement dans l'eau de boisson.

Remplacement : aucune méthode alternative in vitro n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée. Le PTSD chez l'animal, comme modèle de pathologie psychiatrique humaine, repose sur l'observation du comportement de l'animal vivant.

Réduction : les effectifs sont optimisés, les observations comportementales nécessitent une taille d'effectifs suffisante compte tenu de la variabilité inter-individuelle (n=15 sujets par groupe). Les souris seront uniquement mâles, afin d'éviter les variations comportementales provoquées par le cycle menstruel de la femelle et ainsi réduire le nombre total d'animaux.

18415 La démedicalisation en élevage intensif est un enjeu majeur et mondial de santé publique. Elle est motivée en partie par la perte d'efficacité des antibiotiques due à l'apparition de multiples résistances bactériennes qui impactent la santé humaine, la santé animale et celle des écosystèmes. Elle a également pour objectif de renforcer l'état de santé général des animaux d'élevage intensif. La pratique de ces élevages intensifs représente une préoccupation importante de la société et le public reste attentif aux conditions d'élevage ainsi qu'au recours des antibiotiques. Ce projet s'inscrit donc à la fois dans un objectif général actuel de santé globale et un objectif sociétal en faveur de la préservation du bien-être des animaux d'élevage. Il s'agit de tester l'efficacité d'une nouvelle formulation d'un produit végétal à base de piment, sur son absorption, sa biodisponibilité et ses effets protecteurs contre les infections.

Les propriétés du piment sont déjà connues pour stimuler la prise alimentaire, pour favoriser les sécrétions enzymatiques digestives, pour limiter les processus inflammatoires et moduler l'immunité au sein du système digestif des animaux d'élevages de porcs et de volailles. Cependant, ces effets bénéfiques ne peuvent être observés que si la formulation libère en quantité suffisante les actifs, que ce soit au niveau digestif pour un effet positif suspecté sur le microbiote et l'inflammation ou en systémique pour les effets sur le système immunitaire. L'objectif de cette étude est d'évaluer si une nouvelle formulation contenant les principes actifs du piment permet d'améliorer son absorption et ses effets sur l'organisme des porcs ce qui permettra d'améliorer les effets du piment ainsi formulé en diminuant son apport brut et son effet « piquant » pour l'animal.

Nos premiers essais de digestion réalisés in vitro ont montré une grande influence de ces formulations sur la libération des matières actives selon le pH. Mais les expérimentations menées in vitro ne permettant pas de simuler la présence des aliments ni de la flore digestive. Il est donc essentiel de confirmer in vivo ces résultats chez l'espèce cible, le porc. Les essais in vitro permettent de sélectionner les formulations les plus pertinentes et d'éliminer les autres avant de les administrer aux animaux.

Après ingestion de notre produit formulé dérivé du piment les taux absorbés dans l'organisme seront mesurés à l'aide de prises de sang à intervalles réguliers pendant un temps court et comparés aux extraits de piment non formulés. Outre la mesure de l'efficacité d'absorption du piment nouvellement formulé, un certain nombre de paramètres physiologiques seront mesurés en vue de vérifier que les concentrations in vivo sont en faveur d'un effet pharmacologique.

Le nombre d'animaux total sera au maximum de 60 porcs selon le nombre de formulation de piment testé et pendant la période couverte par l'autorisation. Ce nombre sera systématiquement restreint au strict nécessaire pour pouvoir réaliser une étude statistique par formulation étudiée. Les porcs

seront maintenus dans des conditions d'hébergement similaires avec celles d'un élevage avec accès à la nourriture pendant l'expérimentation. Un enrichissement du milieu est toutefois prévu en sus (jouets, friandises, etc.) afin d'améliorer le bien-être des porcs. Les actifs végétaux seront donnés par voie orale pendant plusieurs jours. Le nombre de prélèvements ne dépasse pas la norme permettant de garantir le bien-être de l'animal. Les animaux sont anesthésiés sous contrôle d'un vétérinaire pour toutes les procédures stressantes ou douloureuses. La présence des dérivés du piment sera mesurée dans les organes après 5 jours de traitement.

Ce modèle expérimental a pour but de refléter au mieux les conditions d'élevage et d'utilisation des additifs à base d'actifs végétaux afin d'améliorer le bien-être animal en condition d'élevage et de limiter l'utilisation d'intrants.

18416 Les troubles dépressifs sont une des premières causes d'invalidité dans le monde. Ils sont généralement traités par des pharmacothérapies basées sur l'administration d'antidépresseurs. Toutefois, si ces traitements sont efficaces pour une partie des patients (jusqu'à 50%), ils le sont peu chez une proportion importante de patients (insensibilité partielle ou totale). Ainsi, le stress et les troubles associés posent un problème majeur de santé publique, nécessitant une meilleure compréhension des mécanismes neurobiologiques sous-jacents et la mise au point de nouvelles stratégies thérapeutiques plus efficaces. La stimulation cérébrale magnétique transcrânienne répétée (rTMS), qui consiste à appliquer une série d'impulsions magnétiques sur le scalp pour modifier durablement l'activité de la région corticale visée, en particulier le cortex préfrontal (PFC) dans la dépression majeure, constitue une approche alternative prometteuse chez les patients présentant des troubles affectifs résistants aux traitements pharmacologiques et comportementaux actuels. Afin d'étudier plus en avant les circuits neuronaux impliqués dans la rémission induite par la rTMS, notre équipe a implémenté son utilisation chez la souris, et démontré son efficacité à contrecarrer les effets comportementaux d'un modèle de dépression, le stress chronique imprédictible (UCMS). Nous avons pu par ailleurs montrer par imagerie, que les souris en rémission suite au traitement par rTMS présentaient une connectivité accrue entre diverses régions du cerveau, en particulier entre le PFC, l'hippocampe ventral (vHPC), l'amygdale (AMY) et le striatum dorsal (DStr). Ces résultats suggèrent que la rTMS pourrait agir en renforçant la connectivité du PFC avec ces régions cibles. L'objectif des expériences proposées sera d'étudier cette hypothèse de façon causale, en inhibant l'activité des neurones du PFC projetant vers ces structures pendant la stimulation par rTMS. La souris est de ce fait le modèle le plus pertinent, de par l'homologie de structure entre ces différentes structures participant au contrôle des émotions et impliquées dans la dépression, l'accessibilité des outils permettant de manipuler l'activité neuronale de façon ciblée, et la pertinence du modèle murin UCMS.

L'effectif total maximum pour la totalité du projet de cette saisine est de 225 souris. Concernant l'application de la règle des 3 R dans notre étude:

Remplacement : aucune méthode alternative in vitro n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée Le stress chez l'animal, comme modèle de pathologie psychiatrique humaine, repose sur l'observation du comportement de l'animal vivant.

Réduction : les effectifs sont optimisés, les analyses tissulaires nécessitent une taille d'effectifs suffisante compte tenu de la variabilité inter-individuelle (n=15 sujets par groupe expérimental). De plus, la rationalisation des procédures permet d'optimiser l'utilisation des échantillons cérébraux prélevés.

Raffinement : Les conditions d'élevage des animaux seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu (cabanes plexiglass et cartons, tubes). Les animaux recevront un traitement analgésique avant, juste après et 24-48 suivant l'intervention, puis si nécessaire un traitement antibiotique. Chaque animal est placé sur une couverture thermorégulée pour éviter toute hypothermie. Les cornées sont protégées de la déshydratation. L'anesthésie gazeuse est ici privilégiée pour mieux contrôler la profondeur d'anesthésie et pour une meilleure récupération post-opératoire. Une surveillance post-opératoire d'une semaine est réalisée pour suivre chaque souris et intervenir si nécessaire.

18417 Le cancer gastrique est un cancer de très mauvais pronostic. Plus de 90% des patients développant cette pathologie sont infectés par la bactérie *Helicobacter pylori*, capable de coloniser la muqueuse de l'estomac et d'entraîner à court terme une inflammation chronique de la muqueuse gastrique et à plus long terme, un cancer gastrique. Ce cancer est de très mauvais pronostic du fait notamment de l'absence de thérapies spécifiques. La prise en charge ne contient que de la chirurgie et des chimiothérapies conventionnelles. Il est donc nécessaire de développer des traitements plus spécifiques, plus efficaces et moins toxiques pour le patient.

Dans cette optique nous voulons tester l'efficacité d'une molécule, la metformine, qui est un antidiabétique avec peu d'effets secondaires indésirables. Depuis plusieurs années, il a été mis en évidence que cette molécule possède aussi des effets anticancéreux dans différents types de cancer tels que le cancer du sein ou de la prostate. Mais cela n'a pas été étudié dans le cadre du cancer gastrique.

Le principe de cette étude est d'infecter l'estomac de souris avec *Helicobacter pylori* puis de traiter ces souris par gavage quotidien avec la metformine. Le but étant de déterminer si ce traitement peut empêcher le développement d'un cancer gastrique, afin de proposer son utilisation en clinique et d'augmenter le pronostic et le bien-être des patients.

3R:

- 120 souris seront nécessaires. L'étude se déroulera sur 3 séries successives de 40 animaux. Ce modèle reste à ce jour le modèle le plus pertinent pour étudier l'efficacité d'une drogue au sein d'un organisme vivant. Il n'y a pas de méthode alternative pour tester l'efficacité de la metformine (remplacement).

- Dans notre étude, la réduction du nombre d'animaux est prise en compte tout en conservant une signification scientifique statistique (hétérogénéité inter-individuelle) (réduction).

- La méthode d'infection et de traitement choisie, par gavage, est peu invasive et peu douloureuse pour l'animal. Le choix de ce mode d'administration par gavage est un raffinement car pas invasif.

18418 Nos recherches ont pour but de développer de nouvelles techniques d'acquisition in vivo fondées sur la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), plus communément appelée IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) et SRM (Spectroscopie par Résonance Magnétique). Le but est d'améliorer les informations anatomique, biochimique et biomécanique sur les tissus vivants pour mieux diagnostiquer certaines pathologies. Les nouvelles techniques développées dans ce projet consistent à écrire partiellement ou intégralement de nouvelles séquences RMN parfois couplées à un dispositif d'élastographie ou optique. Ces nouvelles séquences et /ou dispositifs nous permettront de mettre en place de nouveaux biomarqueurs jusqu'ici inexistantes ou plus simplement d'améliorer la qualité des images RMN existantes. Quatre techniques seront utilisées : l'excitation RMN par contrôle optimal pour optimiser le signal ou le contraste dans l'image, l'élastographie du foie pour évaluer l'altération de ses propriétés mécaniques, l'imagerie spectroscopique multidimensionnelle pour quantifier la structure chimique des tissus et la synchronisation optique pour améliorer l'imagerie cardiaque. Dans le cas où nos recherches aboutiraient, ce projet permettra non seulement de passer à la phase de recherche sur l'homme (bénéfices dans le monde hospitalier) mais aussi de valider des techniques de diagnostic sur le petit animal. Ainsi ce type de techniques non-invasives pourrait se démocratiser et devrait donc diminuer des techniques de type invasif comme des prises de sang, biopsies, autopsies ... Ceci aura pour effet de diminuer le nombre et la souffrance des futurs animaux faisant l'objet d'études similaires.

Toutes ces techniques basées sur la RMN intégreront des procédures non-invasives et non-ionisantes où seul le dommage occasionné sur l'animal sera l'anesthésie générale gazeuse. Mais avant cela, la grande majorité des développements, nécessitant la programmation des imageurs RMN, sera réalisée sur des solutions, échantillons tests de composition parfaitement connue. Une fois la technique mise au point, nous devons la valider in vivo. La validation se fera sur des souris saines et une même souris sera examinée plusieurs fois. De par notre expérience, nous évaluons la fréquence moyenne des examens à 11 jours par an et par animal ce qui représente 2 heures d'anesthésie par mois et par animal. Ainsi, nous utiliserons un nombre très réduit d'animaux et nous

estimons de façon grossière un remplacement des animaux chaque année. Il va de soi qu'un groupe d'animaux dépassant un an en âge ne sera pas euthanasié si ce dernier ne présente aucun comportement inhabituel laissant suggérer un mal-être. Pour développer une vie communautaire, 6 souris dans une cage seront nécessaire chaque année pour que le projet soit correctement mené, soit 18 souris saines sur la durée restante du projet soit 3 ans. La RMN est une technique peu sensible et il se peut que le signal provenant d'un organe tel que le foie ou le cerveau ne soit pas suffisant pour le détecter. Nous aurons alors besoin de rats présentant des organes plus gros. Donc si les études sur souris ne permettent pas de valider nos techniques alors nous aurons besoin de 4 rats placés dans une cage. Si ce manque de signal se révèle chaque année, nous utiliserons alors au maximum 12 rats sur toute la durée du projet (3 ans). Le nombre total d'animaux toutes races confondues sur 3 ans sera de 30 animaux. Une attention toute particulière sera faite sur les animaux vieillissants. Les animaux montrant une perte d'appétit, des difficultés locomotrices ou un isolement seront replacés dans des structures universitaires et euthanasiés pour dissection lors de travaux pratiques ou pour des prélèvements d'organes.

Les souris saines permettent de déterminer la faisabilité in vivo de nouvelles techniques d'acquisition et de publier dans des revues scientifiques le principe de la technique. Après avoir évalué et caractérisé les capacités des techniques de contrôle optimale, d'élastographie et de SRM en terme de sensibilité de détection, reproductibilité des mesures, nous serons à même de préparer une nouvelle demande d'autorisation pour travailler sur des animaux modèles (e. g stéatose, fibrose et cirrhose, ou tumeurs) et d'estimer le nombre optimal d'animaux à utiliser. Les techniques pour l'aide au diagnostic que nous développons sont non invasives: applicables à terme aussi bien à l'homme qu'à l'animal, elles offrent une alternative à la biopsie pour laquelle les risques de complications et de souffrance devraient diminuer.

18419 Intitulé du projet : Exploration de la physiopathologie de la dépression et des mécanismes d'action d'agents antidépresseurs rapides par l'imagerie moléculaire et fonctionnelle à travers un modèle de rat dépressif cortico-induit.

Durée du projet (mois) : 60 mois

Mots-clés : imagerie, dépression pharmaco-résistante, récepteurs 5-HT_{1A}, RAAD, kétamine

Finalité du projet : Ce projet est un projet de recherche fondamentale et translationnelle. Les objectifs sont, par l'intermédiaire de l'imagerie fonctionnelle, de montrer les modifications fonctionnelles cérébrales retrouvées dans la pathologie dépressive et provoquées par les traitements antidépresseurs d'une part, et, d'autre part, de mieux comprendre les mécanismes contribuant aux effets thérapeutiques d'antidépresseurs d'action rapides comme la kétamine ou des molécules agonistes des récepteurs 5-HT_{1A} afin de trouver des alternatives thérapeutiques.

Objectifs et bénéfices escomptés : La dépression est un problème de santé publique majeur. En France, une personne sur cinq est sujette à ces troubles et un tiers des patients touchés sont résistants aux antidépresseurs conventionnels. Des travaux très récents ont montré que la kétamine, et plus particulièrement l'eskétamine, était capable d'agir très rapidement sur les symptômes de la dépression chez les personnes profondément atteintes et résistantes aux traitements classiques. En effet, des essais cliniques ont démontré son efficacité de manière rapide et durable chez les patients en impasse thérapeutique.

Cependant, la kétamine peut provoquer des effets secondaires pouvant être très graves (comme des hallucinations ou des troubles cardiovasculaires) et son mécanisme d'action reste encore mal connu. Une des hypothèses actuelles suggère que l'activation des récepteurs de la sérotonine 5-HT_{1A} serait impliquée dans cette activité antidépressive.

Ainsi, l'utilisation de molécules agissant sur ces récepteurs apparaît comme une piste thérapeutique très prometteuse.

De nouvelles molécules agissant sur cette cible sont en cours de développement telle la molécule α . Ainsi, notre projet consiste, grâce à l'imagerie fonctionnelle, à identifier les mécanismes contribuant à l'effet thérapeutique de la kétamine et de la molécule α afin de développer de nouveaux candidats médicaments pour traiter la dépression.

Le projet vise donc à répondre à plusieurs questions cruciales pour comprendre le mécanisme d'action antidépresseur de la kétamine et de la molécule α dans le but de développer de futures thérapies :

- Quelles modifications fonctionnelles sont retrouvées dans la pathologie dépressive et quelles sont celles provoquées par les traitements antidépresseurs au niveau cérébral ?
- Plus précisément, quels sont les mécanismes contribuant à l'effet thérapeutique de la kétamine ? Quel est le lien avec les récepteurs 5-HT1A ?
- Quels sont les mécanismes contribuant à l'effet thérapeutique de la molécule α , agoniste des récepteurs 5-HT1A ?

Ces différentes expériences, qui font suite à des études menées sur le rat sain, apporteront des résultats importants en vue du développement de la molécule α ou d'autres molécules de même classe thérapeutique comme futur médicament de la dépression pharmaco-résistante.

Nuisances prévues :

Nous utiliserons un modèle de rat dépressif cortico-induit (CORT) par administration chronique de corticostérone pendant 21 jours. Dans la mesure du possible, l'administration de la molécule sera faite par l'eau de boisson favorisant ainsi le bien-être animal. L'évaluation de la mise en place du modèle sera faite par des tests comportementaux de gravité légère et aucun effet indésirable n'est à prévoir hormis une perte de poids légère chez les animaux dépressifs. Ces derniers développeront, par définition, un comportement anhédonique et anxieux. Ce projet, d'une durée de 5 ans, nécessitera un total de 384 rats Sprague-Dawley répartis en 6 procédures de gravité modérée en lien avec la durée de mise en place du modèle (durée maximale de 62 jours par procédure). Une fois le modèle obtenu, nous réaliserons des examens d'imagerie par tomographie par émission de positons (TEP), technique non invasive et d'imagerie fonctionnelle ultrasonore (fUS). Cette dernière technologie innovante, sera réalisée sans réveil car elle nécessite une chirurgie importante. Elle permet de visualiser les modifications de flux sanguin cérébral avec une résolution spatiale et temporelle encore inégalée. Un ensemble de mesures seront prises pour réduire au minimum les effets sur le bien-être des animaux comme un suivi quotidien et l'évaluation de l'état des animaux selon une grille de score. L'administration d'antalgiques pourra être effectuée le cas échéant et une euthanasie précoce sera effectuée en cas d'atteinte de points limites. A la fin des procédures modérées, les animaux seront euthanasiés et des prélèvements plasmatiques et cérébraux seront effectués afin de réaliser des analyses post-mortem.

Application de la règle des 3R :

Règle de réduction : les résultats obtenus permettront de répondre à l'ensemble des questions expérimentales du projet avec une puissance statistique suffisante pour les observations attendues tout en se limitant aux expériences indispensables. L'utilisation de techniques d'imagerie non invasives comme la TEP permet d'effectuer plusieurs examens chez un même animal.

Règle de remplacement : il n'est pas possible de recourir à des modèles in vitro ou in silico pour mener à bien nos expériences car ces modèles sont trop simplistes pour étudier les mécanismes d'action complexes et intégrés de ces différentes molécules. L'utilisation d'un modèle animal est essentielle en termes de fiabilité des résultats et de transposabilité à l'Homme. Toutefois, des études d'autoradiographie post-mortem seront menées in vitro pour obtenir des informations complémentaires, notamment sur l'implication des récepteurs 5-HT1A dans la dépression.

Règle de raffinement : Les animaux seront 3 à 6 au maximum en colonies avec un milieu enrichi. L'administration de la corticostérone se fera en sous-cutanée uniquement si son incorporation dans l'eau de boisson ne fonctionne pas. Les animaux seront surveillés et pesés quotidiennement et le recours à des antalgiques voire à l'euthanasie sera possible par une évaluation selon une grille de score. Il n'y aura pas de réveil des animaux pour les gestes chirurgicaux lourds (procédure 3 et 5).

18420 L'État de Stress Post-Traumatique (ESPT ou PTSD, pour Post-Traumatic Stress Disorder, APA 1994) est une pathologie psychiatrique qui touche 8 à 12% de la population générale et qui se caractérise par une constellation de symptômes qui surviennent après l'expérience d'un événement

traumatique comme un attentat par exemple. Ce traumatisme va provoquer une réaction de peur intense, un sentiment d'impuissance ou d'horreur. La symptomatologie du PTSD apparait au bout de quelques mois, et se caractérise par un syndrome de reviviscence traumatique, un évitement et émoussement affectif et une activation neurovégétative.

L'efficacité des thérapies pharmacologiques (antidépresseurs) ou psycho-cognitive reste cependant limitée. L'amélioration de l'arsenal thérapeutique dans le traitement du PTSD représente donc un enjeu de santé publique majeur. Ces dernières années, les techniques de neurostimulation sont en train d'émerger. Au laboratoire, nous avons mis au point le traitement par Stimulation Transcrânienne Ultrasonore répétée (rTUS) du cortex infralimbique dans le traitement de la dépression et sommes en train de faire de même pour le PTSD. C'est une technique qui offre l'avantage d'être non-invasive. Cependant, l'efficacité à long terme demeure inconnue, ainsi que les mécanismes sous-jacents.

L'objectif de cette étude sera de tester l'efficacité à long terme d'une stimulation rTUS du cortex infralimbique dans le traitement du PTSD. Cette étape est nécessaire pour étudier ensuite les mécanismes sous-jacents.

Pour cette expérience, 120 souris réparties en 4 lots expérimentaux de 30 souris, mâles et femelles en proportions égales par groupe.

En application de la règle des 3 R au modèle utilisé dans cette étude :

Raffinement : le stress traumatique appliqué aux animaux peut être qualifié de moyen, en raison de sa brièveté. Les conditions d'élevage des animaux seront optimales au regard des normes en vigueur. Tous les animaux seront hébergés ensemble, stressés et non stressés, avec enrichissement du milieu (cabanes, smarthome® et tubes). Les expérimentateurs sont experts dans la préhension/contention des souris et sont soucieux d'éviter tout stress inutile lors de la réalisation des procédures. Pendant la stimulation rTUS, les animaux sont sous anesthésie gazeuse, ils sont placés sur une couverture chauffante pour éviter toute hypothermie et leurs cornées sont protégées de la déshydratation par un gel.

Remplacement : aucune méthode alternative in vitro n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée. Le PTSD chez l'animal, comme modèle de pathologie psychiatrique humaine, repose sur l'observation du comportement de l'animal vivant.

Réduction : les effectifs sont optimisés, les observations comportementales nécessitent une taille d'effectifs suffisant compte tenu de la variabilité inter-individuelle (n=30 sujets par groupe mâles et femelles).

18421 Les maladies génétiques représentent aujourd'hui un enjeu de recherche translationnelle mais demeurent encore difficiles à traiter. Parmi elles, la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) qui est une maladie orpheline touche un garçon sur 3500 à la naissance, son pronostic étant systématiquement léthal à 25 ans en moyenne.

Ce projet s'inscrit dans le cadre d'une preuve de concept préclinique visant à démontrer l'efficacité de nouvelles molécules têtes de série dans le rétablissement de la santé des muscles striés squelettiques lésés dans la DMD. Les têtes de séries auront été préalablement identifiées par criblage à haut débit dans un modèle in vitro et optimisées dans leur composition et leur formulation pour permettre l'administration in vivo. Les composés seront testés dans un modèle de rat DMD ainsi que sur des témoins sains. Les rats myopathes DMD créés au laboratoire ont l'avantage de récapituler fidèlement les symptômes de la pathologie DMD humaine. L'espérance de vie de cette lignée est plus courte d'environ 60% par rapport à la lignée sauvage. Cela s'explique par son vieillissement musculaire accéléré aboutissant à une mort prématurée pour cause d'affaiblissement musculaire généralisé et en particulier de défauts cardio-respiratoires. Les avancées de ce plan de recherche préclinique permettront de déboucher sur le développement de candidats/médicaments. Ils seront alors développés pour une utilisation en clinique en tant que traitement de cette pathologie rare de l'enfant et du jeune adulte.

Cette étude a donc pour objectif de décrire de manière quantifiée et exhaustive l'effet de trois composés pré-sélectionnés par des tests in vitro par notre partenaire, sur la progression de la

pathologie DMD dans notre modèle de rat DMD. Les composés seront testés par injection i. p ou per os pendant 4 semaines chez les rats DMD soit précocement lorsque les sujets sont encore asymptomatiques soit plus tardivement lorsque la maladie est déjà établie pour voir s'il est possible de freiner/réverser le développement de la maladie. Cette étude utilisera un total de 156 rats au maximum, traités de 4 semaines à 6 mois ou de 5 à 12 mois et comparés à des rats DMD et à des rats sains traités avec la solution véhicule contrôle, suivis de la même manière et sur la même période. Ce nombre d'animaux a été réduit au minimum en tenant compte de la variabilité observée dans une population de rats DMD tout en ayant suffisamment de matériel pour réaliser toutes les analyses biologiques nécessaires à l'évaluation du traitement sur le décours de la maladie. Cette étude a été établie avec un minimum de rats afin d'obtenir un échantillonnage permettant d'obtenir une puissance statistiquement significative. L'estimation du nombre de rats se base sur le savoir-faire acquis par les expérimentateurs de notre structure et incluant les risques de pertes liées aux manipulations.

A l'issue de la période de traitement de 4 semaines, les rats subiront des tests physiques permettant de ségréger les rats présentant une amélioration des symptômes. En cas d'amélioration d'un des groupes, tous les rats recevront jusqu'à deux cycles supplémentaires de traitement quotidien afin d'augmenter l'effet bénéfique observé. A chacun de ces cycles, les animaux subiront les mêmes tests physiques. A l'issue du dernier cycle, ou en cas d'absence d'effet bénéfique du traitement à la fin d'un des cycles précédents, les animaux seront mis à mort. Leur sang sera prélevé avant sacrifice et les muscles seront prélevés pour des études histologiques et moléculaires.

Pour limiter le stress, les rats seront évalués à l'aide de différentes mesures non invasives dérivées de méthodes utilisées chez les patients et adaptées aux rats. Les rats seront habitués aux manipulations dès leur plus jeune âge et seront hébergés par 2-3 individus selon l'âge dans des cages contenant des enrichissements correspondant à leur espèce. Ils seront observés quotidiennement afin de suivre au plus près les éventuelles complications liées à leur maladie. Des points limites précis et suffisamment précoces pour leur éviter toute souffrance prolongée et inutile ont été définis. Un effet bénéfique étant attendu sur l'ensemble des paramètres évalués (croissance, mobilité, force, longévité), cette étude permettra de déterminer précisément le niveau de cet effet. Les expérimentations in vivo sont maîtrisées et ne devraient a priori pas entraîner d'effets secondaires avec les composés utilisés cependant une attention particulière sera portée à la tolérance du traitement et surtout à celle des manipulations quotidiennes en terme de bien-être animal. Nous effectuerons en priorité le traitement sur les animaux jeunes, si la manipulation quotidienne notamment l'administration per os s'avérait trop stressante et délétère pour les animaux lors du premier cycle, le protocole serait revu avant de pratiquer les cycles suivants ainsi que l'expérimentation sur les groupes d'animaux âgés qui sont plus fragiles.

Les effets biologiques recherchés ne permettent pas le remplacement du modèle animal par un quelconque modèle in silico ou in vitro. Effet, ici l'effet des molécules testées sont hautement tributaires de leur biodisponibilité, temps de demi-vie et activité dans un organisme complexe. De plus leur application finale est d'impacter directement la structure musculaire qui ne peut être observée que dans un mammifère vivant.

Les traitements qui seront testés dans ce projet sont tous perçus, à l'issue de tests in vitro, comme susceptibles d'améliorer la survie et/ou la qualité de vie et/ou la santé musculaire des animaux traités. Concernant l'administration de composés, l'injection I. P ou le gavage seront effectués par un expérimentateur averti afin de diminuer le stress lié au traitement répété dans le temps.

18422 La Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie génétique qui touche le muscle chez l'enfant, provoquant une faiblesse musculaire généralisée et évolutive. Les patients sont contraints à l'usage du fauteuil roulant vers l'âge de 10 ans, et décèdent d'insuffisance respiratoire ou cardiaque vers l'âge de 30 ans. Il n'existe pas, à ce jour, de solution thérapeutique curative sur le marché pour la DMD. Les modèles in vitro ne permettent de valider que les premières étapes de l'élaboration de nouveaux médicaments et il faut ensuite envisager un passage sur les modèles animaux. De plus le modèle souris couramment employé (souris mdx) n'est pas satisfaisant car il ne reproduit pas fidèlement l'ensemble de la symptomatologie de la maladie humaine contrairement

au chien GRMD (Golden Retriever Muscular Dystrophy), qui reproduit de manière fidèle les manifestations cliniques et fonctionnelles rencontrées chez les patients mais qui nécessite des infrastructures particulières coûteuses et un suivi vétérinaire lourd contraignant.

Pour pallier au manque de modèle fidèle à la maladie et de taille moyenne, nous avons développé un modèle de rat myopathe qui mime fidèlement la symptomatologie des patients DMD et représente donc un modèle de taille raisonnable à développement rapide permettant la validation préclinique de potentiels traitements.

Cette étude a pour objectif de décrire de manière quantifiée et exhaustive l'effet de deux stratégies de thérapie génique permettant l'expression d'une protéine tronquée mais fonctionnelle permettant d'alléger le phénotype de la DMD. Les constructions pour ces deux stratégies ont été intégrées dans un vecteur viral et seront administrées par une injection intraveineuse unique chez les rats DMD soit précocement (4 semaines) lorsque les sujets sont encore asymptomatiques soit plus tardivement lorsque la maladie est déjà établie (3 mois) pour voir s'il est possible de limiter son développement voir de le stopper. Cette étude utilisera un total de 160 rats, qui seront traités de l'âge de 4 semaines jusqu'à l'âge de 6 et 12 mois ou de l'âge de 3 mois jusqu'à l'âge de 9 mois et comparés à des rats DMD et des rats sains traités avec un vecteur viral contrôle commun aux deux stratégies, suivis de la même manière et sur la même période. Ce nombre d'animaux a été réduit au minimum en tenant compte de la variabilité observée dans une population de rats DMD tout en ayant suffisamment de matériel pour réaliser toutes les analyses biologiques nécessaires à l'évaluation de la maladie. Pour limiter le stress, les rats seront évalués à l'aide de différentes mesures non invasives dérivées de méthodes utilisées chez les patients et adaptées aux rats avec des friandises en récompense. Les rats seront habitués aux manipulations dès leur plus jeune âge et seront hébergés par 2-3 individus selon l'âge dans des cages contenant des enrichissements correspondant à leur espèce. Ils seront observés quotidiennement afin de suivre au plus près les éventuelles complications liées à leur maladie. Des points limites précis et suffisamment précoces pour leur éviter toute souffrance prolongée et inutile ont par ailleurs été définis. Un effet bénéfique est attendu sur l'ensemble des paramètres évalués et cette étude permettra de déterminer précisément le niveau de cet effet.

18423 L'accident vasculaire cérébral (AVC) est une atteinte neurologique soudaine, secondaire à une lésion vasculaire. On peut distinguer 2 type d'AVC : l'AVC ischémique ou infarctus cérébral (85% des cas), et l'AVC hémorragique (15% des cas). Les hémorragies cérébrales (HC) représentent 10 à 30 % des AVC, soit environ 25 000 nouveaux cas par an. Les HC sont à l'origine d'une très lourde morbi-mortalité, avec une mortalité précoce de plus de 40% à 30 jours dont la moitié des décès surviennent dans les 48 premières heures. Seuls 20% des patients seront autonomes à 6 mois. Le mauvais pronostic des hémorragies cérébrales est directement lié à la croissance de l'hématome ainsi qu'aux complications survenant à la phase aiguë (hypertension intracrânienne, hydrocéphalie aiguë et crises convulsives). L'objectif thérapeutique principal est de contrôler la croissance de l'hématome et ses complications neurologiques. Pour cela, une des stratégies thérapeutiques appliquées en clinique est de pouvoir lyser l'hématome intracérébral à l'aide d'un traitement fibrinolytique afin de pouvoir évacuer le sang par drainage.

A l'heure actuelle, l'agent pharmacologique utilisé en clinique est l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA), toutefois cette molécule présente de nombreuses contraintes à son utilisation liée au fait de ses effets secondaires.

Le but de ce projet est de tester une nouvelle molécule innovante qui semble plus efficace et dont l'utilisation devrait être plus sûre du fait de la forte réduction des effets secondaires comme cela a pu être démontré par des études in vitro.

Pour ce projet, un modèle d'hémorragie cérébrale chez le porc sera réalisé afin de produire un hématome autologue dans le parenchyme cérébral. Le produit d'intérêt sera injecté à la dose équivalente prescrite chez l'homme et son influence sur la lyse de l'hématome sera évaluée grâce à l'imagerie IRM.

Remplacement : Cette étude chez le porc devrait permettre un transfert rapide vers l'homme. En effet, le fait de démontrer un effet bénéfique du traitement suite à une hémorragie intracérébrale chez le porc (espèce supérieure proche de l'homme) serait une première phase avant d'effectuer des premiers essais chez l'homme. Le remplacement de l'utilisation des animaux n'est pas possible car l'étude se fait chez un organisme vivant ou le propre sang est à l'origine de l'hématome cérébral (résultat en clinique d'un AVC hémorragique).

Réduction : Le nombre d'animaux nécessaire est néanmoins réduit et l'étude prévoit maximum 20 porcs. Si les résultats d'imagerie sont concluants avec un pool d'animaux moindre, l'étude sera arrêtée.

L'estimation du nombre d'animaux utilisé est principalement basée sur le nombre d'animaux nécessaire pour réaliser une analyse statistique pertinente des données et limiter la variabilité inter-individus.

Raffinement : Au cours de cette étude, toutes les dispositions seront prises afin de réduire au maximum la souffrance et le stress de l'animal. L'étude est menée par du personnel formé et expérimenté, sensible au bien-être et soins spécifiques des animaux. De plus, les animaux seront anesthésiés pendant toute l'expérience et bénéficieront de l'analgésie complémentaire spécifique. Toutes les précautions d'hébergement pour réduire le stress des animaux seront prises et permettre leur bien-être. Les animaux seront hébergés 2 par 2 dans des boxes contrôlés en hygrométrie (50-60%) et température (19-21°C) et un cycle jour/nuit (6h45 – 18h45).

18424 L'équipe s'intéresse au contrôle hormonal et/ou nutritionnel des sécrétions des cellules du tissu adipeux et leur implication dans les dysrégulations métaboliques associées à l'obésité (diabète, certaines maladies rares, le cancer, le vieillissement). Les conditions de fonctionnement des tissus/organes peuvent être profondément altérées dans des situations d'adaptation physiologique (surcharge pondérale), de perte de fonctionnalité (insulino-résistance, inflammation, vieillissement) ou pathologiques (obésité, diabète, accumulation de lipides dans le foie (=stéatose)). Chacun des tissus clefs de la régulation énergétique (tissu adipeux, foie, muscle) sécrète des molécules (dites "tissue-kines") capables d'agir de façon locale ou dans le sang. Notre connaissance/expertise en matière de sécrétion/régulation et de réponse métabolique aux hormones, nous amène à explorer plus avant les effets de nouvelles molécules bioactives capables d'interagir avec les récepteurs/systèmes de reconnaissance des "tissue-kines" et leurs potentielles capacités à contrer certains des désordres liés aux dysfonctions métaboliques. Tester les effets biologiques de ces molécules bioactives (d'origine naturelle ou synthétiques) et la régulation / modulation de leurs effets nous permet de proposer des cibles originales. Dans ce but, nous utilisons des animaux (souris mâles ou femelles car la différence de réponse au régime hypercalorique selon le sexe est à prendre en compte) dont l'alimentation permet une surcharge énergétique (régimes riches en graisse et/ou en sucre) entraînant la mise en place d'une obésité et le développement progressif de désordres de la régulation de la glycémie (résistance à l'insuline, diabète). De manière à évaluer l'efficacité de nouvelles molécules bioactives, ces dernières peuvent être administrées par voie orale, intra-péritonéale ou sous-cutanée. L'administration de ces molécules peut intervenir soit lors de la mise en place de l'obésité, en parallèle au régime (on parlera de molécule à action préventive) ou une fois la pathologie installée (on parlera de molécule à action curative). Divers paramètres physiologiques seront suivis de façon non invasive lors des expérimentations (prise de poids, mesure de la prise alimentaire/hydrique, pourcentage de masse grasse, comportement, activité physique...), dans certains cas une prise de sang de petit volume permettra de suivre des index métaboliques (glycémie et taux d'insuline dans le sang lors de tests fonctionnels). Enfin au sacrifice une étude précise des paramètres sanguins mais également tissulaires sera effectuée. De tels protocoles n'entraînent aucune souffrance animale car les animaux sont mis à mort avant que les désordres métaboliques provoqués n'engendrent une quelconque invalidité. Compte tenu de la variabilité des paramètres biologiques généralement observée au sein d'un groupe et de la durée des protocoles, des groupes de 8 animaux seront formés afin de pouvoir mettre en évidence des différences statistiques (principe de réduction). L'ensemble du projet nécessitera au maximum 1104 souris (mâles et femelles), en comptant les mises au point des protocoles (choix de la dose par

exemple). Nous travaillerons sur des souris adultes qui répondent bien au régime gras. Leur utilisation sera répartie sur différentes expérimentations : 6 molécules à tester au cours des cinq prochaines années.

Les procédures seront réalisées dans le respect du bien être animal pour limiter la souffrance, la douleur ou l'angoisse des animaux (les souris seront hébergées par cages de 4, des carrés de ouate seront placés dans les cages pour leur permettre de faire un nid et le cas échéant - agressivité -, des igloos seront ajoutés dans les cages), et en respectant des points limites préalablement définis (une perte de poids atteignant 20%, un comportement anormal grave - arrêt d'alimentation -, un mutisme de plus de 24 h conduiront à un arrêt d'urgence de l'expérimentation). L'observation quotidienne des animaux sera réalisée par du personnel qualifié de la zootechnie et de l'équipe de recherche.

18425 L'objectif scientifique de ce projet concerne l'évaluation de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée à partir d'un modèle basé sur la toxicité cardiaque de la radiothérapie externe. La radiothérapie est un standard thérapeutique dans de nombreux cancers et malgré les efforts pour épargner les organes tel que le cœur, le cœur est souvent irradié. Les doses de radiothérapie utilisées dans les cancers thoraciques ou le cancer du sein, sont corrélées de manière positive au risque d'insuffisance cardiaque (IC). Dans la majorité des cas, les patients développent une entité particulière d'insuffisance cardiaque dite à « fraction d'éjection préservée » (IC-FEP). L'IC-FEP représente approximativement la moitié de tous les cas d'IC et est amené à augmenter dans les prochaines décennies sous l'effet notamment du vieillissement de la population.

Contrairement l'IC à fraction d'éjection réduite (ICFER), aucun traitement efficace de l'IC-FEP n'a encore été développé, la physiopathologie de cette entité demeurant encore peu comprise. Le mécanisme initial soupçonné est une dysfonction endothéliale de la microcirculation, phénomène qui est aussi observé après radiothérapie. Actuellement, aucun modèle préclinique d'IC-FEP présentant des caractéristiques proches de la maladie humaine n'est disponible pour étudier les mécanismes physiopathologiques sous-jacents et évaluer de nouvelles thérapeutiques. A fortiori aucun modèle n'a été développé ayant recours à la radiothérapie.

Ce projet sera décliné en 3 volets. Il propose l'ensemble des procédures permettant (i) de caractériser un nouveau modèle in vivo d'IC-FEP secondaire à la radiothérapie, (ii) de développer une imagerie par résonance magnétique du sodium pouvant s'appliquer à ce modèle, et (iii) d'évaluer une nouvelle thérapeutique dans ce modèle. Dans ce cadre, le remplacement de l'utilisation des animaux est impossible. Afin de pouvoir analyser plus finement l'imagerie cardiaque et notamment pour des raisons de résolution spatiale liée à l'imagerie du sodium, le rat (plus gros que la souris) a été choisi comme espèce animale. Le remplacement de l'utilisation d'animaux n'est donc pas envisageable, ces informations nécessaires au projet ne peuvent pas être fournies par des modèles ex vivo.

Se basant sur le principe de réduction du nombre d'animaux nécessaires au projet, l'ensemble du projet inclura 130 animaux. Premièrement, au maximum 30 animaux seront utilisés pour caractériser le modèle. Parmi eux un groupe de 20 irradiés versus 10 non irradiés. Dans le groupe irradié deux schémas d'irradiation correspondant à des groupes de 10 seront constitués. Quinze animaux seront également utilisés afin de mettre au point l'imagerie cardiaque par résonance magnétique du sodium in vivo. Cinq animaux seront également utilisés pour la mise au point de la technique d'autoradiographie. Deuxièmement, une évaluation thérapeutique sera effectué avec un premier bras d'un maximum de 40 animaux bénéficiant du schéma d'irradiation le plus adapté une fois le modèle validé. Parmi eux, un groupe de 20 animaux recevraient un traitement médical et 20 animaux recevraient un placebo. Parmi chaque groupe de 20 animaux, 3 sous-groupes seraient constitués avec un suivi spécifique. Un premier sous-groupe de 10 aura une évaluation par cathétérisme cardiaque (évaluation de la fonction diastolique et des pressions de remplissages), un sous-groupe de 5 aura une évaluation du métabolisme du glucose en TEP-FDG et un dernier sous-groupe de 5 aura une évaluation de la perfusion en TEP-NaF. Un deuxième bras d'évaluation thérapeutique sera composé d'un maximum de 40 animaux diabétiques avec une répartition en groupes et sous groupes identique au premier bras. Tous les animaux auront un suivi en

échographie et en IRM afin d'évaluer la fonction contractile et le remodelage myocardique, une évaluation fonctionnelle à l'effort par un test de marche, et seront mise à mort pour une évaluation histologique de la fibrose.

Concernant le raffinement des conditions expérimentales, les animaux seront hébergés dans des cages standards aux normes européennes (type IV) avec une pression de 20-25Pa avec un renouvellement de 25 fois le volume d'air de la pièce toutes les heures et une température de $21^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$. L'exposition à la lumière sera de 6h45 à 18h45. La nourriture, la boisson et la litière seront changées une fois par semaine. La litière de peuplier "aspen small", plus douce et variée pour les animaux permet de réduire le niveau de stress. Cette litière est plus chère mais possède les avantages d'être peu poussiéreuse, moins allergisante que le résineux. Les animaux sont hébergés par groupe de 2 afin de conserver les interactions sociales. La litière est enrichie avec de la litière cellulose Alpha Dry permettant la confection de nid. Un suivi régulier est effectué pendant tout l'hébergement des animaux en protocole par du personnel formé et expérimenté.

18426 Le système immunitaire dialogue constamment avec les tissus de l'organisme. Le dialogue du système immunitaire avec le système nerveux périphérique est peu étudié même si de nombreuses études montrent que l'inflammation est liée à la douleur et vice-versa. Néanmoins, il est connu de longue date que les enképhalines (substances anti-douleurs) sont produites par certaines cellules du système immunitaire et exercent leurs fonctions sur la nociception (perception de la douleur). Notre récente observation que Penk (la proenképhaline, à l'origine de la production de certaines de ces enképhalines) est particulièrement présente dans les lymphocytes T régulateurs (Treg, acteurs majeurs de la régulation de l'inflammation) soulève l'hypothèse que les enképhalines pourraient aussi posséder des propriétés anti-inflammatoires. C'est cette hypothèse que nous voulons tester à travers les différentes procédures expérimentales décrites dans ce projet. Nous disposons de souris déficientes pour le gène Penk et nous générerons des souris déficientes en Penk uniquement dans les Treg, suite à une greffe de moelle osseuse dans des souris immunodéficientes. Nous observerons l'effet d'un tel déficit sur le développement de tumeurs greffées à ces souris. Si Penk joue un rôle dans la régulation de l'inflammation par les Treg, les tumeurs devraient être plus petites dans les souris dépourvues de Penk dans les Treg. Pour confirmer ce rôle, nous établirons un modèle de colite auto immune par transfert adoptif de lymphocytes T dans des souris immunodéficientes. La co injection de Treg suffisant ou déficient en Penk nous permettra de juger directement de leurs capacités anti-inflammatoires. L'ensemble des résultats de ce projet nous permettra de proposer un nouveau mécanisme d'action des lymphocytes T régulateurs murins, avec de possibles implications thérapeutiques chez l'homme.

Ce programme de recherche est développé dans le respect de la règle des 3R même si il est impossible de remplacer la souris par un modèle in vitro pour l'instant. En effet, le projet utilise des souris génétiquement modifiées pour évaluer le rôle des enképhalines dans différentes pathologies (greffe de tumeurs, colite auto immune) dont la complexité biologique ne peut être modélisée in vitro. Il est tiré profit de chaque animal pour nous apporter le maximum d'informations. Si possible, nous utilisons les données de manière transversale entre les protocoles afin de réduire le nombre d'animaux. Les groupes d'études sont faits le plus souvent en même temps afin de réduire le nombre de groupes témoins. Et enfin nous cherchons à raffiner au maximum nos protocoles pour limiter la souffrance animale ainsi que les variations individuelles qui peuvent en découler. C'est pourquoi nous planifions une semaine d'acclimatation des souris à leur environnement avant de procéder aux expériences, un enrichissement du milieu pour éviter le stress des souris, une surveillance journalière des animaux pour détecter la souffrance et la définition de points limites clairs et précis.

Considérant l'ensemble de ces procédures appliquées sur la diversité des protocoles expérimentaux, nous estimons nos besoins minimums à 180 souris pour l'ensemble de ce programme de recherche qui va se dérouler sur les 5 prochaines années.

18427 Le système immunitaire a un rôle prépondérant dans l'élimination des cellules cancéreuses, mais c'est aussi en partie lui le responsable de l'échappement tumoral. Ces dernières années, la

compréhension des différents acteurs d'une réponse inflammatoire que ce soit dans le cas d'auto-immunité, de rejet d'organes, ou de réponse anti-tumorale a mis en évidence l'équilibre entre l'activation et l'inhibition de cette réponse. Cet équilibre est maintenu par des populations effectrices telles que les lymphocytes T, les lymphocytes B ou encore les NK et des populations régulatrices telles que les lymphocytes régulateurs ou les cellules myéloïdes suppressives, principaux médiateurs du développement tumoral et de la rechute dans le cas du cancer. Les traitements d'immunothérapie actuels visent à contrebalancer cet équilibre. Dans le cas du cancer, les thérapies cherchent à améliorer l'action des cellules T effectrices ainsi qu'à inhiber la fonction des cellules régulatrices. La voie PD-1/PD-L1 a un rôle majeur dans l'inhibition de la réponse des lymphocytes T. Des anticorps ciblant cette voie PD1/PD-L1 (Nivolumab, Pembrolizumab, Avelumab) ont été générés pour réactiver la réponse T antitumorale et ont démontré des effets bénéfiques considérables dans le traitement de divers cancers. Ces essais cliniques ont été rendus possibles grâce à la preuve de concept sur des modèles précliniques. Aujourd'hui, ces anticorps anti-PD-/PD-L1 sont approuvés comme agents thérapeutiques de première ligne pour certains cancers du poumon et de la peau. Cependant il est estimé que seulement une partie des patients (15-60% selon le cancer) répondent à la thérapie et que plusieurs rechutes sont observées après traitement. Il est donc essentiel de chercher d'autres molécules et combinaisons thérapeutiques.

Dans le but de potentialiser l'effet des anti-PD-1/PD-L1, nous avons généré de nouveaux formats d'anticorps dit « bispécifiques » en fusionnant un anticorps anti-PD-1 à une molécule costimulatrice de la réponse T. Dans une précédente étude, nous avons testé in vivo dans des modèles de cancer chez la souris l'effet thérapeutique de ces anticorps bispécifiques. Nos résultats in vitro et in vivo montrent que nos anticorps bispécifiques stimulent la réponse cellulaire T et favorisent une réponse antitumorale durable par rapport à un anticorps anti PD-1 monospécifique. Dans cette saisine, nous proposons de réaliser une étude pharmacocinétique et pharmacodynamique (PK/PD) de ces nouvelles molécules bi-spécifiques dirigés contre des cibles humaines, dans un modèle pré-clinique de primates non humains. Nous réaliserons avec les mêmes prélèvements un bilan sanguin complet (bilan hépatique, biochimique et Numération formule sanguine) dans le but d'évaluer l'effet de nos molécules sur le système immunitaire et la biologie des macaques. Ainsi, un maximum d'analyses seront réalisées de façon à optimiser au mieux les procédures. Cette étape est nécessaire avant d'envisager un éventuel transfert chez l'homme, le système immunitaire de ces animaux étant très proches de celui de l'homme.

Pour ce projet de 3 ans, le nombre maximum d'animaux utilisés sera de 24 macaques pour tester 5 anticorps : 1 monospécifique (faisant office de référence) et 4 bi-spécifiques différents à différentes doses. Dans un souci du respect de la règle des 3R, les animaux testés seront leur propre contrôle, de façon à pallier d'éventuelles variations interindividuelles, ainsi les valeurs de différents paramètres sanguins et biologiques analysés après injection de la molécule d'intérêt seront comparées aux valeurs individuelles avant injection, permettant d'obtenir un maximum d'informations à partir d'un minimum d'animaux. De plus, si les résultats de la dose n°1 de l'anticorps sont satisfaisants, l'anticorps à la dose n°2 ne sera pas testé.

Bien que nous ayons réduit le nombre d'animaux à son maximum, le modèle primate est indispensable à ce stade de notre étude et ne peut être remplacé par un autre système : effectivement, l'effet des molécules doit être évalué au niveau de l'organisme entier, et le primate correspond au modèle le plus proche de l'homme par son métabolisme, son système immunitaire et sa physiologie.

De façon à diminuer le stress, la souffrance, et la douleur, toutes les procédures seront réalisées chez ces animaux sous anesthésie générale et un traitement analgésique leur sera donné de façon adaptée en fonction de la procédure. Les animaux seront hébergés avant le protocole expérimental en volière, de façon à préserver leur mode de vie en communauté. Au cours du protocole expérimental les individus traités seront hébergés dans des cages séparées, mais jointives permettant la vision et la communication entre congénères. De plus, un enrichissement alimentaire, d'activité et d'aménagement des cages spécifiquement à l'espèce, est mis en place de façon compatible à la procédure.

18428 L'hémophilie A est une maladie de la coagulation du sang qui concerne environ 6000 personnes en France. Elle est due à l'absence d'une molécule de la coagulation, le facteur VIII (FVIII). Le traitement des saignements chez les patients atteints d'hémophilie A se fait par injection de FVIII thérapeutique. L'utilisation de FVIII thérapeutique se heurte à plusieurs écueils. La molécule est extrêmement chère, ce qui exclut du traitement une large portion des patients hémophiles A dans le monde (près de 70%). Après son injection aux patients, le FVIII est éliminé très rapidement, ce qui oblige à traiter les patients au moins tous les deux ou trois jours. Enfin, chez près de 30% des patients, ce médicament entraîne l'apparition d'anticorps bloquants qui rendent le traitement inefficace. Dans notre projet, nous souhaitons générer de nouvelles molécules de FVIII dont la présence dans le sang est augmentée et dont l'immunogénicité, soit sa capacité à induire une réponse immunitaire, est réduite. La validation de ces nouvelles molécules nécessite leur essai dans des modèles murins d'hémophilie A. Seuls des résultats préliminaires positifs chez la souris permettront d'envisager leur essai chez l'homme.

Pour ce projet d'une durée de 3 ans, nous prévoyons d'utiliser un nombre maximum de 397 souris. Les expériences sont planifiées en accord avec la règle des 3R :

Remplacement : le projet fera appel à différents modèles expérimentaux chez la souris. En effet, seule une approche expérimentale in vivo permet de rendre compte de la complexité des systèmes biologiques. Toutefois, des expériences préliminaires seront réalisées in vitro afin de déterminer les meilleurs candidats de mutants du FVIII à tester chez l'animal.

Réduction : Le nombre de répétition des expériences sera défini de manière rationnelle : si une expérience donne des résultats statistiquement significatifs avec une puissance appropriée, elle ne sera pas répétée, sinon elle sera répétée une à deux fois maximum. Les organes, sérum et cellules des souris euthanasiées en fin d'expérience sont conservés; ainsi, aucune expérience supplémentaire ne doit être faite si des questions nouvelles surviennent.

Raffinement : les souris seront hébergées en accord avec les lois d'éthique françaises. Les animaux seront contrôlés quotidiennement pour évaluer et réduire au maximum tout risque de douleur. Des points limites ont été définis pour chaque procédure expérimentale. Les animaux malades seront soignés ou euthanasiés. Les conditions de vie seront améliorées au maximum (5 souris maximum par cage, ajout de nids végétaux et de tunnels en carton). Un anesthésique sera administré chaque fois qu'un geste susceptible d'entraîner une douleur sera pratiqué.

18429 La mémoire de travail est un type de mémoire qui nous permet de retenir et de manipuler une quantité limitée d'informations pendant un temps relativement court. Elle nous permet de stocker ces informations durant quelques secondes tout en exécutant d'autres tâches. Ce type de mémoire nous permet ainsi par exemple de prendre des notes écrites durant une présentation orale. La mémoire de travail joue un rôle important dans l'apprentissage, comme l'apprentissage d'une langue, et dans différents types d'activités comme la lecture et la résolution de problèmes. Ce type de mémoire implique différentes régions cérébrales qui interagissent entre elles. Chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, un déficit de la communication entre ces régions cérébrales entraîne une détérioration de la mémoire de travail. L'étude de l'interaction entre ces différentes aires est donc importante pour comprendre son fonctionnement dans un cerveau sain mais également dans les pathologies associées. L'objectif de ce projet est de disséquer au niveau des neurones comment les informations provenant de différentes aires cérébrales sont traitées. Nous utilisons des approches d'enregistrement de l'activité in vitro, l'électrophysiologie, pour mesurer les courants électriques qui permettent aux neurones de communiquer entre eux chez la souris. Cette espèce de mammifère, facile à élever et à reproduire dans des conditions contrôlées, est très utilisée en neurosciences car l'organisation de leur cerveau est proche de celle du cerveau de l'homme. Les animaux auront préalablement subi une chirurgie cérébrale pour exprimer des molécules sensibles à la lumière, les opsines (technique d'optogénétique), pour activer de manière sélective certaines connexions qui innervent une zone cérébrale centrale pour la mémoire de travail, le cortex pariétal postérieur. Après prélèvement des cerveaux, la force des connexions neuronales et les mécanismes de traitement de l'information seront étudiés ce qui nous permettra de progresser dans la connaissance de la physiologie de la mémoire de travail.

Justification du respect de la règle des 3R.

Remplacer : ce projet nécessite l'utilisation d'animaux. En effet à ce jour il n'existe pas encore de méthodes alternatives, l'étude de la communication entre différentes aires cérébrales nécessite l'utilisation d'un cerveau intact.

Réduire : ce projet utilisera 200 souris C57BL6/J durant 2 ans. Nos groupes expérimentaux seront dimensionnés pour utiliser le plus petit nombre possible d'animaux tout en obtenant des statistiques solides.

Raffiner : nous soulagerons les douleurs générées durant les chirurgies en administrant les molécules antalgiques les plus adaptées. Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de leur vie avec une surveillance quotidienne par du personnel compétent. Ils auront accès en permanence à l'eau et à de la nourriture de qualité constante, préparée spécifiquement pour leurs besoins physiologiques. Ils seront hébergés en groupe sociaux dans des hébergements enrichis avec des éléments qui leur permettront de reproduire leurs comportements naturels. Dans le cadre de leur suivi quotidien comme au cours des procédures, des points limites seront définis pour éviter ou limiter toute souffrance.

18430 Le cerveau analyse continuellement les informations de l'environnement qui nous entoure afin d'adapter notre comportement aux différentes situations de notre vie courante. Les émotions qui lui sont associées sont parmi les informations les plus critiques et nous permettent de savoir si on est en danger ou si on est en sécurité est primordial pour notre survie. L'objectif de ce projet est d'identifier les circuits neuronaux impliqués dans les émotions et de mieux en comprendre les mécanismes afin de déterminer comment cette information est utilisée pour la prise de décision chez la souris. L'utilisation d'un modèle comportemental chez le rongeur permettant l'étude de ces circuits neuronaux permettra à terme l'avancée de nos connaissances dans ce champ d'étude. Ceci pourrait nous éclaircir sur la physiopathologie et le développement de nouvelles cibles thérapeutiques pour des maladies comme le trouble anxieux généralisé ou le syndrome de stress post-traumatique.

Les animaux subissent une chirurgie peu douloureuse. Une fois leur récupération complète, elles passent un protocole d'apprentissage d'une tâche en réalité virtuelle où deux contextes seront présentés, un agréable et l'autre peu agréable. Les souris devront ensuite faire un choix en fonction du contexte et leur comportement sera étudié ainsi que les structures cérébrales activées. La durée totale du protocole dépendra de l'apprentissage de chaque souris et ne devrait pas excéder 8-12 semaines selon des études précédentes.

Justification du respect de la règle des 3R

Remplacer: ce protocole nécessite l'utilisation d'animaux. En effet, l'identification des circuits neuronaux impliqués dans les émotions et la prise de décision nécessitent l'utilisation d'un cerveau intact chez l'animal vigile. Des méthodes in vitro telles que la culture cellulaire ou bien les coupes de cerveau ne contiennent pas les connexions neuronales qui sont le sujet de nos travaux. Il n'existe donc pas de méthodes alternatives.

Réduire: le nombre d'animaux a été calculé par l'estimation de la variance observée avec ce type de données permettant d'atteindre une signification statistique. Ce nombre est donc de 15 souris par groupe. La réalisation de cette étude nécessite un total de 48 groupes, soit 720 souris.

Raffiner: A leur arrivée, les animaux sont mis en cage par l'animalier qui effectue un premier contrôle de leur état de santé. Ensuite ils bénéficient d'une période d'acclimatation de 15 jours et sont placés dans de cages collectives, couvertes de grilles et équipées de mangeoires aluminium et d'un enrichissement constitué d'un nid végétal. Ces cages offrent aux animaux un espace important pour se redresser. A la suite de cette période d'acclimatation, les animaux sont placés en cages individuelles en ajoutant de l'enrichissement supplémentaire (carré de coton ou « frisures » de papier kraft) pour réduire le stress engendré par l'hébergement individuel. Le change des cages souillées par des cages propres est effectué une fois par semaine. Les animaux ont un accès ad libitum à la nourriture et à l'eau (sauf test comportemental). Enfin, les souris sont habituées aux

diverses manipulations nécessaires à la réalisation du projet afin de prévenir tout stress non nécessaire.

Les chirurgies sont réalisées sous anesthésie générale (gazeuse). Un traitement antalgique est systématiquement administré avant et trois jours après les actes chirurgicaux. Pour limiter les dommages et contraintes subis par l'animal, nous avons définis des critères d'observation qui permettent d'évaluer l'état de santé et bien-être. Cette évaluation est réalisée régulièrement à partir du moment où l'animal est isolé en cage individuelle et rentre dans la phase expérimentale. Ces mesures ont lieu lors de la manipulation journalière des animaux. Les mesures sont enregistrées dans un cahier d'expérience prévu à cet effet.

18431 Dans les processus inflammatoires de type « orage cytokinique », tels que ce qui est observé chez les patients COVID-19, peu ou pas de médicament efficace n'est aujourd'hui disponible.

Notre équipe a développé une molécule de synthèse, que nous appellerons Mx; cette molécule réduit l'inflammation dans des modèles représentatifs de septicémies et de ces « orages cytokiniques » que l'on retrouve dans plusieurs pathologies. A des doses efficaces, cette nouvelle classe de molécules n'induit aucune toxicité dans des cellules humaines en culture et chez la souris.

Ainsi, nous souhaitons valider l'activité biologique de notre molécule la plus puissante dans un modèle murin d'infection virale pulmonaire. Nous allons étudier l'efficacité de la molécule Mx notamment sur la survie et le rétablissement des souris après infection par le virus de la grippe. Nous analyserons également la composition des cellules immunitaires dans le poumon et le profil des protéines dites cytokines (jouant un rôle dans l'inflammation) des souris traitées ou non par la molécule Mx, après infection.

L'effet bénéfique escompté est une augmentation significative de la survie et la récupération des souris permettant d'envisager une nouvelle approche thérapeutique dans les complications sévères des maladies telles que l'infection au coronavirus SARS-CoV-2.

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

Remplacement : nous avons dans un premier temps réalisé des expériences in vitro qui nous ont permis d'étudier le mécanisme d'action de la molécule mais seul un modèle vivant tel que la souris, récapitulant la complexité du vivant permettra de vérifier l'efficacité thérapeutique des molécules d'intérêt et leur effet sur la réponse antivirale, l'inflammation et sa régulation.

Réduction : Pour ces expériences nous avons besoin de 42 souris. Ce nombre est le minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement significatifs.

Raffinement : Les animaux seront surveillés quotidiennement afin de s'assurer de leur bien-être. Des points limites sont définis de façon à arrêter l'expérimentation dès l'apparition d'une souffrance des animaux.

18432 Les anévrismes cérébraux correspondent à une dilatation fragile des artères du cerveau. Il s'agit d'une pathologie fréquente (60/1000 habitants) et grave qui expose au risque d'hémorragie cérébrale par rupture de l'anévrisme, conduisant au décès du patient dans plus de 50% des cas. Les traitements actuellement disponibles sont la chirurgie ou le traitement par voie endovasculaire (par l'intérieur des vaisseaux sanguins) notamment en implantant un dispositif en forme de cage à l'intérieur de l'anévrisme pour empêcher le sang d'aller dans la zone dilatée et le rediriger dans l'artère normale. Ces cages appelées WEBs (Woven EndoBridge) sont facilement implantables, sans ouvrir le crâne, en passant tout le matériel par un long tube remontant une artère périphérique jusqu'à l'anévrisme, tout ceci dirigé grâce à la radiologie. Cette technique permet de traiter les patients sans chirurgie lourde et sans cicatrice avec un retour à domicile 2 jours après l'intervention.

Des études récentes ont rapporté une modification de forme de la cage au cours du temps pouvant toucher concerner jusqu'à 2/3 des patients traités. Ce phénomène est aujourd'hui suspecté d'être responsable d'une rechute chez le patient par une recanalisation de l'anévrisme avec un risque hémorragique.

L'objectif du projet est de préciser la cause de la modification de forme du WEB. Elle pourrait être due soit à la pression sanguine dans les artères cérébrales ou soit être une conséquence de la cicatrisation de l'anévrisme. Identifier les raisons de cette modification de forme est indispensable pour assurer une sécurité dans le traitement des patients par ces dispositifs.

Pour identifier les mécanismes causant cette modification de forme, notre étude va nécessiter d'effectuer des analyses radiologiques et biologiques effectuées au niveau du tissu de l'anévrisme. Des expériences in vitro ne permettent pas d'effectuer ces analyses et encore moins un suivi dans le temps. Ainsi, ces analyses vont nécessiter l'utilisation d'un modèle animal afin d'étudier ce phénomène, en l'occurrence, le lapin.

Dans un premier temps, un anévrisme cérébral sera créé au niveau d'une artère carotide de l'animal chirurgicalement, selon un protocole déjà publié. Trois semaines plus tard, l'animal sera traité par voie endovasculaire, de manière similaire à ce qui est décrit chez l'humain plus haut, en implantant un WEB dans l'anévrisme. L'animal et sa guérison seront ensuite évalués à différentes périodes après le traitement (1 mois, 3 mois, 6 mois) par des contrôles radiologiques ainsi que des contrôles biologiques. L'animal sera mis à mort à la fin de la procédure pour prélever la pièce anatomique et effectuer les analyses biologiques.

Nous utiliserons pour cette étude au maximum 35 lapins. Ce nombre a été déterminé en prenant pour référence des protocoles d'études similaires déjà publiés.

Des mesures seront prises pour respecter le bien-être des animaux tout au long de ce travail. Les lapins seront suivis journalièrement et pris en charge s'ils présentent des signes de souffrance (analgésie, etc). Ils seront acclimatés dans nos locaux pendant une période de 5 jours minimum. Leur environnement de vie sera également enrichi (bûchettes à ronger, foin, et autres jouets en fonction).

18433 Depuis plus de 30 ans, la population d'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) enregistre un déclin et en 2007, l'espèce a été classée à l'annexe II de la Convention Internationale sur le Commerce des Espèces, et en danger critique d'extinction par l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature. Au niveau des côtes européennes, les civelles d'anguille remontent les estuaires pour rejoindre les zones de croissance en eau douce, bien que plusieurs études démontrent que certains individus s'installent en estuaire, voire en mer. Le déterminisme des différents patrons de migration n'est toujours pas élucidé et l'enjeu est de taille, puisqu' il est généralement admis que les anguilles migrant en amont tendent à donner des femelles alors que la proportion de mâles est plus importante en aval.

Les estuaires sont des zones fortement anthropisées, et les civelles d'anguille sont exposées lors de leur traversée à différents contaminants dont les effets sur la migration sont peu ou pas connus. Elles sont exposées, entre autres, aux rejets d'effluents de station d'apuration (STEP) composés d'un cocktail de molécules incluant de nombreuses substances pharmaceutiques. Afin d'établir des protocoles permettant d'étudier l'impact de ces rejets sur le comportement migratoire de la civelle, il est essentiel d'étudier dans un premier temps la cinétique d'accumulation de ces substances. Cela permettra de fixer les durées d'exposition pour de futurs protocoles concernant l'effet de ces effluents sur le comportement. Cette étude préliminaire a donc pour objectif d'étudier en milieu expérimental la cinétique d'accumulation de contaminants présents dans les effluents d'une STEP chez la civelle d'anguille. Les effluents seront filtrés durant 24h in situ et rapportés au laboratoire. Le cocktail filtré sera ensuite dilué pour retrouver sa concentration initiale. 12 lots de 5 civelles seront exposées à ce mélange durant 15 jours pour voire la cinétique d'accumulation des contaminants dans les organismes puis gardées une semaine en eau non contaminée pour voire la vitesse d'élimination des contaminants. 2 lots de 5 civelles seront prélevés avant contamination, puis à J1, J3, J7, J15 et J22. Elles seront anesthésiées, euthanasiées et conservées à -20°C jusqu'à analyse. 180 molécules identifiées seront analysées et une analyse sans a priori sera également effectuée pour détecter des molécules non ciblées. Des mises au point d'analyses des métabolites (composés issus de la transformation biochimique de molécules par le métabolisme) présents dans

les civelles seront effectuées pour de futurs travaux. Une analyse des molécules présentes dans l'effluent sera faite au préalable afin d'en connaître le contenu.

De par la particularité du cycle de vie et de la migration estuarienne de l'anguille européenne, l'utilisation pour cette étude d'une autre espèce de poisson est impossible. Une soixantaine d'individus seront utilisés, soit environ 10 g. La pêche sera effectuée manuellement à l'aide d'un tamis, technique moins traumatisante que le tamis poussé par un bateau, utilisé par la pêche professionnelle. Par ailleurs, notre expertise en physiologie et comportement de la civelle d'anguille (plus de 20 ans d'étude sur ce modèle), nos installations expérimentales dédiées à l'étude des poissons, des conditions d'exposition aux contaminants incluant un enrichissement des bacs avec des abris (plantes en plastique), des mesures de température et observations quotidiennes ainsi qu'une collaboration avec des collègues écotoxicologistes et chimistes contribueront à mettre en place des conditions optimales pour les animaux et les analyses.

18434 L'obésité est un problème de santé mondial qui est associée à des maladies chroniques et sévères comme le diabète. La surcharge calorique fait partie des facteurs déclenchant le phénotype obèse, et plus particulièrement la surconsommation d'aliments riches en graisses et en sucres. L'une des stratégies les plus efficaces pour lutter contre l'obésité est la chirurgie bariatrique, car elle permet une perte de poids durable et la disparition du diabète. Les patients subissant ce type de chirurgie déclarent avoir une préférence diminuée pour les aliments appétissants. Toutefois, les mécanismes pouvant expliquer cette modification de préférence alimentaire n'ont pas encore été élucidés. Les acides biliaires sont aujourd'hui considérés comme des acteurs métaboliques importants qui participent non seulement à la digestion des aliments, mais aussi aux processus liés au contrôle du poids corporel, à la dépense énergétique et au contrôle du glucose, notamment en activant leur récepteur spécifique. De plus, des études chez le rongeur suggèrent qu'ils seraient impliqués dans la préférence alimentaire. Ainsi, nous cherchons à comprendre si l'activité de ce récepteur peut participer au contrôle du poids corporel par des mécanismes liés à la préférence alimentaire, mécanismes classiquement régulés au niveau du cerveau. Des données récentes ont montré que son activation dans le cerveau de souris obèses entraîne une perte de poids significative au fil du temps. Ces effets ont lieu au niveau de l'hypothalamus, puisque l'élimination de ce récepteur dans cette région entraîne une prise de poids significative. Dans ce projet nous souhaitons décortiquer l'implication de ce récepteur dans le comportement alimentaire, notamment sur la motivation des souris pour obtenir des aliments appétissants. Pour cette étude, nous allons utiliser des approches pharmacologiques : utilisation des sels biliaires ou de composés synthétiques injectés directement au niveau du cerveau ; et génétiques : suppression du récepteur au niveau de l'hypothalamus. Dans ces deux cas, il sera nécessaire de pratiquer une chirurgie afin de cibler des zones précises du cerveau, chirurgie dites en conditions stéréotaxiques. Nous regarderons quel est l'impact de la stimulation de ce récepteur ou sa suppression sur la motivation pour obtenir une nourriture riche en graisse. Pour cela, les animaux devront insérer leur museau dans un orifice afin d'obtenir l'accès à ce type de nourriture. Nous augmenterons graduellement le nombre d'insertions nécessaires pour obtenir cet accès pour évaluer cette motivation.

Nous avons choisi la souris comme modèle, car sa physiologie est suffisamment proche de l'Homme pour obtenir des informations biologiques pertinentes et pouvant être transposées chez ce dernier. De plus, la génétique de la souris est étudiée depuis longtemps ce qui en fait un modèle de choix lorsque l'on veut étudier des organismes génétiquement modifiés.

Nous prévoyons d'utiliser un maximum de 120 souris mâles adultes sur une durée de 3 ans. La règle des 3R a été mise en place dans la conception de notre projet.

Remplacement : Comme nous étudions des phénomènes qui impliquent une communication bidirectionnelle entre le cerveau et le reste du corps, notamment dans le contexte du comportement alimentaire, aucun modèle *in vitro* ou *in silico* ne peut être envisagé.

Réduction : Une planification précise des expériences a été établie afin de réduire au maximum le nombre d'animaux inclus dans cette étude, tout en ayant des groupes suffisamment importants pour

obtenir des données exploitables. Par ailleurs, les protocoles que nous utilisons sont en amélioration constante afin de réduire au maximum la quantité des souris utilisés.

Raffinement : Nous enrichissons le milieu et nous maintiendrons le contact olfactif, auditif et visuel, afin de diminuer l'impact de l'individualisation des animaux, individualisation nécessaire à nos expériences. Avant chaque expérience, les animaux sont manipulés afin de réduire le stress. Les chirurgies sont réalisées sous anesthésie générale, et en utilisant de façon systématiquement des analgésiques pour limiter toute douleur. Par ailleurs, des points limites suffisamment précoces sont définis afin de limiter toute souffrance tout au long de la vie de l'animal.

18435 Les maladies psychiatriques touchent plus d'un adulte sur 4. Ces maladies restent mal traitées car mal comprises. Parmi elles, les troubles du spectre autistique (TSA) sont en forte augmentation depuis ces 20 dernières années (prévalence actuelle 1%) mais les mécanismes physiopathologiques impliqués sont encore largement inconnus. Les troubles du spectre de l'autisme (TSA) se caractérisent non seulement par des troubles du comportement, liés à des anomalies de connectivité neuronale dans le cerveau, mais aussi par des troubles gastro-intestinaux dont les causes sont inconnues mais qui pourraient impliquer le microbiote intestinal et le système nerveux entérique (SNE), régulateur des fonctions digestives. Les données actuelles suggèrent que des altérations du microbiote intestinal contribueraient à la fois aux troubles comportementaux et gastro-intestinaux des TSA. Ce projet propose d'examiner pour la première fois si les altérations du microbiote intestinal observées dans les TSA induisent des troubles digestifs et des défauts de connectivité du SNE.

Il s'agira ainsi d'étudier si des transferts de microbiote fécal (TMF) provenant de patients TSA, en comparaison à des sujets contrôles, induisent des troubles digestifs liés à des anomalies de connectivité du SNE et des troubles du comportement dans un modèle animal murin. Pour cela, les souris recevront un traitement pour diminuer drastiquement la charge bactérienne intestinale et permettre une meilleure implantation du microbiote fécal humain. Les souris seront ensuite traitées avec des préparations de selles fécales issues de patients TSA ou d'individus sains. Les animaux seront observés et soumis à différents tests comportementaux couplés à une analyse digestive afin de déterminer si le microbiote fécal d'individus TSA contient des bactéries ou métabolites capables d'altérer les fonctions digestives et cérébrales.

Ce projet sera réalisé en tenant compte du principe des 3R (Réduire, Raffiner et Remplacer). Le nombre de souris a été réduit au minimum possible tout en permettant une analyse statistique fiable (Réduire). Une analyse préliminaire sera réalisée afin d'optimiser l'implantation du microbiote humain chez la souris et de réduire toutes altérations physiologiques pouvant être induites par la méthode de transfert de microbiote. Le bien-être des souris sera surveillé quotidiennement, tout au long de l'étude, avec une mise en place d'un enrichissement par fristotis, et en évaluant l'état général des animaux. Des points limites seront mis en place pour évaluer le mal-être des animaux (douleur, stress, souffrance). En cas d'éventuels signes de souffrance, les animaux seront euthanasiés (Raffiner). La corrélation in vitro-in vivo n'étant pas satisfaisante, le recours à l'utilisation de modèles animaux est indispensable dans notre étude et il n'y a pas d'alternative au Remplacement.

Les expériences seront réalisées en plusieurs fois et ce projet nécessitera 406 animaux (souris C57Bl6) au maximum.

18436 Le système immunitaire a un rôle prépondérant dans l'élimination des cellules cancéreuses mais c'est aussi en partie lui le responsable de l'échappement tumoral. Ces dernières années, la compréhension des différents acteurs d'une réponse inflammatoire que ce soit dans le cas d'auto-immunité, de rejet d'organes, ou de réponse anti-tumorale a mis en évidence l'équilibre entre l'activation et l'inhibition de cette réponse. Cet équilibre est maintenu par des populations effectrices telles que les lymphocytes T, les lymphocytes B ou encore les NK et des populations régulatrices telles que les lymphocytes régulateurs ou les cellules myéloïdes suppressives, principaux médiateurs du développement tumoral et de la rechute dans le cas du cancer. Les traitements d'immunothérapie actuels visent à contrebalancer cet équilibre. Dans le cas du cancer, les thérapies cherchent à améliorer l'action des cellules T effectrices ainsi qu'à inhiber la fonction des cellules

régulatrices. La voie PD-1/PD-L1 a un rôle majeur dans l'inhibition de la réponse des lymphocytes T. Des anticorps ciblant cette voie PD1/PD-L1 (Nivolumab, Pembrolizumab, Avelumab) ont été générés pour réactiver la réponse T antitumorale et ont démontré des effets bénéfiques considérables dans le traitement de divers cancers. Ces essais cliniques ont été rendus possibles grâce à la preuve de concept sur des modèles précliniques murins. Aujourd'hui, ces anticorps anti-PD-1/PD-L1 sont approuvés comme agents thérapeutiques de première ligne pour certains cancers du poumon et de la peau. Cependant il est estimé que seulement une partie des patients (15-60% selon le cancer) répond à la thérapie et que plusieurs rechutes sont observées après traitement. Il est donc essentiel de chercher d'autres molécules et combinaisons thérapeutiques. Dans ce projet, nous proposons de tester in vivo de nouvelles thérapies combinatoires ciblant le récepteur inhibiteur PD-1 et de nouvelles molécules du système immunitaire dans le but d'induire une réponse T anti-tumorale efficace et durable. Nous avons généré de nouveaux formats d'anticorps dit « bispécifiques » capables d'interagir avec 2 molécules en même temps, nous supposons que ce format améliorera l'effet de la monothérapie anti-PD-1. Cette étude in vivo est indispensable pour comprendre l'effet biologique de nos traitements et pour démontrer leurs efficacités thérapeutiques avant le lancement d'essai clinique.

Pour ce projet de 5 ans, le nombre maximum d'animaux utilisé sera de 2680 souris, selon une étape #1 préliminaire de mise au point et de caractérisation de 14 modèles tumoraux et quatre étapes de validation de traitement bispécifique dans 4 modèles tumoraux différents chacun afin de combiner un nombre réduit d'animaux avec une pertinence statistique.

Le projet a été pensé pour répondre à des besoins scientifiques tout en adoptant un comportement responsable en matière d'expérimentation animale (Règle des 3R). Le nombre d'animaux est réduit par une mutualisation des groupes contrôles lorsque c'est possible, et il est limité au strict nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement fiables. Le paragraphe ci-dessus présente est une estimation haute qui sera potentiellement réduit en fonction effets thérapeutiques obtenus. Pour le « Remplacement », ces traitements à évaluer ont déjà démontrés des résultats prometteurs in vitro sur de nombreux tests comme des évaluations à partir de PBMC humain frais ou de tumeurs isolées de patient. Les modèles tumoraux chez la souris humanisé nous permettent de valider l'effet thérapeutique de nos traitements à l'échelle d'un organisme ainsi que d'évaluer leur potentiel effet toxique avant d'envisager un essai clinique. Pour le « raffinement » et le bien-être des animaux, une étape d'acclimatation de 5 jours minimum sera respectée avant inclusion dans des protocoles expérimentaux. Pour limiter le stress et l'inconfort, les animaux sont maintenus dans des cages ventilées dans un cycle jour/nuit de 12h/12h avec un accès à l'eau et à la nourriture à volonté ainsi qu'un nombre maximum de 5 animaux/cage et des brindilles de papier pour s'enfouir et se cacher. Nous avons aussi mis en place une procédure non invasive pour visualiser par imagerie de bioluminescence la croissance de la tumeur. Cette technique nous permet d'exploiter au mieux les résultats et ce, sans souffrance pour l'animal. Le suivi des animaux sera quotidien et la gestion de la douleur maîtrisée le plus adéquatement possible afin d'apporter les soins nécessaires le plus rapidement aux animaux. Comme décrit dans les paragraphes des procédures expérimentales ci-dessous, des analgésiques seront utilisés avant et après chirurgie. Enfin des points limites ont été mis en place afin de réagir rapidement en cas d'inefficacité des traitements ou de souffrances animales (cf tableau4 pièce-jointe).

18437 L'épilepsie est un trouble neurologique invalidant et sévère qui affecte environ 1% de la population mondiale.

Cette maladie touche 600 000 personnes en France et se déclare bien souvent avant l'âge de 18 ans. L'épilepsie est caractérisée par des crises qui peuvent être partielles ou généralisées. Elles correspondent à des décharges électriques cérébrales qui entraînent des troubles moteurs, sensoriels et du comportement mais aussi des convulsions, des raideurs, des chutes et des ruptures dans la conscience.

Pour la plupart des patients, l'épilepsie peut être traitée adéquatement avec des médicaments. Cependant, 30 à 40% des patients sont pharmaco-résistants, et ne peuvent donc pas bénéficier des traitements existants. Pour ces patients pharmaco-résistants, une chirurgie curative peut être

proposée sous réserve que la zone épiléptogène soit accessible et que son ablation ne provoque pas de lésions neurologiques. Il est donc nécessaire d'envisager de nouvelles stratégies de traitement pour les patients pharmaco résistants ou ne pouvant pas être opérés.

Des travaux ont montré que le froid pouvait arrêter les crises d'épilepsie d'où notre choix de développer un outil permettant d'appliquer du froid au niveau des zones où se développent les crises.

Le refroidissement localisé au bout de l'implant est produit par une technique de refroidissement de solide par un laser qui génère un rayonnement fluorescent compris entre 960 et 1040 nm. L'objectif de la présente étude est d'évaluer l'effet thermique et non délétère dans les tissus du rayonnement fluorescent émis par l'implant utilisé pour le refroidissement.

L'étude se fera en comparant chaque hémisphère des animaux entre eux ; chaque animal sera son propre contrôle (réduisant ainsi le nombre d'animaux), et nécessitera l'utilisation de 20 rats au maximum, provenant d'élevages autorisés, afin d'assurer la validité des expériences menées.

Nous mènerons notre étude dans le respect de la règle des 3R.

Remplacer : il n'existe pas de modèle non biologique ou in vitro permettant de réaliser ces travaux sans perte d'informations scientifiques d'où la nécessité d'utiliser des modèles in vivo.

Réduire : le nombre d'animaux a été optimisé afin d'obtenir des résultats statistiquement interprétables, de plus, il pourra être réduit au cours de la procédure si l'effet attendu est suffisamment important pour obtenir des résultats statistiquement fiables ou si les données se révèlent non pertinentes entraînant l'arrêt de l'étude

Raffiner : les rats seront hébergés à l'animalerie en groupe sociaux, dans un environnement enrichi adapté à leur espèce. Toutes les procédures réalisées sur les animaux seront effectuées par des personnes expérimentées et formées. Les chirurgies, suivies par les séances d'imagerie des animaux se feront sous anesthésie générale gazeuse. Les animaux seront placés sur un tapis chauffant pour maintenir leur température et un gel ophtalmique sera appliqué pour éviter leur inconfort. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et tout sera mis en œuvre pour que les animaux aient un niveau d'inconfort aussi limité que possible. Lors de la chirurgie, en cas d'effets indésirables comme une hypothermie prolongée qui ne peut être corrigée ou la présence d'une hémorragie cérébrale, l'expérimentation sera interrompue. En cas d'effets inattendus lors de l'hébergement des animaux, de perte importante de poids ou d'observation d'un phénomène douloureux, le vétérinaire en charge du bien-être des animaux sera immédiatement alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider de l'interruption de l'expérimentation.

18438 L'infection à *M. ulcerans*, ou ulcère de Buruli, est une maladie négligée émergente. Cette infection, qui touche principalement les enfants, est diagnostiquée principalement dans les zones humides de l'Afrique de l'Ouest et Centrale. Les lésions débutent généralement par un nodule qui évolue en une ulcération que s'étend dramatiquement. La destruction tissulaire est due à l'action d'une toxine, la mycolactone. Malgré leur étendue, les lésions ne sont pas douloureuses. Le caractère indolore des lésions est provoqué par la mycolactone. En effet nous avons démontré que la mycolactone présentait un pouvoir analgésique en hyperpolarisant les neurones limitant alors la transmission de l'information nerveuse. Dans ce contexte, l'objectif global de notre projet est d'identifier de nouvelles molécules aux propriétés analgésiques utilisant les mêmes voies que la mycolactone. Ce projet se justifie puisque l'arsenal thérapeutique contre la douleur reste limité. Plus précisément, nous allons évaluer les propriétés analgésiques des composés lactones. Au préalable, il aura été démontré sur des lignées cellulaires que les composés à évaluer sont capables d'hyperpolariser les cellules. A termes, ce travail doit aboutir à la mise au point de nouveaux analgésiques. Sur les cinq ans de notre projet nous estimons à 40 composés et dérivés à évaluer dans des modèles in vivo. Ainsi, le nombre nécessaire d'animaux pour cette étude est estimé à 1351 souris. Les animaux seront répartis en groupes de 7 et l'effet des composés sera comparé à un groupe témoin négatif et un groupe témoin positif. Pour les composés ayant un effet analgésique, un effet dose réponse sera déterminé. Ensuite les voies induites par chaque composé efficace seront disséquées entre autres

par l'utilisation d'animaux génétiquement modifiés. Le nombre d'animaux est suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Cette étude a été rédigée et pensée de manière à respecter la règle des 3 R (Remplacement, réduction, Raffinement) qui consiste à n'utiliser que le nombre nécessaire d'animaux pour mener à bien cette étude, tous les résultats obtenus seront utilisés et exploités. Le bien-être animal a été une des priorités dans la conception de cette étude mais nous ne pouvons à ce stade nous passer d'utiliser des animaux. Afin de raffiner les conditions de vie des souris, un suivi adapté des animaux a été instauré afin de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, mais aussi la détresse ou l'angoisse qu'ils pourraient éprouver. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux et bénéficient d'un enrichissement adapté (cabanes, papier, tubes en carton). Un suivi journalier sera effectué sur l'ensemble des animaux et des indicateurs comportementaux et physiques sont prédéfinis et constituent les points limites.

18439 Ce projet a pour objectif d'estimer le niveau d'exposition de l'homme face aux résidus d'un produit à application cutanée sur son animal de compagnie, le chien.

Pour déterminer la sécurité d'utilisation d'un tel produit vétérinaire, la quantité de résidus transférables du chien à l'homme (par contact/caresse) doit être mesurée. Par la suite les effets d'absorption du produit par voie cutanée ou orale (main-à-bouche) chez l'homme pourront être évalués.

Pour quantifier ce transfert un "wipe test" (test d'essuyage) doit être réalisé selon la recommandation européenne EMA/CVMP/SWP/721059/2014.

Le produit appliqué sera la formulation finale du produit vétérinaire.

8 chiens seront inclus par test (nombre minimum recommandé par l'agence européenne).

L'application du traitement sera réalisé en fonction des recommandations finales du fabricant (ex : pipette en un seul point ou en ligne, collier, spray...) à la dose la plus élevée selon le gabarit de l'animal.

Pour garantir la qualité des résultats, les animaux seront hébergés individuellement et pourront éventuellement porter une collerette après l'application du traitement. Ainsi le transfert de résidus entre deux animaux sera évité durant la durée du test, soit 28 jours. Durant cette période les animaux resteront en contact visuel, olfactif et sonore avec leurs congénères. Tout sera mis en œuvre pour limiter le stress qui pourrait être induit par cet isolement relatif avec entre autre, une amplification des actions de socialisation et d'enrichissement de leur milieu (visite, jouets, plateformes...)

Le "wipe test" consiste alors à caresser chaque chien à des temps définis (entre 1 heure et 28 jours après le traitement) selon une méthode répétable, avec des gants en coton. Les gants seront changés pour chaque chien et temps puis analyser pour déterminer la quantité de résidus transférables.

Ce test n'engendre pas de souffrance directe du fait de l'application du traitement ou des prélèvements effectués, mais une souffrance indirecte liée à l'hébergement individuel qu'il impose.

L'estimation du nombre d'animaux requis pour ce projet sur 5 ans est de 80 chiens.

L'utilisation de chiens sur ce projet est justifiée par le fait qu'ils représentent l'espèce cible du produit et qu'il n'existe pas de méthode de remplacement pour ce type de test.

18440 La broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) est un problème majeur de santé publique. Les projections de l'Organisation Mondiale de la Santé suggèrent que cette pathologie chronique et évolutive deviendra la 3^{ème} cause de mortalité dans le monde d'ici 2020. Elle est caractérisée par une obstruction et une inflammation chronique des bronches (bronchite chronique) et d'une destruction des alvéoles pulmonaires (emphysème) peu ou pas réversible. Ceci se traduit par une diminution de la fonction respiratoire et impacte sur la qualité de vie et l'autonomie des patients. De plus, l'apparition de périodes d'exacerbation d'origine infectieuse amplifie ces phénomènes et accélèrent le déclin de la fonction respiratoire, précipitant la mort des patients.

La prise en charge de la BPCO est limitée au traitement des symptômes, puisqu'il n'existe aujourd'hui aucun traitement curatif.

Une meilleure compréhension de la physiopathologie de la BPCO et de ses exacerbations est donc nécessaire pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Les échantillons humains, notamment ceux des stades précoces de la BPCO qui permettent de comprendre les mécanismes de la physiopathologie et d'identifier des marqueurs prédictifs et progressifs de la maladie, ne sont malheureusement pas/peu disponibles. Des modèles animaux de BPCO ont été développés uniquement chez la souris et le primate non humain (PNH). Même si le modèle murin a permis de caractériser certains mécanismes impliqués dans la physiopathologie de la BPCO, notamment de l'emphysème, ce modèle est imparfait puisqu'il ne rend pas compte de la composante de bronchite chronique. De plus, le poumon des souris diffère fortement de celui de l'homme, d'un point de vue anatomique et physiologique.

Récemment une équipe américaine a développé avec succès un modèle de BPCO chez le PNH, qui mime mieux la pathologie humaine et permet 1/ d'envisager une meilleure compréhension de la maladie et 2/ de tester de nouvelles approches thérapeutiques, notamment des biomédicaments. Néanmoins, ce modèle ne prend pas en compte les périodes d'exacerbations infectieuses de la BPCO, événements critiques dans l'évolution de la pathologie

Les primates non humains représentent un bon modèle pour : 1/ mimer la physiopathologie de la BPCO, compte tenu des données de la littérature, 2/ d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et 3/ évaluer des traitements de type biomédicaments administrés par aérosol, car ils sont proches de l'Homme d'un point de vue de la proximité phylogénique, de l'anatomie et la physiologie pulmonaire.

Parmi les PNH, le singe cynomolgus est choisi car : 1/ c'est l'espèce modèle de la littérature, 2/ c'est une espèce de référence pour les études réglementaires des biomédicaments, 3/ en dehors de l'homme, c'est l'espèce de l'ordre des primates la mieux documentée d'un point de vue génomique et immunologique et 4/ c'est une espèce bien maîtrisée et pertinente pour l'administration de thérapies par aérosol. Enfin, d'un point de vue moléculaire, la proximité moléculaire et la distribution d'expression des cibles thérapeutiques similaire à celle de l'homme favorisent la transposition des résultats à l'homme.

La saisine comprend 11 procédures expérimentales qui ont pour objectifs :

- De reproduire le modèle de BPCO déjà décrit la littérature pour pouvoir étudier la physiopathologie de la maladie
- De définir les doses infectieuses de pneumocoque chez le primate-non-humain.
- De développer un modèle de BCPO exacerbée (pneumocoque) pour étudier la réponse anti-infectieuse de l'animal et l'impact sur la progression de la maladie. Dans ce cadre, une procédure d'imagerie (CT-scan) sera également réalisée sur 32 animaux en plus des autres procédures.
- D'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et tester de nouveaux médicaments les ciblant

Cette saisine impliquera au maximum 41 animaux sur 5 ans. La mise en place des modèles de BPCO exacerbée nécessite 17 animaux; ceux impliquant des biomédicaments 24 animaux (3 biomédicaments testés). Le plan expérimental a été établi de sorte à répondre à la règle des « 3R » :

- Remplacer : des études in vitro seront réalisées en amont pour les biomédicaments afin de déterminer leur efficacité biologique.
- Réduire : 3-4 animaux par groupe est le minimum nécessaire pour prendre en compte la variabilité interindividuelle (paramètres respiratoires, biologiques, ...).
- Raffiner : compte tenu de la durée des expérimentations, les animaux seront entraînés pour les gestes simples (sortie de la cage, prélèvement sanguin, prise de poids, ...). Les administrations (intraveineuse et aérosolisation) ainsi que certains prélèvements seront réalisés sous anesthésie générale. Durant ces procédures les animaux seront surveillés par le personnel compétent. Toutes les procédures ont été optimisées de façon à n'induire aucune détresse et douleur ou le cas échéant, de les supprimer (prévention des appuis, de l'hypothermie, monitoring cardio-pulmonaires,

utilisation de matériel et techniques dédiées à la clinique humaine et pédiatrique, mise sous oxygène, administration d'antalgiques ...). Les animaux seront hébergés ensemble en volière (enrichissement social) avec enrichissement du milieu (recherche et diversité de l'alimentation, manipulation d'objets, échelles, plateformes surélevées. . .).

18441 L'essai chez le patient atteint de cancer de traitements nouveaux demeure d'actualité et ce d'autant plus que la mise en place de chimiothérapies balancées adaptées à chaque patient est un schéma thérapeutique de plus en plus fréquent. Ce type de stratégie nécessite une importante palette de molécules. Les molécules actives contre la croissance des tumeurs présentent une toxicité importante par rapport à d'autres classes thérapeutiques et, de ce fait, le screening de ces molécules sur des modèles mammifères porteurs de différents types de tumeurs, induites par la greffe de cellules tumorales humaines ou animales est une phase essentielle dans l'estimation de la balance bénéfique/risque des principes actifs nouveaux.

L'essai de nouveaux traitements sur des patients nécessite une évaluation d'efficacité et de tolérance avant l'autorisation de l'essai clinique par un comité de protection des personnes. Les présentes études s'intègrent dans cette démarche. Ce projet s'insère entre les phases de sélection in vitro de molécules ou de formulations actives sur des cultures cellulaires tumorales et les premiers essais sur le patient. La phase d'essai d'efficacité sur les petits mammifères présentée ici comporte typiquement trois étapes:

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

Les modèles de cancers prévus sont de plusieurs catégories: nous utilisons soit des lignées cellulaires induisant des tumeurs issues de l'espèce de rongeur utilisée comme modèle de l'homme, soit des lignées cellulaires tumorales d'origine humaine.

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

Les tests statistiques permettant d'analyser les données de l'étude ont été choisis de sorte qu'un nombre réduit d'animaux soit requis pour l'interprétation des résultats (5 à 12 animaux par groupe), par ailleurs, la détermination de points limites précis (volume tumoral >1700mm³, perte de poids <20%, ...) a été établie afin de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la douleur et l'angoisse subies par les animaux. Cette procédure expérimentale permet d'évaluer l'efficacité de nouvelles molécules thérapeutiques. La complexité des mécanismes biologiques fait que le modèle animal choisi ne peut être remplacé par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants.

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

18442 Les dermatoses bulleuses auto-immunes (DBAI) sont des maladie auto-immunes dites « spécifiques d'organes » associées à la production d'auto-anticorps pathogènes dirigés contre des protéines structurales qui maintiennent les adhérences cellules-cellules et cellules-matrices dans la peau et les muqueuses. Les DBAI telles que le pemphigus ou la pemphigoïde bulleuse sont distingués en fonction des auto-antigènes impliqués et des structures d'adhésion ciblées. La pathogénicité de certains auto-anticorps a été démontrée in vitro par l'induction de l'acantholyse (perte de la cohésion cellulaire entre les kératinocytes) dans des cultures de peau et/ou in vivo par

la formation de bulles induites suite au transfert passif d'immunoglobuline G de patients atteints de pemphigus à des souris néonatales BALB/c. Cependant, la méconnaissance des processus physiopathologiques complexes conduisant à la survenue des DBAI est un frein au diagnostic et à la mise en place d'une thérapeutique adaptée. Des études récentes suggèrent fortement que la diversité des antigènes cibles au cours des DBAI est plus hétérogène. L'évaluation du rôle de ces auto-anticorps dans les processus physiopathologiques permettra un diagnostic plus précise et la mise en place d'outils thérapeutiques plus adaptés et de potentiellement réduire les effets secondaires des thérapies actuellement utilisées.

Notre laboratoire, centre de référence des maladies bulleuses auto-immunes, s'intéresse donc particulièrement au rôle pathogène de ces auto-anticorps dans les DBAI.

L'injection d'anticorps de malades et de protéines potentiellement cibles chez la souris permettra d'évaluer leurs rôles dans le développement de maladies cutanée ou muqueuse.

Les résultats obtenus au cours d'une étude antérieure menée dans le laboratoire sur des modèles murins de myosite ainsi que les données de la littérature, nous permettent de mettre en place la procédure expérimentale en respectant le concept des 3R : Remplacement, Réduction et Raffinement.

Remplacement et réduction : Afin de réduire, le nombre de souris utilisé à son maximum, nous avons réalisé un étude préalable in vitro de l'activité des auto-anticorps sur les kératinocytes par un test dispase et par des tests d'immunofluorescence sur de la peau. Nos observations semblent confirmer la pathogénicité des nouveaux auto-anticorps. La pathogénicité réelle de chaque auto-anticorps ne peut être envisagée que chez l'animal car ils pourraient agir en synergie avec des cellules du système immunitaire in vivo et contribuer ainsi au phénotype complexe des DBAI.

Le recours au modèle murin étant absolument nécessaire, le modèle murin de DBAI par transfert des auto-anticorps chez la souris néonatale est déjà connu et a déjà permis de confirmer la pathogénicité de certains auto-anticorps. Ainsi, l'utilisation du même modèle permet de réduire le nombre de souris pour la mise au point pour tester rapidement l'implication de ces nouveaux auto-anticorps.

Le nombre d'animaux nécessaires est de 270. Il est réduit au minimum en tenant compte de la variabilité de l'induction de l'acantholyse.

Raffinement :

Une échelle de gravité des symptômes observés a été établie (perte ou hérissément des poils, lésions du museau, posture inhabituelle pour les souris immunisées et uniquement la peau pour les souris néonatales) et permet de déterminer un point limite dans l'ensemble des expériences. Elle permettra d'évaluer la douleur des animaux et de mettre en place une procédure visant à la limiter. Enfin, l'ensemble des expériences sera réalisé dans une animalerie agréée, où les conditions d'hébergement sont contrôlées : température, hygrométrie, cycle jour/nuit, change et nourriture. Les souris seront élevées dans des cages enrichies avec du papier, du coton (cell-nest) et un abri de cellulose. Une crème anesthésique sera appliquée sur les souris néonatales avant l'injection des immunoglobulines et seront immédiatement remises en présence de leur mère après l'injection afin de réduire le stress.

18443 La dystonie cervicale, également appelée torticolis spasmodique, est un trouble du mouvement neurologique caractérisé par des contractions musculaires continues ou intermittentes qui provoquent des mouvements répétitifs anormaux, souvent douloureux, du cou et de la tête. Les mouvements peuvent entraîner une torsion de la tête et du cou (torticolis) ou une traction vers l'avant (antécollis), vers l'arrière (rétrocollis) ou latéralement (latérocollis). Certains peuvent avoir une combinaison de ces mouvements. En outre, les symptômes peuvent varier dans le temps et selon les individus.

Les symptômes commencent généralement progressivement. Ils peuvent s'aggraver et atteindre un plateau. Le stress ou l'excitation peuvent aggraver les symptômes. De plus, certaines positions physiques peuvent activer les symptômes.

Il n'existe aucun remède contre la dystonie cervicale. Les traitements actuels pour réduire les signes et les symptômes sont :

- Injections de toxine botulique

Le traitement principal pour le soulagement de la douleur consiste en des injections de toxine botulique dans les muscles du cou toutes les 11 à 12 semaines. Cela immobilise les nerfs des muscles du cou. On rapporte qu'il soulage la douleur et d'autres symptômes chez 75% des personnes atteintes de dystonie cervicale.

Selon une étude de 2008, il est important d'utiliser le diagnostic du signal électrique, ou l'électromyographie, pour cibler les muscles particuliers pour les injections de toxine botulique.

Les médicaments à base de toxine botulique utilisés comprennent le Botox, le Dysport, le Xeomin et le Myobloc.

- Médicaments oraux

Plusieurs types de médicaments oraux sont utilisés pour soulager les symptômes associés à la dystonie cervicale. Ceux-ci incluent :

- Les anticholinergiques, tels que le trihexyphénidyl (Artane) et la benzotropine (Cogentin), qui bloquent le neurotransmetteur acétylcholine
- Les dopaminergiques, tels que la lévodopa (Sinemet), la bromocriptine (Parlodel) et l'amantadine (Symmetrel), qui bloquent le neurotransmetteur dopamine
- Les GABAergiques, tels que le diazépam (Valium), qui ciblent soit le neurotransmetteur GABA soit les récepteurs GABA-A
- Les anticonvulsivants, tels que le topiramate (Topamax).

Des études comportementales et biochimiques ont montré que les récepteurs σ sont impliqués dans la régulation du mouvement et de la posture. Ces récepteurs σ sont concentrés dans des structures cérébrales, telles que le noyau rouge et la substantia nigra.

Le but de cette étude est de mettre en œuvre le modèle de dystonie cervicale chez le rat et ainsi permettre le développement de différentes molécules.

Une micro-injection intra-cérébrale dans le noyau rouge de 1,3-di-(2-tolyl) guanidine (DTG), qui est un agoniste des récepteurs $\sigma 1$ et $\sigma 2$, induit une dystonie du cou chez le rat.

L'étude pilote, pour la mise en place du modèle de dystonie cervicale, comprend 24 animaux répartis en 4 groupes de 6 rats :

- 1 groupe contrôle
- 1 groupe DTG à 3 doses

Une étude standard comprendra 40 animaux répartis en 5 groupes de 8 rats :

- 1 groupe Contrôle
- 1 groupe DTG
- 1 groupe qui reçoit le produit à tester seul (à 3 doses) ou en interaction avec le DTG

Des études peuvent comprendre un nombre plus élevé ou plus faible d'animaux (par exemple pour l'étude d'un nombre de doses supérieur ou inférieur).

Le nombre maximum de produits testés par an est de 10.

Le nombre total maximum d'animaux utilisées sur 5 ans est de $2\ 000 = 40 \text{ animaux/étude} \times 10 \text{ études/an} \times 5 \text{ ans}$.

Respect de la règle des 3R :

- Réduire. Le nombre total d'animaux utilisés pour une étude est fonction du nombre de groupes et du nombre d'animaux par groupe nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement interprétables.

- Justification du nombre de groupes: 1) Le groupe témoin est nécessaire à chaque expérience 2) Le groupe DTG est nécessaire pour valider l'expérience et pour comparer l'efficacité du produit testé 3) Il est généralement nécessaire de tester le produit à trois doses pour mesurer la relation

dose-effet mais un nombre de doses inférieur ou supérieur peut être justifié en fonction de l'état de connaissance du produit. L'effet attendu du produit testé est une diminution de déviation de torsion de la tête par rapport au plan horizontal.

Le DTG est administré en intra-cérébrale. Selon les études, le produit testé et son placebo sont administrés en intra-cérébrale ou par voies orale (gavage), intrapéritonéale, sous-cutanée ou intraveineuse.

- Justification du nombre d'animaux par groupe. Compte tenu de la variabilité interindividuelle des variables mesurées dans ce test, ce nombre a été fixé à 8 animaux par groupe. L'utilisation d'un nombre inférieur d'animaux a une probabilité importante d'entraîner la non-validité de l'étude, conduisant à la refaire, et par conséquent à utiliser un nombre d'animaux plus élevé.

- Raffiner. Des animaux présentant des signes de souffrance sont euthanasiés. Outre la motivation éthique conduisant à cette euthanasie, celle-ci est requise pour des raisons expérimentales, la souffrance d'un animal biaisant les variables comportementales mesurées. L'utilisation de traitements pour pallier à cette souffrance est exclue, ces types de traitement étant susceptibles de modifier le comportement des animaux et l'action pharmacologique des produits étudiés.

• Après la chirurgie :

- Les animaux sont placés individuellement.

- Les animaux reçoivent 1ml de solution de lactate Ringer en sous-cutanée et ils sont placés sous une lampe chauffante jusqu'à leur réveil.

- A la fin de la journée, dans des récipients alimentaire, du « Gel Diet Energy » (Safe) mélangé à de la nourriture mouillée sont déposés sur le sol de la cage pour stimuler l'appétit et la mobilité gastro-intestinale.

• Soins post-opératoires :

Les rats sont inspectés et pesés quotidiennement pour surveiller les changements de poids corporel.

Lors de chaque inspection quotidienne :

- une attention particulière est accordée à la vigilance de l'animal en évaluant sa capacité à se déplacer dans la cage.

- La consommation d'eau et de nourriture ainsi que la consistance des matières fécales est également observés.

Pour l'évaluation de la souffrance, de la détresse et de l'inconfort des animaux: 1) Les animaux sont d'abord attentivement observés sans être dérangés: l'observation des différentes postures permettent d'évaluer un comportement normal ou anormal. La réaction des animaux à un stimulus externe peut être également vérifiée (ex: bruit léger) avant de s'approcher directement de la cage pour manipuler les animaux. 2) Ensuite, les animaux sont manipulés pour l'examen clinique. Durant celui-ci, les signes et des mesures (dont celle du poids de l'animal) sont notés dans une grille de scoring (définie ci-dessous).

- Remplacer. Il n'existe pas à ce jour de modèle n'utilisant pas d'animaux ou nécessitant un nombre plus réduit d'animaux ou ayant un degré de sévérité inférieur permettant d'obtenir des informations équivalentes à celles obtenues par le présent modèle.

18444 Les neuropathies périphériques induites par la chimiothérapie (NPICs) sont des neuropathies à prédominance sensitive, à l'origine de douleurs. Aujourd'hui, la seule prévention reconnue contre les NPICs repose sur le dépistage des neuropathies préexistantes et sur la détection précoce de signes cliniques chez des sujets soumis à une chimiothérapie neurotoxique. La mise en évidence d'une NPIC justifie parfois un changement de stratégie thérapeutique vers d'autres molécules non ou moins neurotoxiques lorsque celles-ci sont disponibles. Il apparaît évident que prévenir les NPICs ainsi que leur développement par une thérapeutique appropriée est une priorité pour assurer le maintien et donc l'efficacité des traitements anti-cancéreux et améliorer la qualité de vie des patients. Le paclitaxel (PTX) est un agent anti-tumoral appartenant à la classe des taxanes et utilisé pour traiter différents types de cancers parmi lesquels le cancer du poumon, le cancer du sein ou

encore le cancer des ovaires. La neuropathie périphérique induite par le paclitaxel (NPIP) touche environ 70 % des patients traités par cette molécule. Dans certains cas, les symptômes peuvent être irréversibles. La NPIP est principalement sensitive : les patients rapportent des sensations de picotements, des fourmillements, des douleurs ainsi que des hypersensibilités au froid, une altération de la proprioception, qui se développent de façon longueur-dépendante. De nombreux patients rapportent une allodynie tactile. Par ailleurs, des atteintes motrices et autonomes sont moins fréquentes mais peuvent également apparaître. Les symptômes se manifestent dans les jours suivant la première administration de PTX : ces symptômes sont dose-dépendants et s'arrêtent généralement lorsque le traitement prend fin. Néanmoins, ils peuvent persister entre 1 et 3 années suivant la dernière administration de l'agent anticancéreux, voire se poursuivre tout au long de la vie du patient.

Les récepteurs de l'angiotensine II de type 1 (AT1) et de type 2 (AT2) sont exprimés par le système nerveux périphérique. Les effets neuroprotecteurs et/ou neurorégénérateurs de modulateurs du système rénine-angiotensine (SRA) ont été décrits dans plusieurs modèles animaux. Et récemment, il a été mis en évidence que le candésartan (antagoniste des récepteurs AT1) pouvait prévenir la neuropathie sensitive induite par la vincristine (VCR, un agent anticancéreux neurotoxique de la classe des alcaloïdes de la pervenche) chez la souris. L'effet neuroprotecteur du candésartan serait AT2-dépendant, le blocage des récepteurs AT1 par le candésartan favorisant la stimulation des AT2 par l'angiotensine II. De même, dans ce même modèle murin de neuropathie induite par la vincristine, la stimulation directe des AT2 par un agoniste spécifique, le C21 a prévenu le développement d'une allodynie mécanique induite par la chimiothérapie.

Une étude réalisée sur un modèle murin de NPIP démontre l'effet préventif du candésartan (un bloqueur des récepteurs AT1) sur le développement de la NPIP. L'utilisation de souris déficiente pour le gène *agtr2* codant le récepteur AT2 permettrait de valider l'implication d'AT2 dans l'effet bénéfique du candésartan sur la neuropathie induite par le PTX. Les souris AT2-KO ne présentent pas de phénotype dommageable (légère diminution de la pression artérielle). Il n'existe, à ce jour, aucune méthode alternative à l'expérimentation animale disponible qui reproduit l'ensemble des mécanismes mis en jeu à la génération d'une douleur induite par des cytotoxiques anticancéreux. En effet, les modèles *in vitro* ne permettent pas de modéliser la complexité de la réponse d'un organisme entier face à l'administration d'agents de chimiothérapie.

Une analyse fonctionnelle et morphologique sera réalisée afin de caractériser le développement de la neuropathie induite par le PTX. Le degré de gravité et la cinétique de la neuropathie sensitive seront évalués à l'aide de tests comportementaux les heures suivant l'injection de l'agent anti-tumoral. Seuls des tests d'évitements seront utilisés pour l'évaluation de la douleur, et les stimuli seront appliqués au seuil de la douleur et non au-delà. Six groupes de 10 animaux seront utilisés (VEH, PTX, PTX + candésartan, PTX + ramipril chez des souris AT2 KO et chez des souris WT). Le nombre de 10 animaux par groupe a été calculé à partir de résultats (moyenne et écart-type) obtenus au cours de l'étude correspondant à un précédent projet. Le nombre d'animaux total pour l'ensemble du projet s'élèvera donc à 80. Les animaux seront élevés dans des conditions d'hébergement (température et hygrométrie de l'environnement, densité d'animaux, présence systématique d'enrichissement, change régulier de la litière, nourriture et eau *ad libitum*, surveillance quotidienne de l'état général des animaux) qui respectent leur bien-être. L'ensemble des procédures sera réalisé de manière à limiter le stress et la souffrance des animaux (anesthésie, détermination d'une limite haute au-delà de laquelle l'animal sera soustrait au stimulus pour les tests à la douleur).

La mesure de la pression artérielle chez la souris nécessite une anesthésie générale profonde, de ce fait ce paramètre ne sera pas pris en compte dans les points limite afin de limiter les anesthésies.

18445 L'hypothèse de travail est que l'hétérogénéité tumorale corrèle avec l'agressivité des tumeurs, leur résistance aux traitements et leur capacité métastatique. Cette hétérogénéité est un paramètre biologique complexe qui inclue une hétérogénéité des cellules tumorales et de leur environnement et peut être impactée par les traitements utilisées. Le microenvironnement tumoral crée un sanctuaire pour la mise dans un état de dormance des cellules cancéreuses qui deviennent

résistantes aux drogues et sont alors responsables de la récurrence de la maladie plusieurs mois ou année après la rémission. Ce sanctuaire est une zone de tolérance immunitaire renforçant la survie et la croissance des cellules tumorales. Le projet portera sur le développement de nouvelles approches thérapeutiques et l'analyse de l'impact des traitements sur l'hétérogénéité tumorale et ses conséquences cliniques. Les approches thérapeutiques testées reposeront sur un ciblage des cellules tumorales (ex. chimiothérapie, inhibiteurs de kinases), un ciblage du microenvironnement tumoral (ex. ciblage des macrophages, inhibiteurs de points de contrôle du cycle cellulaire) en monothérapie ou en bithérapie. Ces approches seront testées in vivo dans des modèles murins xénogéniques (souris immunodéficientes) ou syngéniques (souris immunocompétentes). Les pathologies tumorales étudiées seront des sarcomes (osseux ou tissus mous) ou de carcinomes (ex. prostate, colon, poumon). Ces expérimentations sont indispensables au bon déroulement du projet, permettant de faire un lien entre les résultats obtenus in vitro, et les applications cliniques potentielles. Elles sont incontournables avant une application clinique et ne peuvent être remplacées par des expérimentations in vitro. Le nombre d'animaux utilisés pour mener à bien ce projet sera réduit au strict minimum pour pouvoir conclure de façon statistiquement significative, à savoir 8 animaux par condition, à raison de 4 conditions par molécule à tester, soit un total de 32 animaux par expérimentation. Les expérimentations seront répétées 2 à 3 fois afin d'étudier la reproductibilité des effets observés. Un total de 15 molécules sera étudié sur une période de 5 ans. Ces molécules seront testées à la fois en monothérapie dans des expériences d'effet-dose (3 doses testées), et en bithérapie. Il s'agit d'un protocole générique qui permettra de faire la preuve de concept préclinique de l'intérêt thérapeutique de certaines molécules pressenties après un premier screening in vitro. Un total d'environ 2880 souris (60% de souris immunodéficientes, 30% de souris immunocompétentes) est prévu sur une période de 5 ans. Le bien être des animaux sera primordial durant les expérimentations, notamment par des phases d'acclimatation, un enrichissement de l'environnement (un tunnel et un carré de cellulose pour permettre la conception d'un "nid"), une visite quotidienne, une gestion de la douleur suivant une échelle stricte et des points limites bien établis (développés ci-dessous).

18446 But du projet:

L'anévrisme intracrânien (AIC) est une anomalie de la paroi artérielle qui provoque des malformations vasculaires du cerveau, présente chez 2 à 5% de la population générale. La rupture d'un AIC est un événement peu fréquent (10/100 000 par an) mais responsable de 60 % de mortalité à six mois dont la plupart dans le premier mois. Le traitement invasif préventif des AIC non rompus, découverts fortuitement, peut entraîner une morbi-mortalité significative et parfois supérieure au risque seul de l'histoire naturelle de l'AIC pour un patient donné. Aucun traitement alternatif, plus près des réalités physiopathologiques, n'a fait preuve de son efficacité. Avec les progrès importants de l'imagerie médicale de plus en plus d'AIC sont découverts fortuitement et la prise en charge de ces patients devient un enjeu significatif des services hospitaliers.

Plus précisément, la rupture d'un AIC entraîne une hémorragie sous-arachnoïdienne (HSA) dont les conséquences peuvent être dramatiques. Malgré les progrès thérapeutiques récents, un épisode d'HSA reste létal dans 65% des cas et cause des séquelles neurologiques graves chez 50% des survivants. Par contre, le traitement invasif préventif des AIC non rompus, découverts fortuitement, ne fait pas l'objet d'un consensus à l'heure actuelle.

Compte tenu de la diffusion des appareils et des progrès techniques de l'imagerie médicale, de plus en plus d'anévrismes intracrâniens sont découverts fortuitement. Chez ces patients porteurs d'anévrismes pourtant parfaitement asymptomatiques cette découverte laisse planer une menace. Cette menace réelle et/ou ressentie implique une décision médicale cohérente et adaptée au risque de chaque patient. Il n'existe pas de traitement préventif non invasif dans cette pathologie. Seuls les traitements invasifs ont fait preuve de leur efficacité mais sont associés à une morbi-mortalité incompressible (3 à 15 %), parfois supérieure au risque lié à l'évolution de l'anévrisme. Cette absence d'alternative médicamenteuse est le corollaire direct d'un manque de connaissance des mécanismes de formation, de progression, et de rupture des AIC.

L'objectif de ce projet est donc de mieux comprendre la physiopathologie de l'anévrisme, dès sa formation jusqu'à sa rupture, dans un modèle d'AIC chez le rongeur. De plus, des techniques d'imagerie par IRM vont permettre d'étudier l'inflammation vasculaire lors de la formation de l'anévrisme. Nous allons étudier le potentiel prédictif de cette inflammation vasculaire avant la rupture de l'AIC, ce qui pourrait être appliqué chez l'homme.

Par ailleurs, ce projet de recherche sera focalisé sur le rôle d'un type particulier de cellules, les macrophages périvasculaires (PVM). Du fait de leur localisation autour des vaisseaux sanguins cérébraux, et grâce à leur capacité à produire des facteurs susceptibles de participer au développement, à la progression et à la rupture de l'anévrisme, ces cellules pourraient représenter une nouvelle cible thérapeutique pour le traitement des AIC.

La connaissance approfondie de la physiopathologie de l'AIC qui découlera de ces études nous permettra, à plus long terme, de tester des substances susceptibles d'interférer favorablement avec l'histoire naturelle de la pathologie.

Nous allons réduire le nombre d'animaux en expérimentation grâce à l'utilisation de techniques d'imagerie non invasives qui permettent de suivre l'évolution de chaque animal au fil du temps. Pour une étude de ce type, où l'on vise à mimer une pathologie humaine, le remplacement du modèle animal par d'autres techniques n'est malheureusement pas envisageable.

Un total de 500 souris Swiss (mâles) seront utilisées dans ce projet, qui se déroulera sur 4 ans. Neuf procédures expérimentales seront réalisées :

Procédure #1 : Modèle murin d'anévrisme intracrânien au niveau de l'artère cérébrale moyenne: 500 souris (toutes les souris du projet)

Procédure #2 : Pose d'un cathéter intraveineux pour techniques d'imagerie: 100 souris

Procédure #3 : Suivi de la pathologie par imagerie IRM: 500 souris (toutes)

Procédure #4 : Imagerie fast-Ultrasound (fUS): 100 souris

Procédure #5 : Injection intracérébroventriculaire (icv) pour déplétion des PVM: 200 souris

Procédure #6 : Injection intracérébroventriculaire pour visualiser les PVM: 200 souris

Procédure #7 : Imagerie biphotonique intravitale des PVM et des leucocytes: 200 souris

Procédure #8 : Mise à mort par perfusion transcardiaque: 500 souris (toutes les souris du projet)

Procédure #9 Injection rétro-orbitaire: 120 (lot Ib) + 80 souris (lot IIb) = 200 souris

Afin de souscrire au principe de raffinement, les animaux seront anesthésiés durant chaque procédure. Les expériences seront réalisées par du personnel qualifié en respectant les règles de bonnes pratiques de laboratoire pour le respect des animaux, tout en veillant à ne pas dépasser les points limites fixés au préalable. Le bien-être des animaux sera suivi bi-quotidiennement par du personnel qualifié 5j/7 et quotidiennement pendant les week-ends et jours fériés et cela pendant toute la durée du projet. Les animaux seront hébergés dans des cages standards répondant aux normes européennes actuelles (Directive 2010/63/UE). Pour éviter de stresser les animaux, les cages seront isolées de tout bruit extérieur et l'accès à l'eau et à la nourriture sera ad libitum. Enfin, une importance particulière sera apportée au bien-être des animaux. Tout sera mis en œuvre pour réduire l'angoisse, la souffrance et la douleur de chaque animal, pouvant être occasionnées pendant le projet. Les principes éthiques et les standards de raffinement seront utilisés jusqu'à la mise à mort de l'animal.

Mots clefs : Anévrisme Intracrânien ; neuroinflammation ; macrophages périvasculaires ; imagerie

18447 De nos jours, les anticorps représentent une nouvelle classe de composés capables de moduler une grande variété de troubles ou de conditions physiopathologiques. Au laboratoire, nous nous intéressons plus particulièrement aux cibles modulant les comportements et la reproduction chez l'animal ou chez l'homme. Bien que des solutions existent pour maîtriser la reproduction, l'utilisation d'hormones stéroïdiennes ou d'analogues entraîne des risques pour la santé des patients et une accumulation dramatique dans l'environnement. Aucune solution n'existe actuellement pour les troubles des comportements. Nous développons donc des petits fragments d'anticorps, découverts

chez les camélidés, qui ont des caractéristiques innovantes et uniques permettant potentiellement de contrôler la reproduction et les comportements. Nous avons identifié et validé in vitro des fragments d'anticorps modulant l'activité de cibles d'intérêt impliquées dans ces grandes fonctions physiologiques.

L'objectif de cette étude est de démontrer l'effet de ces fragments d'anticorps sur le contrôle de la reproduction et des comportements in vivo et de les développer si nécessaire pour un usage chez l'animal. Bien que la maîtrise de la reproduction et des troubles du comportement ne soient pas dommageable pour la santé, ils affectent très sérieusement la qualité de vie au quotidien. Le modèle souris est le modèle animal de mammifère le plus adéquat pour mener à bien ces études in vivo, notamment du fait de sa taille réduite et parce que les mêmes cibles sont impliquées dans ces processus physiopathologiques chez les rongeurs et chez les espèces d'intérêt (homme, animaux d'élevage).

Ces expériences vont significativement contribuer à l'augmentation des connaissances scientifiques de ces cibles, mais également à la découverte et au développement de potentiels traitements innovants pour la reproduction et les comportements chez les animaux d'élevage et chez l'homme.

Le nombre total dans ces expériences sera d'un maximum de 3178 animaux (3160 souris et 18 rates). Le projet s'inscrit dans le respect de la règle des 3R :

Remplacement : tous les fragments d'anticorps ont été entièrement caractérisés et développés in vitro, mais il n'y a aucune méthode de remplacement à l'étude de la reproduction et les comportements.

Réduction : notre étude met en place des conditions à chaque étape du projet afin de réduire le nombre d'animaux utilisés (jusqu'à plus d'un tiers du nombre total) et la durée d'expérimentation de chaque animal.

Raffinement : les animaux impliqués dans cette étude sont élevés dans les meilleures conditions d'élevage dans des cages en présence d'enrichissement. Les expériences sont menées dans les plus courts délais possibles afin de minimiser leur inconfort et leur stress et de les remettre dans leurs cages en présence de leurs congénères.

18448 Les récepteurs des cellules T (TCRs) permettent aux lymphocytes T de reconnaître de manière spécifique les éléments (antigènes) étrangers, comme par exemple des antigènes se trouvant à la surface des cellules cancéreuses. Mais cela ne suffit pas aux patients pour que ceux-ci ne développent pas de cancer. De plus, certains patients sont réfractaires ou rechute après les traitements de première intention, tels que la chimiothérapie. La thérapie par cellules Chimeric Antigen Receptor (CAR) T a montré des résultats sans précédent en clinique. Cette thérapie consiste à injecter aux patients des cellules CAR T, qui sont leurs propres lymphocytes génétiquement modifiés afin qu'ils expriment un TCR reconnaissant spécifiquement un antigène uniquement présent chez les cellules tumorales. Deux de ces traitements CAR T-cells, Kymriah (laboratoire Novartis) et Yescarta (laboratoire Gilead) qui sont des cellules CAR T anti-CD19, ont obtenu une autorisation de mise sur le marché en Europe, après avoir été autorisés aux Etats-Unis, dans le traitement de la leucémie aiguë lymphoblastique à cellules B.

Cependant, les patients peuvent développer des toxicités sévères suite à cette thérapie, telle que le syndrome de libération de cytokines (CRS). De plus, certains patients ne répondent pas à la thérapie CAR T-cells ou rechute. Il est donc nécessaire d'améliorer ce traitement.

Nous allons, par différentes approches et en utilisant de nouvelles techniques, créer de nouvelles cellules CARs plus sûres et plus efficaces.

La première approche consiste à augmenter les capacités des cellules CAR T en les cultivant, préalablement à leur injection, avec une cytokine mutante qui est l'IL-10. En effet, il a été démontré que cultiver les cellules CAR T avec de l'IL-2 et l'IL-10 mutante R5A11D augment la capacité des cellules CAR T à tuer les cellules tumorales comparé à l'IL-2 seule qui est utilisé lors de leur manufacture. Nous démontrerons cela dans les modèles murins de lymphome Non-Hodgkinien

avec les cellules CAR T anti-CD19 et de myélome multiple avec les cellules CAR T anti-BCMA dont leur efficacité a déjà été prouvée dans ces modèles.

La deuxième approche consiste à créer des cellules CAR-NK anti-CD19 plus persistantes. Les cellules NK ont une persistance et une capacité d'expansion faibles. Il a été démontré que de multiples cytokines utilisant les voies de signalisation JAK-STAT, telles que l'IL-2 et l'IL-15, peuvent booster la persistance et la fonction des cellules NK. Nous avons donc choisi de créer des cellules CAR-NK anti-CD19 dont le domaine intracellulaire sera composé du domaine cytoplasmique tronqué de l'IL2Rb ainsi que d'un motif de liaison STAT. Nous allons donc établir la preuve de concept de ces nouvelles cellules CAR-NK dans les modèles murins de leucémie lymphoblastique aiguë NALM-6 et de lymphome Non-Hodgkinien Raji.

Pour la dernière approche, nous avons créé des cellules CAR-T anti-CD19 possédant un récepteur chimérique de cytokine. Comme pour les lymphocytes T, les cellules CAR-T peuvent devenir épuisées à force d'être stimulées par l'antigène spécifique. Cela se traduit par une diminution de leur capacité à tuer les cellules cibles ainsi que par leur disparition à court terme. Des signaux inhibiteurs exprimés par les cellules T épuisées, tels que PD-1, TIGIT ou TIM-3, jouent un rôle critique dans ce phénomène d'épuisement. En clinique, il a été montré que le Nivolumab, anticorps anti-PD-1, pouvait revigorer l'activité anti-tumorale des cellules CAR-T anti-CD19 (Yescarta). C'est pourquoi, nous avons créé un récepteur chimérique de cytokine capable de convertir les signaux inhibiteurs négatifs en signaux stimulateurs. Nous allons donc établir la preuve de concept de ces nouvelles cellules CAR-T dans les modèles murins de lymphome Non-Hodgkinien Raji et de myélome multiple MM. 1S.

La recherche dépend de manière critique de l'utilisation de modèles animaux, car les interactions complexes qui se produisent au sein du système immunitaire et les cellules cancéreuses in vivo ne peuvent pas totalement être reproduites in vitro. De plus, les souris de souche NSG qui seront utilisées dans ce projet permettent, de par leur immunodéficiência, de greffer des cellules tumorales primaires, c'est-à-dire provenant directement d'un patient. Cela nous permet donc d'avoir un modèle animal très proche de la réalité. Pour les modèles tumoraux et le suivi des réponses, 1422 souris devraient être utilisées au cours de cette étude. Afin de respecter le principe de réduction, les expériences ont été conçues afin de coordonner plusieurs paramètres d'analyse à partir d'expériences individuelles et permettent une analyse longitudinale. Cela a réduit le nombre total d'animaux requis. De plus, si les premiers résultats obtenus sont statistiquement significatifs et suffisamment homogènes, le nombre d'animaux et de répétitions d'expérimentations sera diminué.

Les conditions d'hébergement ainsi que les méthodes utilisées seront les plus appropriées pour réduire au maximum toute forme de souffrance physique et morale que pourraient ressentir les animaux. Les indicateurs de souffrance tels que le poil hérissé, l'absence de mouvement, la taille de la tumeur excédant 10% du poids de l'animal et/ou des ulcérations de la tumeur seront observés quotidiennement.

18449 L'accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique induit la mort de cellules nerveuses dans plusieurs régions cérébrales. Il n'existe à ce jour aucun traitement pharmacologique efficace pour réparer (ou remplacer) les cellules endommagées par l'ischémie cérébrale. Un des enjeux majeurs dans ce domaine de recherche est de trouver le moyen le plus approprié d'administrer un agent pharmacologique capable d'agir directement au niveau des cellules lésées. En effet, de nombreux traitements ne passent pas la barrière hémato-encéphalique empêchant donc les substances pharmacologiques d'agir directement dans les zones affectées par l'ischémie. Les injections intrapéritonéales, ou sous-cutanées, de traitements pharmacologiques ne garantissent pas que l'agent en question atteigne le tissu nerveux. De plus, il est possible que cette substance induise des effets secondaires en interagissant avec d'autres organes. L'efficacité potentielle du traitement est donc fortement réduite car la méthode d'administration n'est pas appropriée.

Il est donc nécessaire de développer un moyen d'administrer les traitements afin qu'ils agissent directement dans la zone lésée pour éviter ce genre de complications secondaires. Bien que cela soit encore réservé au domaine préclinique, plusieurs auteurs postulent que ces méthodes ont toutes leurs chances d'arriver au domaine clinique dans les prochaines années. Cependant, les

injections intracérébrales directe d'un traitement ne sont pas suffisamment efficaces à cause d'une dispersion trop étendue dans l'hémisphère lésé ou d'un effet trop bref du produit. Par ailleurs, la répétition de ces injections dans le cerveau sur une période donnée après l'AVC peut être également discutable en termes d'applications cliniques.

Les hydrogels biodégradables sont aujourd'hui considérés comme des candidats encourageants pour délivrer des traitements pharmacologiques potentiellement efficaces de manière locale et avec un dosage optimal, sans répéter les injections intracérébrales (une seule injection). Ces hydrogels sont capables d'encapsuler un traitement pharmacologique pour pouvoir le libérer dans une zone cible du cerveau en se dégradant progressivement au cours du temps (plusieurs jours généralement). Il peut donc être injecté directement dans le site de la lésion. Sa dégradation va donc permettre la libération progressive de l'agent pharmacologique qu'il contient. La non-toxicité pour les neurones de l'hippocampe de l'hydrogel thermosensible (liquide en dessous de 35°C mais qui se gélifie à température supérieure) qui nous intéresse a déjà été validée. De plus, sa capacité à être injecté par stéréotaxie (in vivo) avec un microinjecteur a également été prouvée.

Ainsi, l'objectif sera de tester l'efficacité de ce nouvel hydrogel capable d'administrer des traitements encourageants dans les zones lésées du rat adulte ayant subi une ischémie cérébrale par la Transient Middle Cerebral Artery Occlusion (tMCAO) en le comparant aux autres méthodes plus conventionnelles.

La règle des 3R sera respectée dans ce projet :

Remplacement : il n'existe à l'heure actuelle aucun modèle de substitution in vitro pour étudier l'impact de l'implantation d'hydrogel post-ischémie cérébrale. Le rat est un modèle de choix pour étudier les mécanismes de neuroplasticité induit par ce traitement. La complexité de l'ischémie cérébrale ne peut pas être reproduite entièrement par des méthodes alternatives. Il n'existe pas non plus de méthodes alternatives capables d'étudier les effets d'un traitement pharmacologique sur le comportement des animaux (fonctions sensorimotrices et cognitives).

Réduction : Nous utiliserons le nombre minimum d'animaux pour chaque groupe, nécessaire à la réalisation d'un test statistique paramétrique, soit un total de 120 rats Wistar, mâles et femelles (même nombre dans chaque groupe).

Raffinement : Les expérimentations seront optimisées dans l'optique de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la douleur ou l'angoisse subie par les rats afin d'obtenir des données qui soient le moins biaisées possible par le "mal-être" de l'animal. Par exemple, l'environnement des cages sera enrichi par la présence d'objets afin de réduire l'ennui des animaux. Les animaux resteront en groupe dans la cage (pas d'isolement social). La nourriture (humidifiée car plus facile pour se nourrir après ischémie cérébrale) sera à disposition de l'animal directement dans la cage après l'ischémie cérébrale. Les animaux seront également familiarisés avec les différents outils de mesure (tapis roulant, cage pour le comportement, plateforme du Barnes Maze). Concernant les points limites, le protocole sera arrêté si l'animal présente des difficultés à respirer (visualisées par une augmentation du rythme respiratoire au niveau des flancs de l'animal), si le rat est prostré ou en retrait, si ses poils sont hérissés (voir plus bas les points limites détaillés). L'analgésie est réalisée par injection en sous-cutanée en post-opératoire toutes les 12h pendant 24h de buprénorphine (0,05 mg/kg). La première injection est réalisée 30 min avant la chirurgie. Lors de la chirurgie sous isoflurane (induction 4-5 % et maintien entre 2 et 2,5 %), une dose de 0,2 ml de 0,5 % de ropivacaïne est administrée en sous-cutanée au niveau de la zone à inciser (crâne).

18450 La prévalence des maladies neurodégénératives (Parkison, Alzheimer, ...), des troubles de l'humeur (stress, dépression, anxiété, ...) ou encore des maladies psychiques (dépression, autisme...) apparaît plus élevée chez les personnes souffrant de troubles intestinaux chroniques tels que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) ou encore le syndrome de l'intestin irritable (SII). Inversement, les patients dépressifs présentent un risque multiplié par deux de développer une MICI par rapport à des personnes sans troubles psychiques. Ces observations soulignent l'existence d'une relation complexe bidirectionnelle entre l'intestin et le cerveau que l'on appelle communément l'axe « intestin-cerveau ».

Les connaissances acquises sur les fonctions des bactéries intestinales (microbiote) ont élargi ce concept de communication bidirectionnelle « intestin-cerveau » à l'axe « microbiote-intestin-cerveau », en soulignant l'importance du microbiote intestinal dans la régulation de la communication entre l'intestin et le cerveau.

L'alimentation est l'un des facteurs modificateurs les plus importants du microbiote intestinal et par conséquent du dialogue « intestin-cerveau ».

Les vitamines B9 et B12 jouent un rôle essentiel dans la production du matériel génétique (ADN, ARN) et des acides aminés nécessaires à la croissance cellulaire, ce qui explique leur caractère indispensable au cours du développement. Ces micronutriments sont obtenus principalement à partir de légumes à feuilles (B9) et à partir des aliments d'origine animale (B12). La carence nutritionnelle ou due à une maladie acquise ou génétique, peut avoir de lourdes conséquences sur la santé. Ces conséquences sont plus graves si la carence se produit dans des étapes précoces de la vie.

Ces dernières années, de nombreux travaux ont porté sur les modifications, tant quantitatives que qualitatives, de l'alimentation maternelle durant la grossesse et sur leurs conséquences à moyen terme en tant que déterminants de maladies métaboliques dans l'enfance et à l'âge adulte (effet transgénérationnel par programmation foétale).

Plusieurs études ont montré qu'une carence en vitamines B9/B12 est un facteur de risque dans le cadre des pathologies neurodégénératives. Au niveau périphérique, cette carence pendant les périodes gestationnelle et périnatale engendre également un déficit pondéral définitif. Plus spécifiquement, au niveau intestinal, la carence en vitamines B9/B12 est également un facteur de risque pour les MICI.

Notre hypothèse est qu'une carence précoce en vitamines B9/B12 peut modifier la composition du microbiote intestinal chez la mère carencée. Cette modification du microbiote intestinal pourrait être transmise à la descendance, perturbant ainsi la communication microbiote-intestin-cerveau. Cette perturbation du dialogue intestin-cerveau pourrait représenter une éventuelle prédisposition au développement de pathologies intestinales et neurologiques chez la descendance issue de la programmation foétale par carence en donneurs de méthyle.

1. Remplacement : Il n'existe pas d'approche *in vitro* pour étudier les conséquences d'une carence nutritionnelle en vitamines B9 et B12 sur le dialogue intestin-cerveau. En effet, ce dialogue implique différents acteurs tels que le microbiote, l'intestin et le cerveau mais également différentes voies de communication comme la voie nerveuse, sanguine, immune ou encore endocrine. Les modèles cellulaires ne permettront donc pas d'étudier la dynamique et l'intégralité de ce dialogue.

2. Réduction : L'objectif de cette étude est de mettre en évidence que la nutrition de la mère pendant la grossesse et l'allaitement est un des facteurs clés influant sur la santé de la descendance à l'âge adulte (effets transgénérationnels). Pour cela, une étude à moyen terme chez la descendance est nécessaire afin d'identifier une éventuelle prédisposition au développement de pathologies intestinales et neurologiques postnatales issue de la programmation foétale par carences en vitamines B9 et B12.

Le nombre d'animaux (58 rattes et une estimation à 80 rats) requis s'explique d'une part par la durée de l'étude qui porte sur plusieurs stades chez les descendants et d'une autre part par la nécessité d'obtenir des données statistiques fiables en limitant la variabilité interindividuelle et obtenir ainsi une interprétation scientifique efficace. Pour cela, nous aurons besoin de 58 rattes, 20 embryons et 80 rats post-natal).

3. Raffinement : Dès leur réception, les animaux auront une période d'acclimatation de deux semaines pour s'adapter à leur nouvel environnement. Ils seront hébergés dans une animalerie dotée de tous les paramètres nécessaires (température, hygrométrie, filtration de l'air, ...) à leur bien-être. Les neuf procédures expérimentales (régime spécial, prélèvements sanguins, tests de comportements et coloscopie) dont deux sont classées sévères auront lieu au sein de l'animalerie, dans un environnement sécurisant pour l'animal et les coloscopies se feront sous anesthésie générale. Une procédure spécifique à l'estimation et la suppression de la douleur est mise en place. Le point limite est fixé selon une grille d'évaluation des signes de mal-être établie dans notre EU et

validée par notre vétérinaire référent (isolement, yeux fermés, dos voûté, poils hérissés, immobilité, perte de poids de plus de 10% en moins de 4 jours, déshydratation, yeux et abdomen creux, automutilation, etc...). En fin de protocole, les animaux seront mis à mort et des organes d'intérêts prélevés pour permettre les analyses biologiques. Les rats mâles, qui sont utilisés que pour la reproduction dans notre étude, seront adressés à la Faculté des Sciences et Technologie de l'Université de Lorraine pour leur utilisation en enseignements de travaux pratiques.

18451 L'objectif principal de notre travail est d'évaluer un dispositif de détection précoce des signes d'insuffisance cardiaque afin d'en permettre une prise en charge rapide et adaptée en pathologie humaine. Le développement d'un premier prototype de Dispositif d'Investigation Cardio-Respiratoire (DICR) filaire nous a permis de démontrer notre capacité à détecter les signaux électriques et mécaniques issus de l'activité cardiaque et respiratoire sur animal anesthésié. Dans un deuxième temps, la mise au point d'un DICR miniaturisé capable de transmettre les signaux sans fil a permis d'obtenir des mesures sur animaux en conditions ambulatoires. Dans cette nouvelle phase, l'objectif est d'analyser le DICR en condition de suivi d'insuffisance cardiaque à partir d'un DICR et un émetteur implantés chirurgicalement et connectés sans fil à une station de recueil restant à proximité de l'animal.

Le projet se décompose en 3 procédures :

- 1 - mise en place chirurgical du Dispositif d'Investigation Cardio-Respiratoire miniaturisé,
- 2 - création d'un modèle d'insuffisance cardiaque par réalisation d'un infarctus myocardique contrôlé,
- 3 - stabulation, et suivi cardio-respiratoire permettant d'enregistrer les modifications de fonction jusqu'au signes d'insuffisance cardiaque.

Les phases 1 et 3 ont déjà fait l'objet d'une description détaillée et obtenues une autorisation éthique. Le dossier actuellement déposé vise à préciser la deuxième étape, réalisée d'un établissement utilisateur différent de deux autres phases.

Le modèle d'altération de la fonction cardiaque s'appuie sur des études ultérieures reposant sur la création délibérée d'un infarctus du myocarde par l'injection d'agent occlusif dans les artères coronaires. L'infarctus provoqué est responsable d'une dégradation progressive de la capacité de contraction du muscle cardiaque pouvant évoluer jusqu'à l'insuffisance cardiaque terminale.

Au maximum de 24 mini-porcés seront utilisés dans le projet pour démontrer la pertinence et l'intérêt du DICR. La règle des 3R a été appliquée dans la conception du protocole :

- Réduction : le nombre d'animaux impliqués est limité au maximum, sans que cela puisse compromettre les conclusions du projet sur la faisabilité de l'approche ;

ce protocole a été construit afin de regrouper l'intégralité des étapes d'analyses scientifique et compétences humaines complémentaires pour une réduction optimal du modèle animal.

- Raffinement : les équipes impliquées dans ce projet sont spécialistes des approches in vivo chez l'animal, ce qui assure des approches chirurgicales maîtrisées, ainsi qu'un soin et un hébergement des animaux dans des conditions optimales. Médecins, vétérinaires et animaliers associeront leurs expertises pour assurer la meilleure prise en charge des animaux ;

dans cette demande, le raffinement de l'utilisation des animaux est mis en oeuvre via la réalisation de plusieurs étapes sur chaque animal afin de limiter encore le nombre d'animaux.

Le nombre de procédures par animal est limité car il s'agit de procédure sans réveil et par conséquent sans douleur. il n'y a pas d'animalerie dans notre service. le modèle animal arrive avec notre animalier et sous un protocole de transport adéquat et validé par les services vétérinaires, et il est directement pris en charge avec notre protocole anesthésique.

en effet, toute prise en charge anti stress et anesthésique de l'animal est réalisé selon notre protocole vétérinaire et supervisée par une clinique vétérinaire qui gère nos travaux en la matière et a formé l'équipe d'accompagnement animalier.

- Remplacement : il n'existe pas d'alternative à l'expérimentation animale pour développer et valider ce type de dispositif destiné à la mesure de paramètres physiologiques in vivo. Le remplacement n'est donc pas possible.

18452 Malgré l'existence de vaccins antigrippaux, la grippe reste une maladie importante qui provoque 500 000 victimes par an dans le monde. Du point de vue de la santé mondiale, le manque d'efficacité, de disponibilité, et d'accès aux vaccins antigrippaux, ainsi que leur coût élevé, limitent considérablement le contrôle de la grippe saisonnière en cas de pandémie. Actuellement, l'efficacité vaccinale reste de plus faible et protège seulement 40% des personnes vaccinées, ce qui est insuffisant pour le contrôle global de la grippe. Récemment, de nouvelles conceptions de vaccins antigrippaux ont été développées dans le but d'augmenter l'efficacité vaccinale, de réduire le coût des vaccins et de faciliter l'accès à la vaccination. Une de ces approches combine une faible dose d'un vaccin commercial contre la grippe saisonnière avec un nouvel adjuvant (produit qui stimule le système immunitaire) puissant.

La présente étude vise à évaluer, en amont d'essais de phase I et IIa, la toxicologie réglementaire préclinique de 5 formulations vaccinales correspondant au vaccin commercial Vaxi-flu4 (un vaccin antigrippal tétravalent inactivé, qui se compose d'une souche A/H1N1, d'une souche A/H3N2 et de souches grippales B Victoria et Yamagata) combiné avec 5 nouveaux adjuvants LVA (1 à 5) dans le modèle animal rat Wistar. Ces essais pré-cliniques requièrent, au niveau réglementaire, le test des adjuvants et des formulations vaccinales chez au moins 2 espèces (rongeur et non-rongeur) de mammifères. Le modèle rat représente un des deux modèles choisis pour les essais toxicologiques réglementaires. Cette approche est indispensable car la réponse toxique au niveau d'organismes entiers représente les réponses de cellules différentes aux agents toxiques et ne peut être remplacée par des tests expérimentaux réalisés sur les cellules ou les organes en dehors de leur contexte naturel.

Nous allons étudier, dans le modèle rat, la toxicité potentiellement induite par l'injection des formulations de vaccin Vaxi-Flu4 + adjuvant LVA(1-5), du Vaxi-Flu4 sans adjuvant, ou des adjuvants LVA(1-5) sans Vaxi-flu4 1) dans un court laps de temps par l'administration d'une dose unique 2) sur 1,5 mois suite à deux injections à 1 mois d'intervalle 3) sur 3 mois suite à 3 injections à un mois d'intervalle. L'espèce rat est régulièrement utilisée pour le développement de vaccins, pour le contrôle de la qualité ainsi que pour l'évaluation réglementaire préclinique de la toxicité des nouveaux produits (vaccins comme adjuvants). Le rat, plus grand que la souris (environ 10 fois plus), est plus facile à manipuler. Sa taille autorise aussi des volumes de prélèvement plus importants qu'avec la souris ce qui est d'importance pour notre projet. Pour accomplir les études précliniques de toxicité des nouveaux adjuvants et des formulations vaccinales nous planifions d'utiliser 96 rats par an, soit 480 rats en 5 ans.

Tout au long de ces études, nous allons respecter la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). Pour diminuer le nombre d'animaux seules les études considérées comme absolument indispensables seront conduites. Le nombre minimum d'animaux nécessaires sera déterminé en se basant sur les données acquises lors d'expériences préliminaires, d'études précédentes publiées dans la littérature, mais aussi grâce à un test de puissance afin d'incorporer un nombre minimum d'animaux tout en gardant la possibilité d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. Le nombre d'injections, la durée de l'étude post injection seront choisies en concordance avec les normes réglementaires pour les tests toxicologiques des futurs médicaments. Les rats seront hébergés deux par deux dans la même cage, sans contrainte, et selon les conditions en vigueur dans l'élevage. Les contacts sociaux obtenus par l'hébergement des différents animaux dans des cages adjacentes participeront à l'enrichissement du milieu pour assurer le bien-être psychologique et physique des animaux. Celui-ci sera complété par l'apport d'objets (bouts de tissus, petites boîtes en cartons, bouts de papier et autres objets non dangereux et non toxiques) dans l'environnement. L'hébergement est strictement contrôlé et maintenu stable (bruits, odeurs, lumière, température et hygrométrie conformes à la directive de 2010). Toutes les précautions seront prises pour minimiser les éventuelles souffrances engendrées par l'expérimentation. Les animaux seront surveillés quotidiennement pour détecter le plus rapidement possible d'éventuels signes d'altération de leur

santé, de leur bien-être, ou de douleur, et une grille de score sera utilisée pour aider à évaluer l'impact des injections sur le bien-être animal et définir des points limites. Nous ferons appel à un vétérinaire référent dès l'apparition de signes cliniques pour une prise en charge immédiate nécessitant soit des traitements antalgiques ou antipyrétiques, soit un arrêt de l'expérimentation.

18453 Afin de disposer de médicaments efficaces et sûrs, il est aujourd'hui encore nécessaire d'effectuer quelques tests sur l'animal. Ces tests consistent à étudier l'efficacité ou la toxicité des futurs médicaments, avant leurs mises sur le marché et pour limiter tout risque sur l'Homme adulte, les enfants ou les nourrissons. Souvent, ces médicaments serviront de base pour en produire de nouveaux utilisables en médecine vétérinaire pour traiter les maladies animales.

Les tests précliniques nécessitent une administration de la substance à évaluer par différentes voies représentatives des modalités d'injection chez l'homme. Après administration les animaux sont suivis pour évaluer la biodistribution de ces substances et leurs effets potentiels sur la température, l'activité et l'état général. Les techniques décrites dans ce projet consistent en l'implantation de dispositifs permettant l'administration de substances, la réalisation de prélèvements sanguins ou la mesure en continu de la température corporelle.

Ces tests entrent comme prérequis réglementaires pour obtenir les autorisations de commercialisation des nouveaux médicaments.

Avant les tests sur l'animal, les produits sont généralement testés et présélectionnés avec attention *in vitro*. Demeurent certains tests nécessitant l'utilisation de rongeurs ou de gros animaux qui ne peuvent être efficacement remplacés par des méthodes alternatives. En effet, pour ces tests, seul l'animal de laboratoire dans son entièreté et vivant permet d'étudier la disponibilité d'un produit dans un tissu donné (sain ou malade), de son influence sur le métabolisme, de sa vitesse d'élimination et de sa toxicité.

Néanmoins, les procédures utilisées dans ce projet ont été étudiées attentivement et caractérisées de façon extensive par une bibliographie approfondie. Ainsi, les techniques utilisées dans ce projet ont été optimisées, afin d'assurer un maximum de bien-être pour l'animal dans le strict respect des 3Rs.

Un soin particulier dans le raffinement des méthodes est assuré et garantit l'utilisation systématique du modèle apportant le maximum de réponses scientifiques et le minimum de souffrance pour l'animal. En particulier, des points limites clairs sont établis (incluant une surveillance de l'aspect général, l'aspect du pelage, des yeux, la posture, les réactions de l'animal quand il est approché ou stimulé, la respiration, l'appétit, le poids, l'état d'hydratation, les tremblements ou convulsions), afin d'assurer d'une part, un bon suivi des animaux et d'autre part, une fin sans souffrance ou angoisse lorsque nécessaire. Les méthodes d'euthanasie choisies, le cas échéant, sont sélectionnées pour supprimer toute forme d'angoisse, de stress ou de douleur.

Lorsque nécessaire, les animaux sont anesthésiés et analgésiés. Le programme d'anesthésie et d'analgésie est défini par un vétérinaire, afin de réduire au maximum toute douleur ou sensation de souffrance. De la même manière, lorsque les protocoles l'exigent, les chirurgies sont raffinées au maximum, en mettant à disposition des animaux, de l'oxygène ou air ambiant à concentration ajustable, des tapis chauffants, des lampes chauffantes et de soins post-opératoires complets.

De leur arrivée au laboratoire jusqu'à leur sortie de l'étude, les animaux sont manipulés avec soin, habitués à l'homme, manipulés fréquemment et leurs conditions de vie sont constamment améliorées pour garantir un environnement de vie enrichie (Litières, espace de jeux, jouets, matériaux à ronger, matériaux pour se cacher etc...) Les animaux grégaires sont hébergés en groupes, tout en conservant l'espace individuel nécessaire à l'expression des comportements de vie normal.

Enfin, nous ajoutons en fin d'expérience tous les prélèvements nécessaires (histologie, prélèvement sang etc...) de façon à pouvoir effectuer l'ensemble des analyses nécessaires sur les mêmes lots. Cela permet de réduire significativement le nombre d'études et d'éviter d'avoir à dupliquer des expériences.

L'ensemble de ces mesures permet de réduire le nombre d'animaux de façon à optimiser les réponses scientifiques tout en garantissant une puissance statistique suffisante pour interpréter les résultats de façon correcte, évitant ainsi une répétition des tests.

Le nombre de d'animaux prévu sur la durée du projet est de 5000 animaux (2300 rats, 2000 souris, 200 cobayes, 200 furets, 100 lapins, 100 porcs et 100 chiens).

18454 Les cellules B sont des cellules du système immunitaire, qui patrouillent l'organisme afin de détecter l'intrusion de pathogènes ou de cellules anormales dans le corps (comme les cellules cancéreuses) et permettent de déclencher une réponse dite humorale, aboutissant à la production d'anticorps dirigés contre l'ennemi. Chaque jour, des millions de cellules B se développent dans l'organisme, ayant chacune une spécificité propre, qui est générée aléatoirement lors de la synthèse de ces cellules par des mécanismes complexes. Lors d'une vaccination dite conventionnelle, l'injection au patient d'un pathogène déficient, atténué, ou d'un fragment de pathogène permet d'orienter, de sélectionner les cellules B qui reconnaîtront efficacement ce pathogène et qui sauront ainsi défendre de manière optimale l'organisme lors d'une réelle infection.

Lorsqu'elles patrouillent dans l'organisme, Les cellules B expriment un anticorps à leur surface, qui leur permet donc de «screener» l'environnement. Lorsqu'une cellule B reconnaît une cible, elle se différencie en deux types cellulaires.

:1) des cellules appelées plasmocytes, qui vont produire les anticorps cette fois sous forme soluble et 2) des cellules B mémoires, qui resteront très longtemps dans le corps pour être capable de réagir très vite et très fortement lors d'une éventuelle future rencontre avec la cible.

L'objectif de ce projet est d'éduquer les cellules B à reconnaître spécifiquement un antigène tumoral (protéine sur-exprimée uniquement par les cellules cancéreuses). Les cellules B seront reprogrammées pour exprimer un anticorps monoclonal d'intérêt. Ainsi modifiées, elles pourront reconnaître la cible tumorale et induire une réponse immunitaire efficace. Il s'agit d'une vaccination par thérapie génique qui combine l'effet long terme d'une stratégie de vaccination «classique» (génération de cellules mémoires) et l'efficacité d'une stratégie à base d'injection d'anticorps (réponse immédiate).

Dans ce projet, la cible est une protéine surexprimée dans plusieurs tumeurs et qui constitue donc une cible de choix pour le traitement de différents types de cancers (mésothéliomes, adénocarcinomes de l'ovaire et du pancréas par exemple). Les souris seront injectées avec des cellules tumorales, et greffées en parallèle avec des cellules B préalablement modifiées (ou non) pour reconnaître et attaquer la tumeur.

Dans une 1ère procédure, divers modèles tumoraux seront évalués afin de valider le suivi de la croissance tumorale. Les cellules seront greffées en sous cutané, puis le volume tumoral, l'aspect de la tumeur, sa cinétique de pousse, la capacité métastatique, l'incidence et les signes cliniques généraux évocateurs de souffrance de la souris seront évalués. Les modèles testés représentent différentes origines tumorales: pancréas, mélanome ou sein, représentatif des tumeurs humaines exprimant la cible.

La seconde procédure consiste à valider l'efficacité thérapeutique de l'injection de cellules B reprogrammées contre cette cible. Les souris seront utilisées à partir de 8 semaines, lorsque leur système immunitaire sera mature. Elles seront injectées avec les modèles tumoraux évalués en procédure 1 (uniquement ceux ayant les caractéristiques requises) puis greffées avec les cellules B thérapeutiques. Trois zones (antigènes) différentes de la protéine cible seront visées et les résultats seront comparés à des groupes contrôles utilisant des cellules B non modifiées ou modifiées pour exprimer une protéine fluorescente. Le suivi de la tumeur sera effectué comme lors de la procédure pilote, et des prélèvements sanguins seront réalisés pour suivre les cellules injectées ainsi que la production d'anticorps. Lors de la mise à mort, un grand nombre d'analyses sera réalisé sur le sang, la tumeur, les éventuelles métastases, et les différents organes du système immunitaire (rate, ganglions) afin de répondre aux différentes questions scientifiques inhérentes à ce projet, en plus de l'efficacité thérapeutique.

Les protocoles proposés répondent à la règle des 3R (Réduire, Raffiner et Remplacer).

Remplacement : Les premières étapes de validation des vecteurs de transfert de gène ont été réalisées sur des cellules. Cependant, ce projet consiste à évaluer l'efficacité thérapeutique d'une vaccination par thérapie génique, faisant intervenir l'ensemble des cellules du système immunitaire, car les cellules B «médicament» recruteront et communiqueront avec d'autres cellules pour s'attaquer à la tumeur. Il n'est donc pas possible de mimer ce type de réaction immunitaire sans utiliser le modèle vivo.

Réduction : les modèles tumoraux testés le seront de manière séquentielle et seuls les modèles pertinents seront ensuite utilisés dans la 2nde procédure afin de réduire le nombre d'animaux. Le nombre de souris utilisées dans chaque groupe a été réduit à son minimum sans pour autant compromettre les objectifs du projet ni les interprétations statistiques des résultats, tout en tenant compte des variations inter-animaux. Le taux de prise de greffe tumoral établi en procédure 1 permettra également d'ajuster le nombre d'animaux utilisés en procédure 2. Le nombre maximal d'animaux est estimé à 380 souris.

Raffinement : Un suivi adapté des animaux et la définition de points limites précoces et prédictifs de l'apparition d'un mal être permettent de limiter au maximum toute souffrance animale. Un suivi adapté des croissances tumorales sera réalisé (suivi du volume, de l'absence de nécrose par exemple). Les signes cliniques évocateurs des métastases pulmonaires seront particulièrement suivis pour limiter toute souffrance (essoufflement, poids, comportement). Certaines étapes de la procédure se dérouleront sous anesthésie afin de minimiser le stress imposé à l'animal, notamment lors des injections de tumeurs ou des cellules tumorales et lors des mesures des croissances tumorales. Cependant, afin de ne pas biaiser les interprétations et l'efficacité de la thérapie, si un animal venait à présenter des signes cliniques évocateurs de souffrance, il serait immédiatement mis à mort sans traitement analgésique préalable.

18455 Les lombalgies et les traumatismes graves font partie des 150 pathologies de l'appareil locomoteur qui touchent des millions de gens dans le monde, selon l'Organisation mondiale de la Santé (OMS). Ces pathologies touchent plusieurs composantes anatomiques : vertèbres, disques intervertébraux, etc.

La mobilité du rachis et de l'ensemble des composantes de la colonne vertébrale dépend de l'équilibre de cette dernière où le disque intervertébral « DIV » est un élément essentiel.

Les hernies discales, font parties des pathologies majeures qui touchent le rachis. Le traitement chirurgical de cette affection est basé sur le retrait des tissus herniés. Certaines approches restent limitées en termes d'efficacité fonctionnelle, car elles agissent parfois de manière inappropriée sur l'équilibre du rachis ce qui induit une dégénérescence accélérée des DIV.

Depuis plusieurs années, de nombreuses approches thérapeutiques ont été testées notamment par l'utilisation de substituts synthétiques dans le but de maintenir la structure du DIV et d'éviter une régression tissulaire prématurée.

Le présent projet consiste en l'évaluation chez la brebis de matériaux innovants issus de l'ingénierie tissulaire et destinés à la thérapie du DIV chez l'Homme. Ces matériaux ont déjà fait leurs preuves en termes de biocompatibilité in vitro, ce projet apportera une preuve préclinique d'efficacité sur des animaux d'un grand gabarit pouvant être transposable à l'Homme. Il est prévu d'évaluer ces nouveaux biomatériaux par injection dans le disque intervertébral spontanément dégénéré chez la brebis âgée.

Cette étape in vivo est indispensable pour réaliser les essais cliniques chez l'homme. Afin de répondre aux différentes étapes de validations réglementaires, le projet nécessite l'utilisation de 34 brebis.

Ce projet est conçu et sera réalisé en conformité avec la règle des 3 Rs :

Remplacement : l'efficacité des matériaux dans la thérapie du DIV ne peut être démontrée que par l'évaluation in vivo. Le modèle ovin a été largement décrit dans la littérature et a été choisi en raison de la grande proximité anatomique et biomécanique entre le rachis de l'Homme et celui de la brebis.

Réduction : le nombre d'animaux prévu dans ce projet est réduit au minimum avec un objectif fixé afin d'obtenir des résultats significatifs permettant de conclure sur l'efficacité et la sécurité de cette approche. Un suivi in vivo par imagerie (radiographie et IRM) et par analyses sanguines sera réalisé afin de limiter au maximum le nombre d'animaux sacrifiés tout en obtenant des résultats pertinents sur l'état du disque intervertébral lombaire et des marqueurs sanguins.

Raffinement : les animaux seront hébergés dans des conditions adaptées à l'espèce avec un enrichissement du milieu. Tous les animaux auront libres accès à l'eau et à la nourriture durant toute la durée de la procédure. Les animaux seront suivis cliniquement par un vétérinaire compétent lors des étapes importantes (à l'arrivée, après la chirurgie) et surveillés tous les jours par les animaliers prévenant rapidement le responsable du projet et le vétérinaire d'une quelconque anomalie. Une grille comportementale sera utilisée afin d'évaluer la douleur chez l'animal et les critères limites justifiant un arrêt prématuré du protocole et l'euthanasie des animaux. L'ensemble des procédures chirurgicales et d'imagerie se dérouleront sous anesthésie générale selon les bonnes pratiques vétérinaires.

18456 Les maladies génétiques liées à des déficits d'apports de certaines molécules (appelées les donneurs de groupement chimique méthyle) sont causées par des mutations dans les génétiques. Parmi les gènes touchés par ce type de mutation, le gène de la méthionine synthase (Mtr) joue un rôle central dans la disponibilité en "groupements méthyles". Chez l'Homme, cette mutation entraîne le développement d'une maladie dite "rare" mais très handicapante avec une prévalence de 1 sur 1 million et présentant des symptômes sanguins sévères ainsi que des troubles neurologiques variés (retard développemental, atrophie cérébrale, hypotonie, crises d'épilepsie, ataxie). Pour comprendre les mécanismes de cette pathologie et rechercher de nouvelles pistes thérapeutiques, nous avons développé un modèle de souris transgénique permettant de reproduire chez la souris les conséquences de la mutation du gène Mtr dans le cerveau, afin de nous concentrer sur les problèmes neurologiques des patients humains qui ne sont pas traités efficacement de nos jours. Cette lignée de souris nous sert de modèle pour la pathologie humaine et nous l'utilisons pour tester de nouvelles pistes thérapeutiques, avec certains agents pharmacologiques (voir exemple ci-après).

1. Remplacement : il n'existe pas d'alternative d'approche in vitro car l'essentiel du projet porte sur l'étude des comportements de l'animal selon son statut génétique et en réponse au médicament.

2. Réduction : l'étude comportementale portera sur des groupes mâles et femelles de jeunes souris de laboratoire, réparties en 2 groupes d'études selon le génotype : contrôle (génotype "sauvage") ou "muté" pour le gène MTR (génotype "KO MTR"). Chaque groupe sera subdivisé en 3 sous-groupes : issus de mères non traitées, issus de mères traitées avec de la vitamine B12 (qui représente le traitement humain actuel peu efficace) et issus de mères traitées avec l'agent pharmacologique. Les mères seront donc divisées en 3 groupes en fonction du traitement reçu avec 7 femelles par groupes soit 21 femelles adultes reproductrices en tout. L'étude ne portera pas sur les souris-mères, mais sur les petits engendrés. A la naissance des petits, ces derniers seront génotypés afin de les répartir dans les différents groupes (mâles, femelles, "sauvages", "KO MTR", traités ou non). Ainsi, 21 femelles réparties dans les différents groupes de traitement, accouplées à 7 mâles permettront de générer et 120 souriceaux impliqués dans les procédures expérimentales, pour un total de 148 animaux qui seront nécessaires pour cette étude afin d'obtenir une puissance statistique suffisante tout en réduisant au maximum le nombre d'animaux.

3. Raffinement : toutes les procédures expérimentales (traitement pharmacologique, étude comportementale, mise à mort) auront lieu dans l'animalerie, dans un environnement habituel sécurisant pour l'animal. Une procédure d'estimation et suppression de la douleur est mise en place. Le point limite est fixé selon un score défini au préalable et qui tient compte des signes éventuels de mal-être (isolement, yeux fermés, dos voûté, poils hérissés, immobilité, perte de poids, déshydratation, yeux et abdomen creux, automutilation). En fin de protocole, les souriceaux, sujets de l'étude, âgés de 36 jours seront mis à mort et des organes prélevés pour permettre des analyses biochimiques. Les 21 mères initiales seront elles aussi mises à mort car elles portent une modification génétique et certaines auront subi un traitement. Cette même molécule

pharmacologique a par ailleurs déjà été testée d'un point de vue toxicologie sur des cellules en cultures. Ces tests ont révélé que l'agent choisi pour l'étude ne présentait pas de toxicité cellulaire. D'autre part, un agent de la même famille pharmacologique a déjà été utilisé dans une étude précédente, sans révéler de toxicité, ni de mortalité chez les souris.

18457 Le psoriasis est une maladie inflammatoire chronique touchant environ 2 à 3 % de la population mondiale et 1.5 à 2 millions de personnes en France. Elle présente des points communs avec les maladies auto immunes et est de plus en plus considérée comme telle. Cette pathologie se manifeste par des lésions de la peau : érythèmes multiples sur différentes parties du corps, dont la sévérité dépend de la surface atteinte. Il n'existe pas de traitement permettant de guérir du psoriasis mais seulement des moyens de contrôler la maladie voire d'obtenir de longues périodes de rémission. Cette maladie constitue ainsi un fardeau à la fois physique et psychologique dans la vie quotidienne des patients qui en sont atteints. Ce projet vise à mieux comprendre les processus moléculaires impliqués dans la maladie en vue de l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

Des travaux récents ont montré qu'un complexe constitué de plusieurs protéines, appelé inflammasome, impliqué dans la réponse immunitaire, pourrait aussi être impliqué dans le développement du psoriasis.

En utilisant un modèle mimant le psoriasis chez la souris via l'application d'une crème, nous souhaitons étudier le rôle d'une protéine régulant cet inflammasome. Pour cela, nous testerons l'effet de cette crème sur l'apparition des lésions. Également, nous testerons la disparition éventuelle des lésions de la peau après application locale de crème sur (i) des souris génétiquement modifiées pour ne plus produire cette protéine ou cet inflammasome comparativement à des souris non modifiées génétiquement, (ii) des souris exprimant une protéine fluorescente permettant de visualiser l'assemblage du complexe et traitées ou non avec des inhibiteurs de ces protéines.

Pour ce projet, nous utiliserons un maximum de 252 souris, dans 2 procédures, chaque expérience étant réalisée 3 fois. Cependant, dans un souci de réduction, si après deux séries nous obtenions des résultats statistiquement significatifs, la 3ème série ne serait pas effectuée et nous pourrions n'utiliser alors que 168 animaux. Dans un souci de remplacement, l'effet du principe actif contenu dans cette crème a été vérifié in vitro. L'étude de son effet in vivo est donc maintenant nécessaire. En termes de raffinement et afin de garantir le bien-être des souris, celles-ci seront hébergées (5 souris par cage) dans un environnement enrichi (igloo et bague en papier). D'autre part, les expériences ne dureront pas plus de 8 jours au cours desquels les animaux seront surveillés tous les jours, et l'application de points limites précis permettra de détecter toute apparition de signes de souffrance durables. Le cas échéant, les animaux concernés seraient immédiatement euthanasiés.

Ce projet devrait permettre l'identification de cibles potentielles permettant la mise au point de nouvelles thérapies pour une meilleure prise en charge du psoriasis.

18458 Le rhabdomyosarcome (RMS) est la forme la plus fréquente des sarcomes des tissus mous (50 à 60%), représentant 5% des tumeurs pédiatriques solides. Ces tumeurs malignes d'origine musculaire se développent principalement dans la tête et le cou (40%), le tractus génito-urinaire (20%), les membres (20%) et le tronc (10%). On distingue 2 types majeurs de RMS chez l'enfant, le RMS embryonnaire (ERMS) et le RMS alvéolaire (ARMS). Les ERMS (80% des cas) touchent principalement les jeunes enfants de moins de 5 ans. Les ARMS (15% à 20% des patients) sont le plus souvent observés chez les enfants plus âgés et les adolescents.

Malgré les avancées de la médecine personnalisée, il n'y a eu que de faibles progrès dans le traitement des rhabdomyosarcomes. Lorsqu'une cellule devient anormale, elle se retrouve hors de son tissu ou est en excès, elle est normalement éliminée par l'activation de signaux internes aboutissant à la mort cellulaire. La capacité à résister au déclenchement de sa propre mort est l'une des caractéristiques acquises par les cellules tumorales, et les rhabdomyosarcomes ne font pas exception à la règle. Afin d'améliorer la prise en charge médicale des rhabdomyosarcomes chez l'enfant et l'adolescent, notre projet a pour objectif de définir l'efficacité d'une thérapie basée sur l'activation d'une voie alternative de mort cellulaire, à l'aide d'un modèle localisé au niveau du même

site anatomique (orthotopique) chez la souris. Cette voie alternative étant susceptible de déclencher une réponse immunitaire, nous étudierons également son efficacité à recruter le système immunitaire.

Les souris subiront une greffe intra musculaire au niveau de la cuisse de cellules tumorales humaines ou murines. Ces greffes seront réalisées chez des souris de 6 semaines, mais également chez des souriceaux (1 et 3 semaines), afin de mimer l'immaturation du système immunitaire existant en fonction de l'âge, enfants versus adolescents. Lorsque les tumeurs atteindront 200 mm³, les souris recevront une injection d'un mélange de deux molécules dont l'effet est d'induire l'activation et l'expression d'un récepteur impliqué, en conditions physiologiques, dans la défense immunitaire innée. Lorsqu'une tumeur devient détectable visuellement, les animaux seront suivis par échographie pour évaluer avec précision la taille et le volume des tumeurs. Lorsque le volume tumoral est supérieur à 500 mm³, les souris seront mises à mort. Le protocole sera arrêté lorsque 50% des animaux auront dépassé ce point limite ou en l'absence de développement tumoral 8 semaine après la greffe. Enfin, les tumeurs seront collectées après mise à mort des animaux pour analyse afin de collecter un maximum d'informations et de données et de restreindre l'utilisation d'animaux.

Tout au cours de ce projet, les précautions seront prises pour stresser au minimum l'animal. Dès leur arrivée, les souris seront hébergées par groupe de 5 animaux par cage. Dans le but de limiter le stress lié à la captivité, un enrichissement du milieu sera mis en place : du coton sera mis à disposition des souris pour faciliter l'expression d'un comportement naturel. Une période d'acclimatation sera respectée avant l'entrée des animaux dans l'une des procédures présentées ci-après. L'administration d'anesthésique et d'analgésique, un suivi adapté des animaux et la définition précise des points limites précoces et prédictifs d'un mal être, permettent de limiter au maximum la souffrance animale. Pendant 48h post greffe, de la nourriture humidifiée avec un antalgique sera ajoutée au fond de la cage au cas où les animaux présenteraient des difficultés à se déplacer. Dans ce projet nous utiliserons maximum 376 souris. Ce nombre a été réduit au maximum pour permettre une analyse statistique des mesures de prise et de croissance tumorale entre les groupes. Des méthodes *in vitro* et *in silico* font partie intégrante de ce projet ; cependant elles ne peuvent remplacer la totalité des études menées sur les animaux. En effet, la modélisation de la voie de signalisation de mort cellulaire entre le microenvironnement tumoral, le système immunitaire et la tumeur nécessite une étude *in vivo*.

18459 Les progrès concernant la prévention et les soins des escarres ont été importants ces dernières années du fait des avancées de la recherche fondamentale et clinique, d'une prise de conscience de la problématique en termes de santé publique, d'un personnel soignant mieux formé désireux de travailler en pluridisciplinarité et en réseau, de la diffusion de recommandations de bonnes pratiques et du développement de nouvelles technologies.

La protection contre les pressions extérieures et la cicatrisation sont des propriétés physiologiques fondamentales de la peau. Malheureusement le diabète diminue ces propriétés physiologiques, et prédisposent les patients diabétiques aux escarres et à un retard de cicatrisation.

Parmi les stratégies élaborées pour améliorer la cicatrisation des escarres, la kinésithérapie (méthode de massages) est un des moyens reconnus adjuvants de la cicatrisation des escarres en clinique médicale. Malgré ses bienfaits, la kinésithérapie reste malheureusement limitée dans le temps et par certaines circonstances (toilette, repas, examens médicaux, etc). L'action mécanique pourrait être approchée par le système X ressemblant au pétrissage par la main du praticien. Son effet bénéfique a déjà été rapporté pour la prise en charge des brûlures.

Ce projet expérimental a pour objectif de tester l'efficacité du système X sur la prévention et la cicatrisation d'escarres, avant d'envisager une étude clinique multi-centrique.

Pour mener à bien ce projet, des rats sains et des rats diabétiques de type 1 seront utilisés, reproduisant de nombreuses caractéristiques physiopathologiques et histologiques de la maladie humaine. Les escarres seront induites par des compressions répétées de la peau du dos.

Des mesures non invasives seront réalisées sous anesthésie (<30 minutes) pour caractériser la fonction barrière, les propriétés mécaniques et vasculaires de la peau. Les techniques utilisées sont indolores ; elles sont également utilisées chez l'homme. Ces mesures seront réalisées avant et après l'induction des escarres chez des rats sains et diabétiques avec ou sans massages. L'incidence et la sévérité des escarres permettront d'évaluer l'efficacité du système X sur la prévention des escarres. Le délai de fermeture des plaies et la qualité du tissu cicatriciel permettront d'évaluer l'efficacité du système X sur la cicatrisation des escarres.

Notre projet respecte la règle des 3R. Afin de limiter le nombre d'animaux, les mesures seront réalisées sur un même animal. La défense de la peau face aux pressions et la cicatrisation reposent sur une interaction entre les cellules de la peau nécessitant une approche in vivo. Aucune méthode alternative ne peut donc se substituer à l'utilisation des animaux pour la réalisation de notre projet. Le nombre de rats nécessaire à ce projet a été réduit au minimum sans compromettre l'interprétation statistique de nos résultats. Les rats seront suivis avec un soin particulier, ils seront observés 3 fois par semaine au minimum et pesés une fois par semaine minimum. Les points limites sont clairement définis, afin de détecter précocement tout signe de souffrance. Toutes les mesures seront réalisées sous anesthésie et une analgésie sera utilisée pour limiter la douleur lors du traitement des escarres (débridement).

Ce projet concernera 154 rats au maximum.

18460 La sclérose glomérulaire segmentaire focale (FSGS) est l'une des formes classiques des maladies glomérulaires primaires dans la population adulte et des causes de protéinurie asymptomatique ou de syndrome néphrotique. Les patients atteints de FSGS présentent souvent une protéinurie importante, une hypertension, un dysfonctionnement rénal et une fibrose rénale. Son incidence parmi les 18 à 45 ans est élevée et les hommes ont 3 à 4 fois plus de probabilités de développer un FSGS. On estime que 25 à 50% de toutes les personnes souffrant de FSGS développeront une insuffisance rénale chronique dans les 10 ans.

Lutter contre la fibrose rénale représente un enjeu majeur afin de limiter l'évolution vers l'insuffisance rénale. Nos composés ciblant les NADPH oxydases 4 et 1 démontrent une forte action anti-fibrotique. Dans un précédent essai de phase 2, réalisé chez des patients atteints de diabète de type 2 et d'insuffisance rénale, un de ces composés a démontré un excellent profil de sécurité et a obtenu des réductions statistiquement significatives dans plusieurs critères d'évaluation dont la protéinurie.

Nous proposons d'explorer cette nouvelle cible thérapeutique en utilisant un modèle de souris de FSGS induite par Adriamycine. Il se caractérise par l'induction rapide d'une lésion rénale, dans les jours suivant l'administration de cet inducteur. Ce modèle de néphropathie induit des lésions structurelles et fonctionnelles imitant fidèlement la maladie rénale protéinurique chronique chez l'homme. Des interventions préventives et curatives peuvent être envisagées avec ce modèle de souris FSGS.

La finalité de cette étude est d'analyser l'effet de nos composés anti-fibrotiques sur la fibrose et la souffrance rénale, telle qu'évaluée sur le fondement des modifications du débit de filtration glomérulaire. Aucun modèle in-vitro ou ex-vivo n'existe pour mimer toutes les composantes de la fibrose rénale. Un travail important est réalisé au préalable in-vitro sur des cellules humaines dans le but de sélectionner les meilleures molécules à développer. Nous veillerons à ne tester que les molécules les plus avancées et les plus optimisées qui auront déjà démontré des activités performantes, une absence de toxicité cellulaire et des propriétés pharmacocinétiques permettant d'envisager une efficacité in-vivo.

Le projet se découpe en 3 phases : une pilote (80 animaux), un bras préventif (540 animaux) et un bras curatif (240 animaux). Au total, sur l'ensemble du projet de 3 ans : 860 animaux maximum seront utilisés. Les souris se verront administrer du composé ou un placebo par voie orale pendant 15 ou 22 jours. Nous serons tout particulièrement vigilants quant au suivi clinique quotidien et hebdomadaire ainsi qu'au suivi du poids corporel des animaux tout au long des études. Tout animal présentant des modifications de comportement, des signes de prostration ou de souffrance visible

ou qui aura perdu 15% de poids corporel sera exclu de l'expérience et euthanasié. Un avis vétérinaire sera demandé en cas de besoin. Les souris seront hébergées en groupe de 5 à 6 animaux en cages jetables type Innovive et auront à leur disposition de l'eau et de la diète à volonté ainsi qu'un environnement enrichi pour permettre l'interaction sociale (dômes plastiques rouges pour se cacher et des plaques de ouate).

Le test statistique t de student pour échantillons indépendants sera utilisé pour montrer l'effet d'une dose par rapport au groupe contrôle ou au groupe de référence (correction Mann Whitney en cas de non normalité), le test t de student pour échantillons appariés sera utilisé en plus dans le bras curatif et permettra de montrer l'effet dans le temps de chaque traitement (correction Wilcoxon en cas de non normalité) et le test Anova sera utilisé pour comparer les différentes doses ou différents composés testés entre eux. Une valeur de $p < 0.05\%$ sera utilisée pour déterminer la valeur statistique.

18461 Les affections ostéoarticulaires chroniques ou rhumatismales sont une des premières causes de morbidité au monde aussi bien en santé humaine qu'en santé animale. Ces pathologies fortement invalidantes se manifestent de façon aiguë et chronique par de l'inflammation entraînant des douleurs intenses et des pertes de fonctionnalité. Les deux maladies rhumatismales les plus fréquentes sont l'arthrose (ou ostéoarthrite) et l'arthrite rhumatoïde (AR).

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

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

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

Ce projet a donc pour but de développer des nouvelles molécules pouvant cibler un maximum d'effets pathologiques liés aux rhumatismes tels que l'inflammation, l'atteinte osseuse et l'atteinte cartilagineuse.

Les molécules synthétisées seront dans un premier temps testées in vitro puis in vivo. L'objectif de ces études précliniques est de sélectionner les meilleurs candidats thérapeutiques.

La procédure expérimentale n°1 : Optimisation de 3 modèles de pathologies rhumatismales chez la souris et/ou le rat afin de récapituler l'ensemble des affections liées aux rhumatismes chez l'homme. La procédure 1 comptera 90 souris et 270 rats.

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

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

Sur 5 ans, nous utiliserons un maximum de 3690 animaux.

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

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

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

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

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

18462 Cette étude de nutrition porte sur l'étude de la déficience en certains acides aminés indispensables, qui est responsable de nombreuses pathologies, notamment chez l'enfant en croissance (retard de croissance, défauts de développement cognitif, etc.).

Le projet vise à valider les variations des profils du métabolome (ensemble des métabolites) urinaire comme biomarqueurs spécifiques de la déficience en lysine, thréonine et méthionine, et à évaluer l'efficacité de la supplémentation en lysine, thréonine et méthionine.

Cette expérimentation est une étude pré-clinique, les résultats obtenus seront la base d'une étude clinique chez l'enfant dénutri. La validation de tels biomarqueurs du statut en acides aminés indispensables permettra, à terme, de mieux définir les besoins en acides aminés, ce qui permettra d'affiner les politiques nutritionnelles et de mieux évaluer la qualité des sources protéiques. De plus, cette étude nous renseignera sur les effets d'une supplémentation en ces aminés après une phase de déficience. Ces effets n'étant que peu rapportés dans la littérature, ces informations seront très utiles, notamment pour l'étude de la sous-nutrition chez l'enfant avec retard de croissance.

Dans ce projet nous utiliserons le modèle du rat Wistar Han en croissance. Durant l'expérimentation, les rats seront alimentés par six régimes différents, leur adiposité et les échanges respiratoires seront analysés par résonance magnétique nucléaire (RMN) et calorimétrie indirecte (sans anesthésie), une radiographie du tibia sera effectuée sous anesthésie, et deux prises de sang seront réalisées. Les rats seront euthanasiés en fin de procédure pour réaliser des analyses sur différents tissus cibles.

Cette étude nous permettra : 1) d'identifier avec précision des biomarqueurs de la déficience qui seront recherchés chez l'enfant dénutri, ce qui nous permettra d'affiner au mieux les analyses ; 2) de connaître l'évolution des critères phénotypiques (croissance, composition corporelle, etc.) lors de phases de déficience puis de supplémentation, ce qui permettra un suivi d'autant plus précis lors de l'étude clinique chez l'enfant dénutri.

La nécessité de mesurer les conséquences de l'ingestion d'un régime à faible teneur en lysine, thréonine ou méthionine sur le comportement alimentaire et les paramètres de la croissance (gain de poids et composition corporelle) empêche le remplacement de l'expérimentation animale par des modèles cellulaires ou moléculaires. Les résultats de ce projet permettront de mettre en place une étude clinique chez l'enfant dénutri. Ainsi, les objectifs de ce projet ne peuvent être atteints sans avoir recours à l'animal, le rat étant un modèle pour l'humain, en particulier pour la nutrition.

A partir des données issues d'une étude précédente, nous avons déterminé qu'un effectif de 10 rats par régime est le nombre minimal d'animaux nécessaires pour garder une puissance statistique satisfaisante. Notre protocole contenant 6 régimes différents, l'expérimentation comprendra 60 rats.

Durant les 49 jours d'expérimentation (7 jours d'habituation, 21 jours de déficience et 21 jours de supplémentation), les animaux vivront en cages individuelles transparentes sur grillage – hormis les 4 premiers jours d'habituation- pour le suivi précis de leur consommation alimentaire. Pour pallier à cet isolement, le milieu sera enrichi au moyen d'objets divers (tunnel, tasse renversée, support, gamelles, bille). De plus, les rats seront placés en petits groupes (de 5 individus) dans des cages collectives lors de leur manipulation quotidienne. La prise alimentaire et le poids corporel des animaux seront mesurés quotidiennement. Ce suivi précis des animaux permettra éventuellement de faire évoluer le protocole : en cas d'une perte de poids trop importante par rapport aux contrôles, le régime déficitaire sera stoppé pour restaurer la carence, ce qui n'empêchera pas la récupération de données sur un temps plus court. En revanche, une infection ou une diarrhée sans cause apparente sur plus de 1 jour ou une perte de poids dans le lot contrôle seront des critères d'arrêt de l'expérimentation. Dans ce dernier cas, une fois leur état de santé rétabli, ces animaux seront disponibles pour une adoption.

18463 Le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) a été décrit pour la première fois il y a une cinquantaine d'années et touche environ 3 millions de personnes chaque année. Ses manifestations symptomatiques sont un essoufflement, une augmentation de la fréquence respiratoire, une cyanose (coloration bleutée de la peau). Pour être considéré comme un syndrome aigu, les symptômes doivent être la conséquence d'évènements arrivés quelques heures (2h) ou jours (maximum 7 jours) avant leur apparition.

Les causes d'un SDRA sont multiples et peuvent être d'origine pulmonaires (pneumopathie, embolie, infiltration, ...) ou extra-pulmonaires (choc, sepsis, toxique, ...).

Le SDRA est caractérisé par des lésions pulmonaires inflammatoires aiguës et diffuses qui vont être responsables de l'apparition d'oedèmes pulmonaires (accumulation de fluides dans les poumons) et d'une augmentation de la perméabilité alvéolo-capillaires. Ces 2 phénomènes vont conduire à une diminution des échanges entre l'air présent dans les poumons et le sang causant de ce fait une mauvaise oxygénation sanguine (hypoxémie). En évaluant l'importance de cette hypoxémie, le SDRA peut être classé en 3 stades de gravité : mineur, modéré ou sévère. Selon le stade de gravité du SRDA, le taux de mortalité est de 34,9%, 40,3% voire 46,1% pour les formes les plus sévères.

Par ailleurs, même après rétablissement, les patients présentent de nombreuses séquelles (musculaires, neurologiques, cognitives ou psychologiques) contribuant à une altération significative de leur qualité de vie sur les 5 années succédant l'évènement.

Quelle que soit l'origine du SRDA, le traitement de la cause reste le premier traitement (traitement de l'infection par exemple). Pour de ce qui est des symptômes, à l'heure actuelle, les options de prise en charge restent limitées et le SDRA est en général traité par ventilation mécanique. A l'heure actuelle, aucun médicament n'a encore fermement fait ses preuves comme par exemple l'utilisation de corticostéroïdes qui présentent une activité anti-inflammatoire. D'un point de vue physiopathologique, de nombreux mécanismes entrent en jeu comme par exemple une atteinte de la membrane alvéolo-capillaire (espace dans lequel ont lieu les échanges entre l'air et le sang), une migration et une activation des cellules inflammatoires et une sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires cytotoxiques par les macrophages.

De nombreux modèles animaux sont référencés dans la littérature. L'un des modèles le plus couramment utilisé est le modèle de SDRA induit par l'administration intra-trachéale de lipopolysaccharide (LPS) chez le rat qui va reproduire les événements survenant dans la phase précoce du syndrome. Le LPS est une endotoxine présente dans la membrane des bactéries (gram négatif). Présent dans l'organisme, il va se lier à des récepteurs présents sur de nombreuses cellules et être à l'origine d'une très importante réponse

inflammatoire. L'exposition des poumons au LPS va entraîner l'activation de macrophages et le recrutement de cellules inflammatoires, en particulier les neutrophiles. L'activation des cellules du système immunitaire va conduire à une

libération massive de cytokines pro-inflammatoires dans les poumons mais également dans la circulation générale. D'un point de vue clinique, l'administration intra-trachéale de LPS va également provoquer l'apparition d'un oedème pulmonaire quantifiable en histologie et/ou en réalisant des pesées des poumons.

Ainsi, l'objectif de ce projet est de tester de nouveaux composés médicaments en utilisant ce modèle d'induction d'un SDRA par le LPS.

Le projet présenté s'inscrit dans la règle des 3R.

- Remplacement : La réponse inflammatoire est une réponse complexe mettant en jeu de nombreux médiateurs cellulaires et de nombreuses voies de signalisation qu'il est difficile de modéliser dans des modèles in vitro et ex vivo.

L'objectif étant d'obtenir une preuve de concept d'efficacité de ces nouveaux composés in vivo, l'utilisation de rongeurs est nécessaire afin d'évaluer l'effet sur une réponse inflammatoire globale.

- Réduction : Les données préalables obtenues sur ce modèle ont permis d'établir les effectifs d'une série expérimentale à 60 animaux répartis en 5 groupes de 12 animaux. A raison de 15 séries expérimentales réparties sur 5 ans, le nombre total d'animaux pour ce projet est de 900.

- Raffinement : Tout au long du projet les animaux seront hébergés par 2 ou 3 (selon la réglementation en vigueur) en présence d'enrichissement. L'induction de la pathologie se fera sous anesthésie gazeuse par un personnel entraîné aux intubations (indispensable pour l'administration intra-trachéale) ce qui permettra un réveil rapide et qu'aucune douleur ne soit occasionnée. Les prélèvements de sang (dosages de cytokines) seront réalisés également sous anesthésie gazeuse de façon non invasive) et le reste des prélèvements seront effectués après la mise à mort des animaux. L'étude d'efficacité d'un composé constitue une série expérimentale.

18464 Malgré la disponibilité des vaccins antigrippaux, la grippe demeure un problème de santé publique majeur responsable de 500 000 victimes par an dans le monde. Du point de vue de la santé mondiale, le manque d'efficacité, de disponibilité et d'accès aux vaccins antigrippaux, ainsi que leur coût, limitent considérablement le contrôle de la grippe saisonnière en cas de pandémie. Actuellement, l'efficacité vaccinale reste faible et protège seulement 40% des personnes vaccinées ce qui est insuffisant pour le contrôle global de la grippe. Récemment, les nouvelles conceptions de

vaccins antigrippaux ont été développées dans le but d'augmenter l'efficacité vaccinale, réduire le coût des vaccins et de faciliter l'accès à la vaccination. Une de ces approches combine une faible dose d'un vaccin déjà commercialisé contre la grippe saisonnière avec un nouvel adjuvant puissant (produit qui stimule le système immunitaire).

La présente étude vise à évaluer, en amont d'essais de phase I et IIa, la toxicologie réglementaire préclinique de 5 formulations vaccinales correspondant au vaccin commercial Vaxi-Flu4 (un vaccin antigrippal tétravalent inactivé, qui se compose d'une souche A/H1N1, d'une souche A/H3N2 et de souches grippales B Victoria et Yamagata) combiné avec 5 nouveaux adjuvants LVA (1 à 5), dans le modèle animal lapin de souche Néozélandaise. Ces essais pré-cliniques requièrent, au niveau réglementaire, le test des adjuvants ou des formulations vaccinales chez au moins 2 espèces (rongeur et non-rongeur) de mammifères. Cette approche est indispensable car la réponse toxique au niveau de l'organisme entier représente les réponses de cellules différentes d'organisme entier aux agents toxiques et ne peut être remplacée par les tests expérimentaux réalisés sur les cellules ou les organes en dehors de leur contexte naturel. Le modèle lapin représente un des deux modèles choisis pour les essais toxicologiques réglementaires. Cette espèce est largement utilisée et reconnue dans le monde scientifique pour le contrôle de la qualité des vaccins ainsi que pour l'évaluation réglementaire préclinique de la toxicité des nouveaux produits. En tant qu'espèce de référence pour les tests de pyrogénicité (induction de fièvre), le lapin présente un intérêt particulier pour l'étude de nouveaux adjuvants. Nous allons donc étudier la toxicité potentiellement induite par l'injection des formulations de vaccin Vaxi-Flu4 + adjuvant LVA (1-5), du Vaxi-Flu4 sans adjuvant, et d'adjuvant LVA (1-5) sans Vaxi-Flu4, dans le modèle lapin: i) dans un court laps de temps par l'administration d'une dose unique ; ii) sur 1,5 mois suite à deux injections à 1 mois d'intervalle ; iii) sur 3 mois suite à 3 injections à un mois d'intervalle. Pour accomplir nos études précliniques, nous planifions d'utiliser 96 lapins par an, au total 480 lapins sur les 5 ans. Tout au long de ces études, nous allons respecter la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). Ainsi le nombre minimum d'animaux nécessaires a été déterminé en se basant sur les données acquises lors d'expériences préliminaires, d'études précédentes publiées dans la littérature, mais aussi grâce à un test statistique de puissance afin d'incorporer un nombre minimum d'animaux tout en gardant la possibilité d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. Le nombre d'injection et la durée de l'étude post injection ont été choisis en concordance avec les normes réglementaires pour les tests toxicologiques des futurs médicaments. Les animaux seront hébergés séparément, sans contrainte et selon les conditions en vigueur dans l'élevage. Néanmoins, les contacts sociaux obtenus par l'hébergement des différents animaux dans des cages adjacentes participeront à l'enrichissement du milieu pour assurer le bien-être psychologique et physique des animaux. Celui-ci sera complété par l'apport d'objets (balles, chaînettes, mezzanines, jouets en polypropylène) dans l'environnement. Ce dernier est strictement contrôlé et maintenu stable (bruits, odeurs, lumière, température et hygrométrie conformes à la directive de 2010). Toutes les précautions seront prises pour minimiser les éventuelles souffrances engendrées par l'expérimentation. Les animaux seront surveillés quotidiennement pour détecter le plus rapidement possible d'éventuels signes d'altération de leur santé, de leur bien-être, ou de douleur, et une grille de score sera utilisée pour aider à évaluer l'impact des injections sur le bien-être animal et définir des points limites. Nous ferons appel à un vétérinaire référent dès l'apparition de ces signes pour une prise en charge immédiate nécessitant soit des traitements antalgique ou antipyrétique soit un arrêt de l'expérimentation.

18465 Notre projet concerne les nouvelles technologies et techniques chirurgicales d'assistance (tissulaire et/ou mécanique) et de réparation de l'insuffisance cardiaque post-infarctus.

Suite à une crise cardiaque, de nombreux patients commencent à souffrir d'insuffisance cardiaque car un tissu cicatriciel se forme et nuit à la fonction cardiaque. Les chercheurs doivent améliorer leurs connaissances afin de prévenir la formation du tissu cicatriciel et de permettre une réparation efficace du cœur, ou afin d'assurer le positionnement le plus judicieux d'une technologie d'assistance.

C'est dans cet axe de recherche plutôt fondamental que s'inscrit cette étude, qui nous permettrait d'améliorer notre compréhension des mécanismes de réparation du cœur notamment des

modifications de la matrice extracellulaire cardiaque qui constitue un élément capital dans la préservation de l'intégrité structurale et fonctionnelle du cœur.

Dans la majorité des tissus animaux, le constituant majeur n'est pas la cellule mais la matrice extracellulaire (MEC), une structure 3D constituée de différentes protéines sécrétées par les cellules. Or, la MEC ne sert pas simplement d'échafaudage mécanique, mais peut aussi transduire des signaux qui sont importants pour la survie et la fonction cellulaires. La plupart des affections pathologiques cardiaques sont associées à l'expansion de la MEC cardiaque et à des altérations marquées de sa composition; ces changements perturbent la fonction cardiaque. Nous souhaitons analyser en détail cette MEC, identifier l'impact de l'insuffisance cardiaque sur sa composition protéiques (qualitative et quantitative) et sa structure 3D afin de pouvoir envisager une réparation fidèle à du tissu cardiaque sain ou le positionnement le plus judicieux d'une technologie d'assistance car en dépit de la reconnaissance accrue de son rôle dans la médiation des réponses biologiques cellulaires, la contribution de la MEC en pathophysiologie cardiaque reste mal connue et probablement sous-estimée. Nous souhaitons obtenir ces données durant la phase inflammatoire (7 jours post-infarctus) et la phase de remodelage post-infarctus (30 jours). Les infarctus seront créés par ligature d'une artère du coeur : l'artère coronaire. Cette étude nécessitera 16 rats mâles wistar au maximum.

L'opération sera réalisée sous anesthésie générale. A la fin de la procédure, l'animal sera réveillé et gardé en vie plusieurs jours afin de permettre au tissu inflammatoire ou cicatriciel de se former. Un contrôle de la fonction cardiaque sera réalisé sous anesthésie par imagerie afin de visualiser l'étendue et la localisation des lésions. Puis une surdose d'euthanasique entraînera la mort de l'animal, sans souffrance, avant de réaliser le prélèvement du cœur en vue des diverses analyses sur le tissu cardiaque.

Cette étude nécessite l'utilisation d'animaux car l'objectif est d'étudier la structure 3D et la composition protéique du tissu cardiaque infarci, il est donc impératif de travailler sur un modèle entier vivant. Aucun modèle in vitro ne permet d'appréhender ces paramètres.

Nous avons établi des points limites (modification des paramètres cardiaques et respiratoires indiquant un réveil, une douleur ou un inconfort de l'animal durant l'opération chirurgicale mais aussi comportement inadéquat, modifications physiques. . . pendant toute l'étude) qui ne seront pas dépassés grâce aux procédures médicamenteuses disponibles au laboratoire (analgésie, anesthésie chirurgicale) ou à une prise en charge suffisamment précoce avec des soins adaptés.

Ce modèle est déjà en place dans notre structure ce qui permet de réduire le nombre d'animaux. Ainsi, maximum 16 rats sont nécessaires permettant une étude statistiquement exploitable. Les conditions d'hébergement (enrichissement du milieu), de soins (établissement de points limites) et surtout les méthodes utilisées (opérations sous anesthésie générale, analgésie contrôlée) qui sont des méthodes dérivées directement de la pratique clinique chez l'homme permettent ainsi un raffinement de la méthodologie.

18466 La prise en charge de patients souffrant de brûlures ou de plaies profondes et étendues est encore aujourd'hui un vrai défi pour les chirurgiens reconstructeurs. La reconstruction cutanée est un phénomène complexe faisant intervenir de nombreux types cellulaires et différents processus physiologiques. Les traitements actuels peuvent être variés mais utilisent habituellement des greffes de peau "pleine épaisseur" pour reconstruire le derme et l'hypoderme. Dans le cas de plaies pleines épaisseur très étendues comme dans le cas des grands brûlés, la peau ne peut pas être reconstruite par les techniques classiques de chirurgie plastique, mais elle peut être reconstruite par greffe de peau ou encore par l'utilisation de dermes artificiels. Mais cette technique a des limites : la surface de greffe que l'on peut prélever dépend de la surface des tissus sains restant et elle ne reconstitue que la partie la plus superficielle de la peau (épiderme et partie superficielle du derme) favorisant la rétraction et l'instabilité cutanée. Il a également été démontré que le traitement efficace et réussi des plaies et brûlures est fortement dépendant de la qualité de la vascularisation et de la néovascularisation pour assurer la prise de greffe.

Cette étude a pour objectif de tester une méthode de reconstruction tissulaire de la peau et notamment de l'hypoderme par greffe de graisse autologue dans une matrice tissulaire résorbable. L'objectif est d'obtenir une reconstruction complète, avec amélioration de la qualité cicatricielle : augmentation de la souplesse et de l'élasticité, diminution de la rétractation. Pour cela, nous souhaitons tester l'efficacité de la greffe de tissus adipeux autologues liés à une matrice tissulaire résorbable constituée d'un scaffold en polymère biorésorbable biocompatible qui permettra une meilleure conduction des nutriments aux cellules et améliorera la néovascularisation.

Pour cela, une étude sera menée sur 5 ans dans un premier temps chez les rongeurs (120 rats) puis chez le porc (24 porcs) qui sont les deux modèles les plus adaptés à cette étude car les caractéristiques physiologiques de la peau sont fortement similaires à la peau humaine. De plus, le choix du modèle porc est effectué car sa taille nous permettra de tester différentes conditions expérimentales sur un seul animal, ce qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés.

Dans un premier temps, différentes modalités seront testées sur un même animal (rat) afin de réduire le nombre d'animaux utilisés. L'implantation des différentes modalités de test sera effectuée dans des conditions d'asepties chirurgicale et sous anesthésie générale. La greffe de graisse autologue (prélevée sur l'animal puis centrifugée) couplée à une matrice cellulaire résorbable sera comparée à :

- une matrice cellulaire résorbable seule
- la graisse seule,
- une matrice dermique (déjà commercialisée) associée à de la graisse autologue.

Dans un second temps et après avoir validé notre matrice cellulaire résorbable lors de la première phase d'étude in-vivo, de nouveaux animaux seront utilisés. Des plaies seront réalisées sur toute l'épaisseur de la peau soit par exérèse soit par un protocole de brûlure standardisée dans des conditions d'asepties chirurgicale et sous anesthésie générale. Les parties lésées seront immédiatement reconstruites. Chaque animal sera son propre témoin. Différentes modalités seront testées sur le même animal afin de réduire le nombre d'animaux utilisés. Comme précédemment décrit, la greffe de graisse autologue (prélevée sur l'animal puis centrifugée) couplée à une matrice cellulaire résorbable sera comparée à une matrice cellulaire résorbable seule, la graisse seule, une matrice dermique (déjà commercialisée) + graisse autologue.

Les animaux recevront un traitement anti-douleur adapté afin de diminuer au maximum la douleur induite par le protocole jusqu'à cicatrisation. Ils seront suivis quotidiennement afin de détecter l'apparition de point limite et traiter tout signe de douleur. Les animaux seront conservés pendant 2 mois. Le délai de cicatrisation complet sera noté. Différentes mesures seront effectuées sur les zones d'intérêt : une mesure d'élasticité de la peau, une mesure de la taille de la zone pour connaître le taux de rétraction et une mesure du taux de prise de greffe. Différentes biopsies seront également réalisées post-mortem afin d'analyser la qualité des tissus générés.

Le protocole a été conçu et sera réalisé dans le respect de la règle des 3R : Réduire, Remplacer et Raffiner.

Réduire : Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, des études préliminaires seront réalisées in-vitro. Plusieurs modalités seront testées sur chaque animal afin qu'il soit son propre témoin. Le nombre d'animaux utilisé a été réfléchi de manière à garantir une puissance statistique suffisante pour discerner un effet significatif de l'amélioration de la reconstruction grâce à notre matrice tissulaire.

Remplacer : Le recours aux animaux est essentiel pour nous permettre de tester notre matrice en condition réelle et permettre de mettre en relation tous les phénomènes physiologiques complexes prenant part dans la cicatrisation qui ne peuvent être évalués in-vitro.

Raffiner : La douleur sera traitée de manière efficace par la mise en place d'une anesthésie et analgésie adaptée au cours de la chirurgie mais également tout au long du processus de cicatrisation afin de diminuer au maximum la souffrance des animaux. Ils seront suivis quotidiennement afin de détecter tout signe de souffrance lié au protocole. En cas d'atteinte d'un point limite sévère, l'animal sera sorti de l'étude.

18467 La maladie d'Alexander est une maladie neurodégénérative due à des mutations du gène GFAP codant le principal filament intermédiaire des astrocytes matures. Elle touche principalement les nourrissons et les enfants. Le tableau clinique varie selon l'âge du déclenchement de la maladie : macrocéphalies, crises d'épilepsie, déficits moteurs et cognitifs. L'espérance de vie est variable. Cette maladie se traduit par un changement morphologique sévère des astrocytes et un déficit de la neurogénèse postnatale dans l'hippocampe.

Les astrocytes ont un rôle fondamental dans le système nerveux central (SNC) pour le maintien des équilibres des différents ions, transmetteurs, eau et de ce fait joue un rôle clef dans la transmission synaptique.

Objectif de notre projet :

Les souris disponibles au laboratoire portent une mutation de GFAP dans une partie de la protéine (p. T409I), celle-ci est homologue à la mutation en p. T412I trouvée chez un patient (forme hétérozygote). Nous souhaitons caractériser de manière morphologique et fonctionnelle (in vitro et in vivo) ce modèle murin au cours du développement et comparer avec les résultats observés chez l'Homme. Ces données vont nous permettre de valider ce modèle d'un point de vue morpho-fonctionnel, comprendre les phénomènes physiologiques qui en découlent afin d'étudier les conséquences de cette mutation sur le développement cérébral au cours du temps. Nous pourrions ainsi déterminer le stade de déclenchement de la maladie afin de définir une fenêtre d'action thérapeutique.

Notre étude s'effectuera sur un total de 1000 souris. Le modèle murin permet de tirer des conclusions générales sur l'organisation corticale des mammifères, y compris chez l'homme.

La conception de ce projet a été articulée pour appliquer au mieux les principes de la règle des 3R.

1) Remplacement :

A notre connaissance, il n'existe actuellement aucune alternative à l'utilisation de modèles animaux pour comprendre les mécanismes physiopathologiques. Notre étude préliminaire sur cultures cellulaires nous a permis déjà de débiter ce projet afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés.

2) Réduire :

Les expériences seront réalisées avec un souci permanent de réduction du nombre d'animaux. Une portée sera utilisée pour différentes expériences à différents stades, les animaux restant seront conservés pour l'élevage.

3) Raffinement:

Les animaux sont hébergés en animalerie A1 (température, luminosité, cycle jour-nuit et hygrométrie contrôlée) avec accès ad libitum à la nourriture et à l'eau. L'hébergement respecte les groupes sociaux. Les animaux font l'objet d'un suivi quotidien par les expérimentateurs et les zootechniciens, et leurs conditions d'hébergement sont enrichies (matériaux pour nidification, tunnels, dômes). Le bien-être des animaux, qu'il s'agisse des souris gestantes comme de leur progéniture, sera évalué régulièrement (croissance staturo-pondérale, aspect général, comportement). Une attention particulière sera portée aux nouveau-nés au cours des chirurgies pour réduire douleur et stress (anesthésie générale et locale, tapis chauffant, suivi strict post-chirurgie des nouveau-nés). La récupération post-opératoire, la souffrance et la douleur sont évaluées et traitées post-chirurgie des nouveau-nés. La récupération post-opératoire, la souffrance et la douleur sont évaluées et traitées (anesthésie et analgésie appropriée).

18468 L'insuffisance cardiaque (IC) est une maladie sévère touchant en Europe environ 6. 5 millions de patients. Les traitements actuels de l'IC sont insuffisants, contribuant à placer l'IC comme première cause de mortalité parmi les maladies cardiovasculaires, avec en France 32 000 morts prématurés chaque année. Ces données incitent à développer des nouvelles approches thérapeutiques pour l'IC.

L'amylose cardiaque est une des causes d'IC dont l'incidence ne fait qu'augmenter, conséquence d'une amélioration des performances diagnostiques. Malheureusement, excepté le traitement

symptomatique de l'amylose (essentiellement des diurétiques pour la décongestion), tous les traitements spécifiques de l'IC (béta bloquant, bloqueurs du système rénine-angiotensine-aldostérone) sont contre indiqués car délétères pour ces patients. Une seule molécule existe, spécifique dans l'amylose à transthyrétine (le TAFAMIDIS) qui a montré son intérêt pour stopper le processus de dépôt intra myocardique de protéines fibrilles amyloïdes. Néanmoins, cette molécule n'entraîne pas de remodelage inverse ventriculaire gauche. Ainsi, les patients décèdent plus ou moins rapidement d'IC réfractaire. La nécessité d'identifier de nouvelles pistes thérapeutiques est donc fondamentale.

L'amylose cardiaque est caractérisée par une hypertrophie myocardique liée au dépôt de protéines fibrilles amyloïdes mais aussi liée à un important oedème myocardique et à une inflammation liée à ce dépôt. Des études en IRM cardiaque ont démontrées que l'oedème myocardique était lié au pronostic des patients plus que l'importance des dépôts. On sait aussi, grâce aux études hémodynamiques invasives chez l'homme que l'oedème myocardique, sans en présager la cause, entraîne une altération majeure de la fonction myocardique.

En parallèle du système vasculaire sanguin coronaire, le cœur est irrigué par un autre système vasculaire moins connu : les lymphatiques. Le dysfonctionnement du réseau lymphatique provoque justement cet œdème en parallèle d'une inflammation myocardique. Nos travaux récents pointent vers un nouveau type de traitement de l'IC ciblant les lymphatiques, appelé la lymphangiogénèse thérapeutique, envisagé auparavant uniquement comme un recours potentiel chez des patients atteints d'œdème périphérique.

Aucune étude ne s'est encore intéressée à i) démontrer de façon hémodynamique qu'il y avait un lien entre l'atteinte cardiaque de l'amylose et l'importance de l'oedème myocardique, ii) à étudier le système lymphatique cardiaque dans l'amylose et iii) à cibler l'oedème myocardique dans l'amylose et notamment le système lymphatique afin de trouver une nouvelle piste thérapeutique.

Dans ce projet, nous allons évaluer dans des modèles expérimentaux d'amylose cardiaque le lien qu'il existe en la dysfonction myocardique, l'oedème myocardique et l'atteinte du système lymphatique cardiaque.

Le but ultime de cette recherche est d'étudier l'hypothèse selon laquelle les lymphatiques cardiaques pourrait constituer une nouvelle cible thérapeutique dans le traitement de l'insuffisance cardiaque lié à l'amylose puisque permettant une régression de l'oedème myocardique.

Cette recherche nécessite une expérimentation sur 60 souris.

Cependant pour respecter l'éthique de l'expérimentation animale, nous respecterons la règle des 3R (raffiner, réduire, remplacer), grâce aux stratégies suivantes :

- Pour raffiner : les animaux sont hébergés selon les normes requises et un enrichissement des cages est mis en place. Des points limites adaptés, une stratégie d'anesthésie et d'analgésie seront mise en place avec un suivi quotidien du bien-être animal.
- Pour réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaires à cette étude nous réaliserons séquentiellement des mesures non-invasives de la fonction cardiaque (échographie, IRM) puis des mesures invasives (hémodynamique). Nous avons également mis en place une stratégie d'optimisation des prélèvements et des analyses ex vivo au moment du sacrifice. De plus, nous avons réalisé des tests statistiques appropriés pour calculer le nombre de souris nécessaire afin de détecter une différence de 15% (ex : test de Mann Whitney). Nos expériences dans le laboratoire ont démontré que des groupes de n=15 sont nécessaires pour des évaluations fonctionnelles telles que l'échocardiographie.
- Dans l'objectif de remplacer l'expérimentation animale, nous mettrons en place certaines expériences par des études in vitro. Cependant l'utilisation des animaux est rendue nécessaire car il n'existe pas à ce jour de modèle d'amylose in vitro.

- 18469** - Mots-clés: Infections pulmonaires; bovins; porcins; ovins; volailles, *Pasteurella multocida*; *Mannheimia haemolytica*; *Actinobacillus pleuropneumoniae*; *Escherichia coli*; Arterivirus.
- Raison du projet : Les maladies respiratoires sont un des problèmes de

18470 Dans ce projet nous voulons valider l'importance du rôle d'une protéine dans le cancer du colon dans la formation de tumeurs et analyser la capacité d'un anticorps dirigés contre cette protéine à réduire la formation de ces tumeurs. Pour cela, nous souhaitons utiliser des modèles de souris qui développent des tumeurs après injection de cellules tumorales humaines dans le flanc de la souris en sous cutanée. La croissance de la tumeur sera analysée par la mesure du volume de la tumeur au cours du temps.

Il n'y a pas de méthode alternative, en effet la formation de tumeurs est un phénomène complexe impossible à réaliser in vitro sur des cultures cellulaires.

Par cette étude, nous validerons l'utilisation d'un anticorps comme stratégie thérapeutique alternative dans le cancer du côlon.

Pour cette étude complexe nous avons prévu un nombre total maximal de 480 souris.

Dans le cadre de la règle des 3R, le nombre d'animaux a été réduit au minimum après calcul de l'échantillonnage nécessaire afin d'obtenir une puissance statistique satisfaisante.

Par ailleurs les souris disposent de copeaux de bois dans leurs cages afin d'améliorer leurs conditions d'hébergement. Une surveillance quotidienne sera faite sur les souris en expérimentation afin de veiller au bien être des animaux.

Enfin ce modèle préclinique de tumeurs humaines chez la souris immunodéprimée est essentiels pour évaluer l'impact d'une protéine sur le développement tumoral.

18471 Dans le monde, le nombre de personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer est estimé actuellement à 35,6 millions (dont 1. 3 millions en France). D'autres maladies affectant le système nerveux ont un pronostic encore plus dramatique. L'allongement de la durée de vie est un facteur majeur d'augmentation du nombre de personnes atteintes de maladies neurologiques. Le retentissement social pour les patients et leurs familles est considérable en raison des handicaps moteurs, intellectuels et psychiques qui en résultent. Surtout, aujourd'hui, il n'existe aucun traitement médicamenteux permettant d'éradiquer ces maladies.

Avec l'évolution des biotechnologies, de nombreux espoirs sont permis pour améliorer le traitement de certaines maladies neurologiques. Par exemple, il est possible aujourd'hui de cibler l'ARN d'une protéine au fonctionnement anormal pour l'éliminer ou la rendre à nouveau fonctionnelle. Cela nécessite la mise en œuvre d'agents biologiques qui doivent atteindre les cellules du système nerveux alors qu'ils sont connus pour ne pas passer la barrière hématoencéphalique. S'ils sont retenus comme candidats médicaments pour un développement chez l'homme, ils devront être administrés par voie intrathécale, c'est-à-dire injectés au niveau des lombaires, entre les méninges, pour diffuser dans le liquide céphalo-rachidien.

La recherche de nouveaux médicaments pour traiter les maladies neurologiques repose sur une première étape d'identification de candidats médicaments efficaces et non toxiques sur leur cible au moyen de tests in vitro. Mais l'efficacité thérapeutique et la toxicité d'un candidat médicament ne peuvent être évaluées qu'après administration chez l'animal en particulier dans le domaine des maladies neurologiques, dont la physiopathologie est particulièrement complexe. Il est donc nécessaire que les candidats médicaments les plus aboutis et les plus avancés dans leur développement préclinique soient administrés in vivo avant tout essai clinique.

L'objectif de ce projet consiste à évaluer la tolérabilité (en déterminant la dose maximale tolérée) d'agents biologiques candidats médicaments dans le traitement de maladies neurologiques, et destinés à être administrés par voie intrathécale chez l'homme car passant difficilement la barrière hémato-encéphalique.

La souris et le rat présentent une forte homologie génétique, physiologique et comportementale avec l'homme et ainsi une forte valeur translationnelle. Les deux espèces sont utilisées pour évaluer la sécurité de candidats médicaments dans le traitement des maladies neurologiques.

Chez la souris, pour contourner le problème du mauvais passage de la barrière hémato-encéphalique, la tolérabilité des candidats médicaments sera évaluée après administration intracérébroventriculaire, la taille de l'animal étant un facteur limitant pour pratiquer une

administration intrathécale. Si par ailleurs l'efficacité chez la souris a déjà été évaluée (en déterminant une dose minimale efficace), l'évaluation de la marge de sécurité (c'est-à-dire l'écart entre la dose minimale efficace et la dose maximale tolérée) permettra de sélectionner les meilleurs candidats.

En revanche, la technique d'injection intrathécale chez le rat est possible mais les tests d'efficacité d'agents biologiques sur cette espèce sont moins nombreux de par la difficulté à générer des modèles transgéniques rats exprimant une cible d'intérêt. Il ne sera donc pas possible a priori de déterminer une marge de sécurité sur le rat. L'évaluation de la tolérabilité chez le rat par voie intrathécale aidera néanmoins aux choix des doses à évaluer de façon réglementaire avant le début d'essais cliniques.

Finalement, chez la souris comme chez le rat, l'évaluation de la tolérabilité en soit est aussi un critère de sélection des agents biologiques comme candidats médicaments car plus la tolérabilité d'un agent biologique donné est bonne, plus il sera possible de l'administrer à doses fortes chez l'homme et ainsi d'espacer au maximum le délai entre deux injections.

Ce projet est en conformité avec le principe des 3R (remplacer, réduire, raffiner).

Remplacement :

La recherche de nouveaux médicaments pour traiter les maladies neurologiques repose sur une première étape d'identification de candidats médicaments efficaces et non toxiques sur leur cible au moyen de tests in vitro. Mais l'efficacité thérapeutique et la sécurité d'un candidat médicament ne peuvent être évaluées qu'après administration chez l'animal. Il est donc nécessaire que les candidats médicaments les plus aboutis et les plus avancés dans leur développement préclinique soient administrés in vivo avant tout essai clinique, avec un mode d'administration chez l'animal proche de celui qui sera envisagé chez l'homme.

Réduction :

La dose maximale tolérée d'un produit sera déterminée avec un nombre d'animaux réduit au minimum (estimé à 3 par dose de produit). Une première dose sera évaluée et, en fonction du score obtenu sur une grille d'observation, une seconde dose, plus faible ou plus forte, sera éventuellement testée. Par ailleurs, également dans le but de réduire le nombre d'animaux utilisés, des prélèvements en fin d'étude pourront être effectués pour analyses biochimique ou histologiques in vitro, permettant ainsi de réduire le nombre d'animaux dédiés spécifiquement à ces analyses.

Raffinement :

La mise en place d'une canule pour injection de produit intracérébroventriculaire chez la souris, ou d'un cathéter pour injection intrathécale chez le rat, sera réalisée sous anesthésie et analgésie péri et post opératoire.

Tous les animaux de ce projet font l'objet d'un suivi quotidien réalisé par les expérimentateurs et le personnel assurant leur soin. Après injection du produit à évaluer, les animaux feront l'objet d'une observation selon des critères spécifiques définis dans une grille d'observation (incluant des points limites) afin de détecter tout signe de souffrance ou l'atteinte de points limites qui nécessiteraient le retrait de l'animal de l'étude.

Chaque espèce disposera d'un enrichissement adapté dans les cages d'hébergement, comprenant du matériel de nidification et/ou des morceaux de bois à ronger.

Dans ce projet il est prévu d'utiliser au maximum 4500 rongeurs – 3000 souris et 1500 rats - sur une durée de 5 ans. Le nombre de produits à tester chez le rat est estimé inférieur à celui chez la souris car l'objectif pour chaque espèce est différent.

18472 Le projet porte sur la compréhension des mécanismes responsables de la dégénérescence des valves cardiaques et plus précisément de la valve mitrale. Il s'agit ici d'améliorer les connaissances fondamentales sur cette pathologie mais aussi de proposer un nouveau traitement médicamenteux pour une maladie très fréquente où seul le traitement chirurgical est possible. Ainsi on pourrait ralentir le développement de la maladie mais aussi proposer un moyen de stabiliser sa progression chez des malades inopérables. Dans le cas présent, il s'agit de développer un traitement pour des

malades ayant une dégénérescence mitrale due à une anomalie génétique, le prolapsus mitral lié au chromosome X. On se propose de ralentir la dégénérescence congénitale en bloquant le système sérotoninergique et le système rénine/angiotensine/aldostérone, dans un second temps. Ce travail sera réalisé chez des rats porteurs de la mutation la plus fréquemment rencontrée chez l'Homme (FLNA-P637Q). Ils seront traités par les produits d'intérêt et l'évolution de la maladie sera suivie en échocardiographie. En fin de protocole nous pratiquerons des analyses sanguines et étudierons les valves en histologie. L'atteinte dégénérative mitrale présentée par ces animaux n'affecte pas leur statut fonctionnel cardiovasculaire au stade où ils seront étudiés. Remplacer : le recours aux animaux est ici indispensable car nous avons montré que le système biologique conduisant à la dégénérescence valvulaire implique plusieurs tissus (cœur et moelle osseuse) et plusieurs types cellulaires dont certains ne sont pas dans les valves. Nous menons aussi en parallèle des études moléculaires sur des cellules en culture permettant de remplacer des expériences animales. Réduire : nous limitons le nombre d'animaux utilisés en procédant à un suivi longitudinal des animaux par un examen non invasif (échographie). Cela évite de prélever des animaux aux différents points de mesure et d'augmenter la puissance statistique en permettant des comparaisons intra-individuelles. Le nombre d'animaux par groupe est basé sur la puissance statistique requise et calculé à partir de nos études précédentes chez la souris dans d'autres modèles. Seulement les mâles seront utilisés dans ce projet, compte tenu de la localisation de la mutation (chromosome X). Ceci nous conduit à un effectif de 130 animaux, dont 110 pour les expérimentations et 20 (15 femelles et 5 mâles) pour le maintien de la lignée. Raffiner : dans ce projet, les conditions d'hébergement sont standardisées au sein d'une animalerie centrale conventionnée et permettent de réduire le stress des animaux (enrichissement du milieu par bâtons type « aspen bricks » à ronger, hébergement en groupes, taille des cages sans dépasser 2-3 rats par cage). Les animaux sont surveillés quotidiennement par du personnel qualifié. Le stress lié à la prise de pression à la queue ou aux prélèvements sanguins sera limité par une acclimatation des animaux à l'espace de contention, l'échocardiographie sera réalisée sous anesthésie (isoflurane). L'administration des traitements se fera par mini-pompes osmotiques (voie sous-cutanée) pour réduire le stress lié aux injections quotidiennes). Dans un avenant à ce projet nous ajoutons un groupe des 10 animaux qui seront traités par voie orale avec un inhibiteur de la synthèse périphérique de la sérotonine. Ce groupe réduit le stress des animaux (pas de chirurgie) et permettra d'établir la preuve de concept d'un rôle de la sérotonine dans le remodelage des valves cardiaques de ces animaux. Toutes les interventions seront réalisées sous anesthésie et analgésie. A chaque étape du projet où cela est possible, la méthode la moins invasive pour l'animal sera privilégiée. Nous avons établi des points-limites permettant de soustraire l'animal à la souffrance.

18473 Pour le développement de nouveaux médicaments, il est nécessaire d'étudier le devenir de la substance active dans l'organisme, déterminer l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination du composé (ADME), des propriétés qui vont influencer la posologie du médicament (dose administrée et fréquence d'administration). L'objectif de ce projet est la mesure de la biodisponibilité de produits pharmacologiques en cours de développement, molécules actives ou candidats-médicaments chez le rat. La biodisponibilité est déterminée à partir de prélèvements de sang réalisés suite à l'administration du produit pharmacologique.

Adéquation avec la règle des 3R

Remplacer

Pour réaliser ce projet, la biodisponibilité et la pharmacocinétique de produits pharmacologiques sera évaluée chez le rat, car c'est l'espèce la plus utilisée pour cette approche dans le cadre du développement des candidats-médicaments. A ce jour, aucun modèle alternatif (moléculaire et/ou cellulaire) n'est suffisamment intégré et complexe pour permettre de reproduire l'ensemble des phénomènes biologiques qui sont impliqués dans les mécanismes de dégradation, de transport et d'élimination des composés susceptibles d'affecter l'activité des molécules. C'est pour cette raison, qu'une approche in vivo est nécessaire pour déterminer la biodisponibilité des nouveaux candidats-médicaments avant de poursuivre leur développement.

Raffiner

La procédure expérimentale est conçue pour garantir le bien-être de l'animal et réduire au maximum l'inconfort, le stress et la souffrance de l'animal. Le rat étant un animal social, les rats seront maintenues par groupes sociaux dans

des cages enrichies de tubes en carton et de bâtonnets à ronger. Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi régulier de l'état des animaux. Lorsque la procédure nécessitera d'anesthésier l'animal, le rat sera placée sur un tapis chauffant afin de prévenir une hypothermie durant l'anesthésie et jusqu'au réveil de l'animal. La douleur liée aux injections est une douleur ponctuelle réversible qui fera l'objet d'une surveillance de l'animal. Les animaux seront particulièrement surveillés après l'administration des candidats-médicaments pour visualiser tous signes de toxicité imprévue qui seraient suivi de l'arrêt de la procédure.

Réduire

Nous avons montré que la procédure expérimentale parfaitement maîtrisée permet une mesure efficace de la pharmacocinétique d'un candidat-médicament. Les résultats sont exploités sous la forme de courbes cinétiques. Aucune comparaison statistique n'est requise. La réalisation des procédures par un technicien rompu à ces manipulations garantit une bonne reproductibilité et permet ainsi de limiter le nombre d'animaux à engager dans les protocoles. Cette procédure répétée, permet de réduire drastiquement le nombre d'animaux utilisés pour la détermination de la biodisponibilité, et sera utilisée lorsque les produits pharmacologiques pourront être mesurés dans un micro-volume de plasma et qu'aucun prélèvement d'organe ne sera requis pour l'analyse.

Les mesures de pharmacocinétique seront réalisées à l'aide de 3 rats par candidat médicament, par dose et par voie d'administration. Il est prévu de mesurer la biodisponibilité de 10 candidats-médicaments par an chez le rat sur une période de 5 ans, soit un maximum de 420 rats

18474 Le maintien de l'intégrité musculaire a été décrit depuis longtemps comme étant dépendant de l'innervation et de l'exercice. Néanmoins, les mécanismes moléculaires impliqués dans le maintien de l'homéostasie musculaire sont encore mal compris.

Parmi les différents signaux trophiques, l'activité contractile du muscle, la neurotransmission et les facteurs neurotrophiques sont des éléments essentiels qui régissent l'intégrité de la masse musculaire. Une altération de l'activité électrique provoque une modification de l'expression de gènes impliqués dans l'homéostasie musculaire.

Le but de cette étude est donc de déterminer les mécanismes impliqués dans le contrôle de la masse musculaire après une altération de l'activité électrique.

Notre précédente étude nous a permis de montrer que la protéine CaV β 1E, jouait un rôle très important dans le maintien de la masse musculaire. Nous avons montré que cette nouvelle isoforme est une isoforme embryonnaire et nous aimerions comprendre comment elle est régulée dans un contexte d'atrophie consécutif à l'endommagement du nerf.

Pour ce projet, nous utiliserons des souris sauvages C57BL/6JRj

Remplacement: Afin de limiter au maximum le recours à l'utilisation de souris pour l'obtention de réponses à nos questions, les expériences seront, dans la mesure du possible réalisées in vitro avec des lignées cellulaires. Ce n'est qu'en dernier recours que nous utiliserons le système murin.

Réduction : Les processus expérimentaux seront conçus de façon à utiliser un nombre de souris limité permettant une analyse statistique. Néanmoins, 5 animaux par groupe seront malgré tout nécessaires et les protocoles seront rigoureusement élaborés et réfléchis en avance pour que l'expérience soit interprétable et que l'on n'ait pas à la refaire.

Raffinement : Les conditions d'hébergement et l'enrichissement du milieu sont gérés par l'animalerie. Elles consistent en un contrôle quotidien des cages, un changement régulier, un nombre réduit d'animaux par cage (5 maximum) et pas d'animaux isolés. Le changement des cages se fait sous hotte aspirante et les cages possèdent des filtres. L'enrichissement du milieu consiste en l'ajout de laine de bois afin que les souris puissent faire un nid ainsi que de lanières de papier Kraft et des tunnels en carton. Enfin, si nécessaire, la nourriture pourra être mise à disposition sur le plancher de la cage.

Pour limiter la souffrance et l'anxiété, les procédures qui le nécessitent se feront sous anesthésie. Pour les procédures pouvant générer de la douleur, les souris seront traitées avec des analgésiques.

Au cours des différentes procédures, la température des souris est maintenue constante à l'aide d'une plate-forme chauffante.

Pour réaliser ce projet nous utiliserons 450 souris C57BL/6JRj de 12 semaines.

18475 Malgré les progrès considérables dans le traitement du cancer des dernières années, le nombre de patients répondeurs aux derniers traitements reste modéré. De nouvelles cibles doivent être découvertes pour améliorer les traitements existants et en proposer de nouveaux. Notre projet s'inscrit dans cette recherche de nouvelles cibles pour valider des médicaments d'immunothérapie avec des bénéfices espérés rapides pour les patients.

La souris immunodéficiente NOD. SCID. gc^{-/-} (NSG ou NXG) représente un nouveau modèle animal pour développer des stratégies thérapeutiques innovantes. En effet, de par leur constitution génétique, les souris NSG acceptent plus facilement la greffe de cellules humaines que d'autres souches de souris immunodéficientes. Par exemple, la souris NSG accepte facilement des tumeurs humaines. De plus, l'injection de cellules souches de sang de cordon dans des souris nouveau-nées NSG aboutit à la génération d'un système immunitaire adaptatif (lymphocytes T et B) humain susceptible de rejeter des tumeurs. Une alternative à l'injection de cellules souches pour générer des souris humanisées est le transfert de cellules de sang périphérique de donneurs sains. Nous prévoyons d'utiliser ces deux modèles d'humanisation pour étudier le rôle de deux molécules exprimées par les tumeurs sur le contrôle de la réponse immunitaire anti tumorale. Nous éliminerons l'expression de ces deux molécules dans une lignée de cancer du sein et dans une lignée du cancer de la prostate pour déterminer leur rôle dans le contrôle de la croissance tumorale par le système immunitaire humain dans un modèle de souris humanisées. La comparaison des différentes conditions expérimentales nous permettra de juger de la capacité de telle ou telle molécule à empêcher la réponse immunitaire de contrôler la tumeur. Une plus faible croissance tumorale en l'absence d'expression de la molécule X ou Y nous indiquera que ces molécules sont bien des freins à la réponse contre la tumeur. Les objectifs de notre étude sont de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques pour l'immunothérapie du cancer, mais aussi les mécanismes sous jacents à l'origine du blocage de la réponse immunitaire contre la tumeur grâce à des analyses cellulaires et moléculaires complémentaires non détaillées ici.

Ce programme de recherche est développé dans le respect de la règle des 3R. Remplacement: ces expérimentations in vivo sont les seules à pouvoir répondre à nos questions, le modèle des souris humanisées étant le seul à pouvoir juger dans des conditions physiologiques du rôle des molécules X et Y sur l'efficacité de la réponse immunitaire contre la tumeur. Des résultats positifs in vitro seraient insuffisants pour être convaincu de la pertinence physiologique des observations et leur transposition à la clinique seraient freinés. Réduction: il est tiré profit de chaque animal pour nous apporter le maximum d'information (analyse de la croissance tumorale et des mécanismes cellulaires et moléculaires). Si possible, nous utilisons les données de manière transversale entre les protocoles afin de réduire le nombre d'animaux. Les groupes d'études sont faits le plus souvent en même temps afin de réduire le nombre de groupes témoins. Raffinement: nous cherchons à raffiner au maximum nos protocoles pour limiter la souffrance. C'est pourquoi les souris venant de l'extérieur sont acclimatées aux conditions locales d'hébergement pendant une semaine avant d'entrer dans une procédure, nous enrichissons le milieu avec du papier et/ou des maisons pour éviter le stress des souris, nous effectuons une surveillance journalière des animaux pour limiter la souffrance et nous procédons à l'euthanasie des souris en cas d'attente des points de limite préétablis. Le nombre d'animaux prévus pour réaliser le projet est de 168.

18476 Le cancer du sein est la 3ème cause de mortalité par cancer en France. Un sous type particulier, appelé cancer du sein HER2, est souvent responsable de métastases cérébrales. La thérapie ciblée par anticorps anti-HER2 a révolutionnée la prise en charge depuis 20 ans. Malheureusement, ce traitement injecté par voie veineuse n'atteint pas le cerveau, un organe très protégé par la barrière

hémato-encéphalique. La plupart de ces patientes meurent donc de métastases cérébrales. Pour contourner cette barrière hémato-encéphalique, des injections d'anticorps peuvent être faites directement dans le liquide céphalo-rachidien (LCR), mais avec une efficacité limitée. En effet, l'un des écueils est l'efflux rapide des anticorps du LCR via des récepteurs d'efflux. Nous menons un programme d'ingénierie de nouveaux anticorps pour contourner cet efflux.

Les xénogreffes tumorales consistent à greffer un fragment de tumeur d'un patient chez la souris ou le rat. Ces dernières constituent de formidables modèles d'étude de la pathologie humaine puisqu'elles reproduisent fidèlement la tumeur dont elles sont issues. Afin de reproduire le plus fidèlement possible les conditions de la pathologie humaine, nous réaliserons des xénogreffes de cellules tumorales issues de métastases cérébrales de cancer du sein HER2 humain, en position orthotopique, en intra-cérébral. Ce modèle présente l'avantage de prendre en compte l'environnement de la tumeur dans l'évaluation de la réponse au traitement, et surtout la question du passage de la barrière hémato-encéphalique par les drogues.

Pour ce projet, nous cherchons à étudier la pharmacologie de 3 anticorps anti-HER2 après leur injection intra-cérébrale sur des modèles de rats porteurs de xénogreffes cérébrales de cancer du sein métastatique HER2 humain.

Une première étude de faisabilité sera réalisée chez la souris. Il s'agit de vérifier les capacités implantatoires des cellules tumorales humaines xénogreffées. Une implantation intra-crânienne de cellules tumorales métastatiques humaines sera réalisée sur une série de 15 animaux, et un suivi quotidien avec établissement d'un score clinique permettra d'évaluer la prise de greffe. Une analyse histologique séquentielle permettra d'évaluer le développement tumoral intra-cérébral.

La suite de ce projet sera réalisé chez le rat. De la même manière que chez la souris, 40 rats seront xénogreffés avec ces mêmes cellules tumorales métastatiques humaines en intra-cérébral. Un cathéter intrathécal sera également posé. Les molécules thérapeutiques seront injectées dans le LCR par ce cathéter, puis une ponction de LCR sera réalisée afin de mesurer la concentration de médicament au niveau cérébral à différents temps de cinétiques (10 temps au total). Un dosage sanguin des molécules thérapeutiques injectées sera également réalisé pour chaque temps de cinétique.

Cette expérimentation répond aux exigences en termes de remplacement, de réduction et de raffinement.

Remplacement : Bien que nous ayons acquis des données d'efficacité in-vitro de ces anticorps sur des lignées tumorales humaines, ces données restent insuffisantes. Les lignées cellulaires sont en effet des modèles plus éloignés de la réalité clinique que ne le sont les xénogreffes, et les modélisations in-vitro ne permettent pas de prendre en compte les réalités physiologiques des métastases cérébrales. C'est pourquoi, dans l'optique d'un essai clinique chez l'homme, des tests in-vivo restent indispensables.

Réduction : Le nombre d'animaux nécessaire a été calculé au minimum pour nous permettre d'atteindre les objectifs fixés avec une puissance statistique suffisante (test de Mann withney). Aussi, un total de 15 souris et 40 rats seront nécessaires à ce projet. L'étude de faisabilité sur les souris est un prérequis pour la suite du projet. Si les tumeurs ne se développent pas chez la souris, les expériences sur le rat ne seront pas faites.

Raffinement : Tout sera fait pour favoriser le bien-être des animaux tout au long du projet. Les actes chirurgicaux (greffe intra-cérébrale, pose de cathéter) seront réalisés sous anesthésie générale avec analgésie. Un suivi quotidien des animaux est assuré par les membres de l'animalerie et le personnel formé de l'unité. Les cages contiennent des enrichissements pour assurer le bien-être des animaux. Des points limites précoces ont été fixés pour limiter la gêne et la souffrance tout au long du projet, ils entraîneront l'euthanasie de l'animal.

Au terme de cette étude, nous espérons mettre en évidence un anticorps ayant une efficacité thérapeutiques contre les métastases cérébrales de cancer du sein HER2, dans l'optique d'améliorer la prise en charge des patientes.

18477 La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie génétique à transmission récessive liée au chromosome X due à l'absence de la protéine dystrophine. Cette maladie entraîne une dégénérescence de l'ensemble des muscles (squelettique, cardiaque ou lisse). Il n'existe pas à ce jour de traitement pour la DMD mais des stratégies de thérapie génique prometteuses sont en cours d'évaluation dans des essais cliniques. Néanmoins, nous savons aujourd'hui que la restauration de dystrophine devra donc s'accompagner d'une stratégie permettant un meilleur maintien de l'intégrité musculaire et qui favoriserait la croissance musculaire.

La protéine GDF5 (Growth Differentiation Factor 5) a été décrite comme étant un acteur clé de l'homéostasie de la masse musculaire en inhibant la dégradation et stimulant la synthèse protéique. L'objectif de ce projet est donc d'étudier un éventuel effet bénéfique de la protéine GDF5 dans le muscle dystrophique.

Pour ce projet, nous utiliserons des souris mdx (Muscular dystrophy X-linked), modèle murin de la DMD.

Remplacement: Afin de limiter au maximum le recours à l'utilisation de souris pour l'obtention de réponses à nos questions, les expériences seront, dans la mesure du possible réalisées in vitro avec des lignées cellulaires. Ce n'est qu'en dernier recours que nous utiliserons le système murin.

Réduction : De même, les processus expérimentaux seront conçus de façon à utiliser un nombre de souris limité permettant une analyse statistique. Néanmoins, 5 animaux par groupe seront malgré tout nécessaires et les protocoles seront rigoureusement élaborés et réfléchis en avance pour que l'expérience soit interprétable et que l'on n'ait pas à la refaire.

Raffinement : Les conditions d'hébergement et l'enrichissement du milieu sont gérés par l'animalerie. Elles consistent en un contrôle quotidien des cages, un changement régulier, un nombre réduit d'animaux par cage (5 maximum) et pas d'animaux isolés. Le changement des cages se fait sous hotte aspirante et les cages possèdent des filtres. L'enrichissement du milieu consiste en l'ajout de laine de bois afin que les souris puissent faire un nid ainsi que de lanières de papier Kraft et des tunnels en carton. Enfin, si nécessaire, la nourriture pourra être mise à disposition sur le plancher de la cage. Au cours des procédures, les animaux seront anesthésiés et installés sur une plaque chauffante ou sous lampe radiante. Les animaux seront ensuite suivis quotidiennement afin de relever le moindre signe de souffrance.

Pour réaliser ce projet nous utiliserons 440 souris (220 souris mdx et 220 souris C57BL/6JRj)

18478 Les douleurs chroniques sont un problème de santé publique majeur chez l'Homme dont les traitements actuels se révèlent souvent peu efficaces ou accompagnés d'effets secondaires. Afin de permettre le développement de nouveaux outils thérapeutiques, des modèles animaux de douleur persistante sont à l'étude. En particulier chez la souris, l'administration d'une substance inflammatoire conduit non seulement au développement d'une hypersensibilité à la douleur (hyperalgésie) qui disparaît après plusieurs jours mais également à l'établissement d'un nouvel équilibre impliquant un niveau élevé d'activation entre les systèmes endogènes pro-analgésiques et anti-analgésiques qui perdure plusieurs mois après la disparition de l'hyperalgésie initiale. Ce phénomène, dénommé sensibilisation latente à la douleur, peut être révélé chez la souris à l'aide de molécules bloquant les récepteurs opioïdes (système pro-analgésiques) ou d'un stress aigu et se traduit alors par une phase d'hyperalgésie transitoire qui n'est pas présente chez des animaux qui n'ont pas eu une douleur préalable. Il a été proposé que ce phénomène serait en partie à l'origine des douleurs chroniques chez l'homme. Il est donc essentiel de mieux le comprendre pour pouvoir développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Des données préliminaires indiquent que le récepteur NPPFR1 fait partie des systèmes anti-analgésiques qui seraient impliqués dans le maintien de la sensibilisation latente à la douleur. En effet, des bloqueurs de ce récepteur qui ont été développés et caractérisés au sein de notre équipe, permettraient de bloquer durablement cet état de sensibilisation latente à la douleur induite par une inflammation. Enfin, nous avons également mis en évidence une surexpression de gènes impliqués dans les processus inflammatoires chez des souris en état de sensibilisation latente à douleur, qui est abolie par l'administration d'un de ces bloqueurs. Ces données suggèrent que des processus inflammatoires

latents à long terme sont également présents dans l'organisme et seraient à l'origine du maintien de la sensibilisation latente à la douleur. Dans ce contexte, l'objectif de ce projet sera d'étudier si l'établissement et le maintien de la sensibilisation latente à la douleur sont liés à une inflammation latente qui perdure malgré la résolution de l'hyperalgésie induite par l'inflammation en visualisant l'inflammation in vivo à l'aide de sondes fluorescentes et d'un dispositif d'imagerie dédié et d'évaluer l'activité de deux molécules bloqueurs du NPPFR1 sur ce phénomène. Les résultats de ce projet pourraient amener à développer des stratégies innovantes pour le traitement de la douleur chronique.

Adéquation avec la règle des 3R:

Remplacer : les molécules testées in vivo sont caractérisées au préalable in vitro pour leur activité et leurs caractéristiques physicochimiques. Cependant, l'évaluation de leur effet sur la nociception n'est réalisable que sur l'animal entier. Il n'existe pas de modèles in vitro permettant de réaliser ce travail.

Réduire : Compte tenu de la variabilité dans les différentes expériences prévues et de nos résultats antérieurs, le nombre d'animaux est limité à 10 par groupe, ce qui permet d'obtenir des résultats exploitables en termes statistiques.

Raffiner : Les animaux seront hébergés dans une animalerie dont le fonctionnement est conçu pour maximiser leur confort et limiter leur souffrance. En particulier, les animaux seront hébergés en cohorte, dans un milieu enrichi, et observés quotidiennement par l'expérimentateur ou une personne compétente. Pour chaque procédure, des points limites adaptés ont été définis selon les directives éthiques indiquées par l'association internationale pour l'étude de la douleur. L'administration des sondes d'imagerie ainsi que l'imagerie de l'inflammation in vivo seront réalisées sous anesthésie gazeuse.

Nombre total d'animaux utilisés dans ce projet : 280 souris C57BL6N

18479 Les dégénérescences rétiniennes héréditaires telles que la dystrophie bâtonnets-cônes sont une cause majeure de cécité humaine causée par un grand nombre de mutations dans plus de 200 gènes exprimés dans la rétine - dont certains n'ont pas encore été identifiés. L'impact de ses maladies en terme de santé publique est important. Trouver des stratégies pour soigner ses pathologies est un enjeu crucial pour permettre aux personnes atteintes de conserver leur autonomie dans les tâches de la vie quotidienne.

Les dégénérescences rétiniennes ne survenant pas spontanément chez le macaque, il nous apparaît nécessaire de trouver une stratégie pour l'induire afin de pouvoir évaluer l'efficacité d'une thérapie cellulaire par transplantation de photorécepteurs issus de cellules souches dans la reconstruction du tissu rétinien. Une étape préalable par le rongeur est indispensable à ce projet.

Nous proposons ici de créer chez le rat un modèle de dégénérescence rétinienne par pose d'un implant sous-rétinien. La cinétique de la dégénérescence sera observée par des techniques d'imageries de l'œil. Nous validerons aussi le modèle en vérifiant la capacité d'un vecteur viral couplé à la GFP à traverser les tissus rétiniens, cette diffusion étant possible uniquement sur un tissu dégénéré. Nous utiliserons des implants fixes et biodégradables. Nous testerons dans un second temps, l'efficacité de transplantation de photorécepteurs issus de cellules souches dans la restauration anatomique du tissu rétinien.

Au total, 66 rats seront nécessaires à cette étude.

Nous avons pris soin dans cette étude du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ».

- (Remplacer) Ces expérimentations mettant en jeu le tissu rétinien dans son ensemble, l'utilisation de l'animal est indispensable. Il n'y a pas d'alternative par des modèles in vitro.

- (Réduire) Le nombre d'animaux a été réduit au minimum pour pouvoir atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus.

- (Raffiner) Les rats seront examinés quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Les animaux sont hébergés dans les conditions conformes à la

règlementation. Les rongeurs bénéficieront d'une anesthésie générale fixe ou gazeuse et d'une anesthésie locale cornéenne si nécessaire. Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée. Elle permet une observation adaptée des animaux pour s'assurer de leur bien-être

18480 La lithiase rénale est un enjeu de santé publique car elle affecte 10% de la population. La plupart des calculs dépendent en grande partie de la concentration des urines en calcium. Un grand nombre de calculs rénaux se développent à partir de calcifications du tissu rénal nommées plaques de Randall. Des études cliniques récentes suggèrent que les apports importants en vitamine D augmentent la concentration du calcium urinaire chez certaines personnes prédisposées et pourraient être associées au développement de ces plaques mais il n'y a pas de preuve actuellement. Nous allons étudier l'influence de la vitamine D dans le développement de ces plaques à l'aide d'un modèle murin spécifique, le seul modèle de développement de plaques de Randall connu chez l'animal.

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

*Remplacement : Le modèle in vivo chez la souris est indispensable car il permet de générer des calcifications qui miment celles observées chez l'homme. Il n'est pas possible de recréer in vitro la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires rentrant en jeu.

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

*Raffinement : Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures ont été mise au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal, en limitant la douleur et le stress (anesthésie). Aucune intervention invasive ne sera réalisée jusqu'au sacrifice

Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation, les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum. Le milieu est enrichi à l'aide de maison de type igloo. Nous garantissons le bien-être des animaux en cours de procédure grâce à une surveillance attentive et des soins adaptés. Lors de l'anesthésie la respiration des animaux est fréquemment surveillée visuellement. Un tapis chauffant garde l'animal à une bonne

température afin d'éviter l'hypothermie due à l'anesthésie. Tous les animaux sont stabulés dans une salle d'hébergement en surpression, en enceintes ventilées en pression positive et un accès ad libitum à la nourriture. Les conditions de température et d'hygrométrie sont contrôlées et monitorées. Les animaux sont hébergés avec leurs congénères.

18481 La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est la première cause de malvoyance après 50 ans et on estime à un million le nombre de personnes concernées. A ce jour, la cause précise de la maladie est encore inconnue, mais plusieurs hypothèses concernant le développement de la pathologie ont été proposées, et notamment le rôle très probable de la toxicité lumineuse et du stress oxydant sur la mort des cellules de la rétine.

Le but de ce projet est de valider l'effet protecteur de molécules thérapeutiques à fort potentiel protecteur, sélectionnées à partir de tests réalisés sur un modèle cellulaire de phototoxicité rétinienne, dans des modèles murins de phototoxicité rétinienne et de dégénérescence rétinienne liée à l'âge. Le développement d'un médicament visant à traiter la DMLA chez l'homme pourrait découler de ces expériences.

Un total de 1400 souris sera utilisé pour réaliser ces expériences sur une durée totale de 5 ans, ce qui représente une moyenne de 280 souris par an.

La règle des 3R sera appliquée. Remplacer : Ce projet fait suite à plusieurs tests sur cellules démontrant sans conteste le potentiel des molécules d'intérêt en thérapie humaine. La validation des effets thérapeutiques chez l'animal est donc à ce stade indispensable pour envisager un développement thérapeutique. Réduire : Nous réduirons au minimum le nombre de souris par groupe afin de pouvoir réaliser un test statistique. Raffiner : Une surveillance sera réalisée par le manipulateur pendant la durée de la chirurgie, lors du réveil et le lendemain matin. Les souris seront ensuite observées quotidiennement par l'animalier et/ou le manipulateur. Toutes les manipulations nécessitant seront réalisées sous anesthésie générale et/ou locale et des traitements préventifs (antibiotique, anti-inflammatoire) seront utilisés afin de réduire les risques d'infection et de douleur. Le poids et l'apparence physique des souris seront vérifiés tout au long des procédures expérimentales. Une perte de poids très importante ou un signe révélateur de souffrances engendrera une euthanasie. Le comportement et la posture des souris seront également observés afin d'évaluer le degré de bien-être ou de douleur.

18482 Les douleurs chroniques sont un problème de santé publique majeur chez l'Homme dont les traitements actuels se révèlent souvent peu efficaces ou accompagnés d'effets secondaires. Afin de permettre le développement de nouveaux outils thérapeutiques, des modèles animaux de douleur persistante sont à l'étude. En particulier chez la souris, l'administration d'une substance inflammatoire conduit non seulement au développement d'une hypersensibilité à la douleur (hyperalgésie) qui disparaît après plusieurs jours mais également à l'établissement d'un nouvel équilibre impliquant un niveau élevé d'activation entre les systèmes endogènes pro-analgésiques et anti-analgésiques qui perdure plusieurs mois après la disparition de l'hyperalgésie initiale. Ce phénomène, dénommé sensibilisation latente à la douleur, peut être révélé chez la souris à l'aide de molécules bloquant les récepteurs opioïdes (système pro-analgésiques) ou d'un stress aigu et se traduit alors par une phase d'hyperalgésie transitoire qui n'est pas présente chez des animaux qui n'ont pas eu une douleur préalable. Il a été proposé que ce phénomène serait en partie à l'origine des douleurs chroniques chez l'homme. Il est donc essentiel de mieux le comprendre pour pouvoir développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Des données préliminaires indiquent que le récepteur NPFFR1 fait partie des systèmes anti-analgésiques qui seraient impliqués dans le maintien de la sensibilisation latente à la douleur. En effet, des bloqueurs de ce récepteur qui ont été développés et caractérisés au sein de notre équipe, permettraient de bloquer durablement cet état de sensibilisation latente à la douleur induite par une inflammation. Enfin, nous avons également mis en évidence une surexpression de gènes impliqués dans les processus inflammatoires chez des souris en état de sensibilisation latente à douleur, qui est abolie par l'administration d'un de ces bloqueurs. Ces données suggèrent que des processus inflammatoires latents à long terme sont également présents dans l'organisme et seraient à l'origine du maintien de la sensibilisation latente à la douleur. Dans ce contexte, l'objectif de ce projet sera d'étudier si l'établissement et le maintien de la sensibilisation latente à la douleur sont liés à une inflammation latente qui perdure malgré la résolution de l'hyperalgésie induite par l'inflammation en visualisant l'inflammation in vivo à l'aide de sondes fluorescentes et d'un dispositif d'imagerie dédié et d'évaluer l'activité de deux molécules bloqueurs du NPFFR1 sur ce phénomène. Les résultats de ce projet pourraient amener à développer des stratégies innovantes pour le traitement de la douleur chronique.

Adéquation avec la règle des 3R:

Remplacer : les molécules testées in vivo sont caractérisées au préalable in vitro pour leur activité et leurs caractéristiques physicochimiques. Cependant, l'évaluation de leur effet sur la nociception

n'est réalisable que sur l'animal entier. Il n'existe pas de modèles in vitro permettant de réaliser ce travail.

Réduire : Compte tenu de la variabilité dans les différentes expériences prévues et de nos résultats antérieurs, le nombre d'animaux est limité à 10 par groupe, ce qui permet d'obtenir des résultats exploitables en termes statistiques.

Raffiner : Les animaux seront hébergés dans une animalerie dont le fonctionnement est conçu pour maximiser leur confort et limiter leur souffrance. En particulier, les animaux seront hébergés en cohorte, dans un milieu enrichi, et observés quotidiennement par l'expérimentateur ou une personne compétente. Pour chaque procédure, des points limites adaptés ont été définis selon les directives éthiques indiquées par l'association internationale pour l'étude de la douleur. L'administration des sondes d'imagerie ainsi que l'imagerie de l'inflammation in vivo seront réalisées sous anesthésie gazeuse.

Nombre total d'animaux utilisés dans ce projet : 280 souris C57BL6N

18483 Le projet : L'arthrose est la pathologie articulaire la plus fréquente, touchant 10 millions de personnes en France. Elle se traduit cliniquement par des douleurs et une raideur articulaires ce qui entraîne un handicap important dans la vie quotidienne des patients. Il n'existe pas, à ce jour, de traitement spécifique de l'arthrose en dehors de la prise en charge de la douleur. Pour espérer développer des traitements efficaces, une meilleure compréhension des mécanismes à l'origine de cette maladie est indispensable.

L'arthrose est due à une inflammation locale des tissus articulaires conduisant à une dégradation du cartilage articulaire, tissu de glissement entre les os au niveau des articulations. Les seules cellules présentes au sein du cartilage articulaire se nomment les chondrocytes.

Nos précédentes expériences ont montré que les chondrocytes sont munis de récepteurs nicotiques (appelés ainsi car ils fixent la nicotine), et que l'activation de ces récepteurs a une action anti-inflammatoire et pourrait donc protéger de l'arthrose. Des expériences préliminaires nous ont permis d'émettre l'hypothèse que cet effet protecteur anti-inflammatoire est plus spécifiquement lié à la stimulation de la sous-unité nicotinique alpha-5.

Notre but est de confirmer le rôle de la sous-unité alpha-5 des récepteurs nicotiques dans la physiopathologie de l'arthrose. Notre hypothèse est que l'absence de celle-ci entraînerait une augmentation de l'inflammation locale et des lésions d'arthrose et qu'à l'inverse sa stimulation pourrait protéger les souris de l'arthrose.

Pour valider cette hypothèse, nous allons étudier le rôle de la sous-unité nicotinique alpha-5 sur l'inflammation des cellules du cartilage de souris, les chondrocytes, exprimant ou non cette sous-unité alpha 5. Les résultats obtenus in vitro sur ces cellules seront confirmés sur des tissus articulaires entiers in vivo. Ainsi, nous allons comparer la trophicité du cartilage et la sévérité de l'arthrose chez des souris exprimant ou n'exprimant pas la sous-unité alpha-5 du récepteur nicotinique afin d'évaluer les conséquences de l'absence de la sous-unité alpha-5 « in vivo » (c'est-à-dire sur des souris vivantes). Nous réaliserons différents modèles d'arthrose représentatifs des différents phénotypes d'arthrose chez l'homme (post-traumatique, inflammatoire et associée au vieillissement). Enfin, nous déterminerons si l'injection intra-articulaire de Nicotine, qui permet l'activation des récepteurs nicotiques, protège les souris de l'arthrose.

Grâce à ces expériences, nous pourrions isoler un acteur clé de la diminution de l'inflammation (et donc de la progression locale) de l'arthrose et ouvrir la voie à de nouvelles thérapies.

Les animaux :

* Type : Souris C57BL/6J invalidées pour le gène de la sous-unité alpha-5 du récepteur nicotinique de l'acétylcholine et leurs contrôles (modèle murin transgénique).

* Nombre: Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 480 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de réduction et de raffinement décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R

». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

La conformité au principe des 3R :

*Remplacement : Un système vivant est nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu dans le développement de l'arthrose qui est au cœur de ce projet. Il n'est pas possible de recréer in vitro la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires rentrant en jeu.

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

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

18484 Dans le cadre de l'enseignement des unités de Physiologie Animale dans les formations licence Sciences Technologies Santé mention Sciences de la Vie, les étudiants, à partir du semestre 6, sont initiés à des actes de petite chirurgie sur des rats anesthésiés, au cours de séances de travaux pratiques (TP) illustrant quelques parties du cours (respiration, absorption du glucose, diurèse osmotique). Des démonstrations sont réalisées en début de séance par les enseignants avant que les étudiants, encadrés par les enseignants disposant d'une autorisation pour la chirurgie expérimentale et les techniciens habilités, ne commencent leurs manipulations. Les animaux sont euthanasiés en fin de séance.

De façon à réduire le nombre d'animaux, certains TP ont été remplacés par des TP utilisant des logiciels de laboratoire virtuels, cependant l'utilisation d'animaux reste nécessaire dans l'enseignement de la physiologie pour que les étudiants se destinant à la recherche soient familiarisés aux pratiques de l'expérimentation animale.

Les rats utilisés sont des animaux de réforme. Ils sont hébergés dans une animalerie conventionnelle dans des conditions optimales de température, hygrométrie, lumière et évoluant dans un milieu enrichi.

Le nombre d'animaux utilisés dépend du nombre d'étudiants jugeant cet enseignement utile/nécessaire pour leur avenir professionnel et s'inscrivant dans ces TP facultatifs. Ceux-ci travaillent en binôme sur un animal afin de réduire le nombre d'animaux. Au cours des 5 dernières années nous avons utilisé pour ces TP une moyenne de 80 rats par an. Un total de 160 rats sera nécessaire pour 2 ans.

18485 Mots Clefs : Ischémie-reperfusion rénale, hypothermie, mitochondrie, imagerie rénale

Objectifs :

L'ischémie reperfusion rénale peut se rencontrer dans de nombreuses situations cliniques, et ses conséquences sont lourdes en terme de morbi-mortalité. Ce projet fait suite à un protocole nous ayant permis de mettre en évidence et de confirmer les effets protecteurs de l'hypothermie thérapeutique à court et long terme après ischémie reperfusion rénale dans un modèle murin. Il s'agit ici d'évaluer l'échographie rénale de perfusion et l'imagerie photo-acoustique rénale, chez la souris, comme moyen non invasif de détecter précocement les lésions rénales autrement dit d'évaluer la protection conférée par l'hypothermie, afin de prédire l'évolution de la fonction rénale à distance de l'épisode d'ischémie. En parallèle nous poursuivrons l'étude des mécanismes de

protection du froid par l'étude de la fonction mitochondriale afin de montrer son rôle essentiel dans la survie des cellules rénales.

Bénéfices escomptés :

Notre projet cherche principalement à mettre en évidence le bénéfice à long terme de l'hypothermie thérapeutique, à la fois pour raffiner le modèle animal, et pour la compréhension de la physiopathologie humaine :

- Mettre au point l'imagerie photo-acoustique rénale comme moyen fiable d'évaluer les lésions rénales après une ischémie reperfusion permettrait de raffiner le modèle, et d'estimer à plusieurs reprises à différents temps de reperfusion de manière non invasive et indolore la protection rénale conférée par une thérapeutique, sans devoir recourir à chaque fois au sacrifice de l'animal pour obtenir les reins pour analyse histologique (méthode de référence actuelle)

- Améliorer la compréhension des mécanismes de protection de l'hypothermie dans l'ischémie reperfusion rénale permettrait de justifier sa plus grande utilisation en pratique clinique chez l'homme, et de proposer des cibles pour des traitements pharmacologiques qui pourraient mimer les effets bénéfiques du froid même lorsqu'il ne peut pas être appliqué (notamment à cause du risque d'effets secondaires), ou pour en potentialiser les effets

Dommages attendus :

Procédure 1 : les animaux seront soumis à une anesthésie générale (injection intra-péritonéale) associée à un morphinique (injection sous-cutanée), et un anesthésique local (injection sous-cutanée pendant l'anesthésie générale), en vue d'un acte chirurgical. Celui-ci comprendra une intubation oro-trachéale pour mise sous respirateur, puis une laparotomie. L'animal est réveillé (impliquant des soins post-opératoires adaptés). 24h plus tard, l'animal est de nouveau anesthésié (identique à précédemment) pour permettre la mise à mort (pendant l'anesthésie générale) et le prélèvement du sang et des reins pour l'étude des fonctions mitochondriales.

Procédure 2 : après anesthésie gazeuse inhalée, les animaux seront soumis à une échographie rénale indolore, avec pose d'un cathéter veineux pour injection d'un produit de contraste (micro-bulles), puis réveillés avec surveillance et soins adaptés. Une semaine après, les animaux seront soumis à une anesthésie générale gazeuse et un acte chirurgical tel que décrit au protocole 1, suivi d'une échographie rénale, puis seront réveillés avec des soins post-opératoires adaptés. Un mois plus tard, sous anesthésie gazeuse, les animaux seront soumis à une dernière échographie rénale puis, toujours sous anesthésie générale telle que décrite précédemment, seront mis à mort pour permettre le prélèvement du sang et des reins pour analyse.

Compte-tenu du recul du laboratoire sur ce modèle chirurgical, les soins post-opératoires et la couverture analgésique ont été prévus pour prévenir toute douleur ou souffrance de l'animal après chirurgie et jusqu'à la mise à mort. Une perte de poids (<15%) est attendue sur 24h en raison de l'anesthésie et de la chirurgie (déshydratation pendant l'acte chirurgical, reprise progressive de boisson et nourriture en post-opératoire). Elle est en partie compensée par une réhydratation (injection sous-cutanée de bicarbonate de sodium) au réveil de l'animal puis à H+8 de la chirurgie, et la mise en place d'élément facilitant la prise alimentaire et hydrique.

Ce projet nécessite ainsi le recours à maximum 46 souris.

Prise en compte des 3R :

Remplacement :

Notre étude a pour but d'étudier des techniques d'imagerie rénale chez l'animal, qui évalue la perfusion de l'organe et ses apports en oxygène, ce qui écarte les possibilités de méthodes alternatives (in vitro ou in silico) en raison de l'absence de vascularisation permanente des cellules ou de l'organe. De la même façon, pour étudier la séquence d'ischémie-reperfusion, ses mécanismes et la protection par l'hypothermie, les méthodes d'étude in vitro sont très limitées devant l'implication de multiples types cellulaires, du système immunitaire (adaptatif et inné) ainsi que des voies du complément et de la coagulation. Il est donc impossible, à l'heure actuelle, d'évaluer les mécanismes liés à l'hypothermie dans l'ischémie reperfusion en utilisant seul un modèle in vitro et sans avoir recours au modèle animal.

Réduction :

Le nombre d'animaux a été réduit au minimum nécessaire à l'obtention de résultats statistiquement exploitables, sur la base des résultats précédemment obtenus dans les mêmes conditions dans notre projet précédent, ainsi que sur les résultats décrits dans la littérature (tests de puissance).

L'examen d'imagerie réalisée dans la procédure 2 étant indolore et inoffensif pour les animaux, il est répété (en plus de la situation basale) à 2 reprises lors de chaque anesthésie générale (dans les suites immédiates de la chirurgie, puis juste avant la mise à mort pour prélèvement terminal), permettant d'augmenter le nombre de mesures sans devoir augmenter le nombre total d'animaux.

Raffinement :

Les soins et la surveillance post-opératoire sont identiques à notre précédent projet pour que les résultats soient comparables, ce précédent projet nous ayant permis par ailleurs de les améliorer devant la constatation d'un degré de gravité « sévère » plutôt que « modérée » comme initialement attendu. Ce raffinement consiste en :

- Une couverture analgésique maximisée pour la chirurgie et le réveil post-opératoire (morphinique + anesthésique local)
- Une surveillance du réveil particulièrement renforcée, avec notamment une réhydratation sous-cutanée supplémentaire (soit 2 au total), mis en place lors de notre précédent projet pour améliorer les suites post-opératoires, et qui a permis de réduire la mortalité (liée à la procédure, ou à la nécessité de mise à mort précoce par atteinte des points limites) depuis sa mise en place
- Une surveillance post-opératoire parfaitement adaptée à notre modèle chirurgical pour prévenir de manière précoce toute complication (critères d'observation et grille de score conçus à cet effet).

18486 L'endométriose est une pathologie gynécologique affectant 5 à 15% des femmes en âge de procréer. Elle se caractérise par la présence anormale de tissu endométrial (partie interne de l'utérus) dans la cavité péritonéale. Cette maladie est associée à des douleurs pelviennes chroniques (40-60% des cas) et à de l'infertilité (20-30% des cas). Sa physiopathologie reste évasive. La théorie la plus acceptée est qu'au cours des menstruations, des fragments de tissu endométrial vont dans la cavité péritonéale via un flux rétrograde (passage par les trompes) et vont adhérer et proliférer pour former les lésions d'endométriose. Ce flux rétrograde existant chez 90 % des femmes, les femmes qui développent une endométriose ont des caractéristiques spécifiques qui permettent aux cellules endométriales d'adhérer et de proliférer de façon ectopique (en position anormale), formant des lésions d'endométriose, résistantes à une élimination par le système immunitaire. Cette maladie est également associée à des complications de la grossesse. Les cellules immunitaires ont un rôle très important dans l'établissement de la grossesse. L'objet du présent projet est de tester in vivo le rôle des agents immunomodulateurs sur le développement de l'endométriose et de la grossesse. Pour cela, nous utiliserons des modèles murins d'endométriose. Nous évaluerons la croissance des lésions d'endométriose (induites), le nombre de résorption embryonnaire par échographie et les variations de sensibilité tactile au niveau abdominal des souris. Ce projet s'inscrit dans un respect strict de la règle des 3R. Nous avons précédemment mené l'étude de ces molécules immunomodulatrices sur des cellules immunes en culture cellulaire in vitro (afin de Remplacer autant que possible l'utilisation de modèle animaux). Cependant, leur influence sur le développement de l'endométriose et dans le cadre d'une gestation nécessite une évaluation dans un organisme complet (pour évaluer les interactions entre les différents organes et types cellulaires impliqués dans un contexte physiopathologique). Une étude de puissance a été réalisé afin d'évaluer le nombre de souris nécessaire et ainsi de Réduire leur nombre au maximum. La chirurgie sera réalisée sous anesthésie générale. Les échographies également sous anesthésie nous permettront d'étudier les souris de manière longitudinale (Raffiner, Réduire) et de limiter le nombre de souris tout en étudiant la résorption embryonnaire à différent stade de la gestation. Ce projet nécessitera ainsi au maximum 880 souris et 1760 fœtus pour des procédures expérimentales qui s'étendront sur 5 ans, ce nombre pouvant être revu à la baisse en fonction des résultats obtenus avec les traitements par les molécules immunomodulatrices (seules les molécules les plus prometteuses seront utilisées dans les approches de thérapies cellulaires). Nous limiterons au

maximum la douleur et la souffrance des animaux en utilisant des antalgiques après les procédures chirurgicales et en suivant la progression des grossesses et des lésions par échographie. Enfin des points limites ont été établis conduisant à une mise à mort de manière anticipée si nécessaire. Un contrôle quotidien du bien-être et de l'état général des souris sera réalisé, couplé à des mesures échographiques de croissance des lésions et du nombre de fœtus deux fois sur 3 semaines. De l'enrichissement sera placé dans chaque cage afin de ne pas perturber le comportement de nos souris. A terme, le but de ce projet est de pouvoir proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le cadre de l'endométriose, qui seraient compatibles avec la grossesse (les thérapies médicamenteuses actuelles étant contraceptives).

18487 L'ulcère de Buruli ou infection à *Mycobacterium ulcerans* est la troisième mycobactériose dans le monde. Cette maladie handicapante causée par *M. ulcerans* sévit principalement dans les zones tropicales humides de l'Afrique de l'Ouest et Centrale. Cette infection touchant la peau débute généralement par un nodule qui évolue en une ulcération qui s'étend. Malgré leur étendue, les lésions ne sont pas douloureuses grâce à la toxine produite par le bacille. Pour lutter contre cette maladie aux conséquences socioéconomiques dramatiques, il est nécessaire de développer des approches prenant en compte les spécificités de cette maladie. Elles exigent le développement de projets globaux intégrant différentes facettes de la biologie du bacille. *M. ulcerans* sécrète un lipide appelé mycolactone, qui est le principal facteur de virulence de la bactérie. Nos investigations menées *in vitro* et *in vivo* nous ont permis de démontrer pour la première fois que la mycolactone présentait une propriété pro-inflammatoire. Plus précisément par des approches cellulaires, nous avons démontré que la mycolactone associées aux vésicules extra cellulaires produites par le bacille induisait la production d'IL1B et IL18, des cytokines jouant un rôle pivot dans l'inflammation. Aussi, nous avons mis en évidence que la production d'IL1B et IL18 est principalement induite par l'activation de l'inflammasome NLRP3.

Afin de poursuivre nos investigations visant à disséquer les mécanismes à l'échelle moléculaire et leurs conséquences dans la physiopathologie de l'infection à *M. ulcerans*, nous devons utiliser des modèles murins n'exprimant pas IL1B et IL18, NLRP3 mais aussi la Gasdermin D (souris dites knock out (KO)) dont nous avons démontré leur rôle dans l'effet pro-inflammatoire de la mycolactone. Mais en fonction de l'avancée de nos travaux, il est fort probable que nous devions utiliser d'autres modèles murins (Knock out) qui ne sont pas identifiés à ce stade.

Plus précisément, pour la dissection des phénomènes sous-jacents et l'impact sur la physiopathologie nous injecterons à ces différents modèles murins la mycolactone purifiée ou contenue dans les vésicules de *M. ulcerans* ou la bactérie viable.

Dans un second temps nous utiliserons des inhibiteurs des voies de l'inflammation activées par la mycolactone (voies que nous aurons identifiées précédemment) afin de valider nos hypothèses et proposer à terme des nouvelles stratégies thérapeutiques. Un nombre total de 4162 souris sera nécessaire à ce projet.

Cette étude a été rédigée et pensée de manière à respecter la règle des 3 R (Remplacement, Réduction, Raffinement). Des études préliminaires *in vitro* permettent de déterminer quels modèles murins et inhibiteurs utiliser. Nous devons désormais passer chez l'animal pour étudier l'effet à l'échelle d'un organisme entier et à terme proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour l'Homme. Le bien-être animal a été l'une des priorités dans la conception de cette étude mais nous ne pouvons à ce stade nous passer d'utiliser des animaux, c'est pourquoi nous n'utiliserons que le nombre d'animaux nécessaires pour mener à bien cette étude et tous les résultats obtenus seront utilisés et exploités. Le nombre d'animaux dans chaque lot a été pensé pour permettre de collecter des données statistiquement fiables sans pour autant exagérer leur nombre.

Afin de raffiner les conditions de vie des souris, un suivi adapté des animaux a été instauré afin de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, mais aussi la détresse ou l'angoisse qu'elles pourraient éprouver. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux et bénéficient d'un enrichissement adapté (cabanes, papier, tubes en carton). Un suivi régulier sera effectué sur l'ensemble des animaux et des indicateurs comportementaux et physiques sont prédéfinis dans un tableau de score et constituent les points limites. A chaque point limite des mesures seront prises pour palier toute

souffrance qui pourrait survenir. Pour éviter toute angoisse lors du protocole expérimental, un anesthésique volatil (isoflurane) pourra être utilisé pour réaliser certaines procédures. Ce projet s'inscrit ainsi dans une gestion éthique de l'expérimentation animale et est donc en accord avec les réglementations européennes et françaises de bonnes pratiques de laboratoire. Ce projet ne débutera que lorsque l'APAFIS ci présent aura été validé par le comité d'éthique et le ministère. Toutes les expérimentations nécessitant l'injection de bactéries viables seront réalisées dans un niveau de confinement 3* (notre LNSB3 vient d'être agréé par le ministère). Aussi, tous les animaux OGM (knock out) seront déclarés au ministère de la recherche et de l'innovation.

18488 La mise en œuvre des réglementations portant sur l'expérimentation animale inscrite dans le droit français depuis février 2013 précise les obligations réglementaires de formations pour les personnes qui souhaitent mettre en application des procédures expérimentales sur les rongeurs.

Ce projet a pour objectif de former les personnels se destinant à manipuler des souris dans leur domaines de Recherche en Sciences du Vivant.

Cet enseignement pratique sera intégré dans des formations réglementaires de niveau Applicateur. La période de 5 ans pour laquelle est demandé ce projet

correspond à celle de l'agrément de ces formations.

Règle des 3R. Dans la mesure où ce projet a pour objectif de former de personnes qui seront amenées à travailler avec des animaux vigiles, la première règle, soit celle de Remplacer, ne pourra être appliquée ; les deux autres le seront de manière à réduire au maximum le stress ou l'angoisse des animaux, ainsi que le nombre d'animaux nécessaires au projet.

En ce qui concerne la règle de Raffiner, les animaux auront accès ad libitum à l'eau et à la nourriture, bénéficieront de conditions de température et d'hygrométrie régulées et conformes à la réglementation en vigueur. L'enrichissement de l'environnement des animaux (bâtonnets à ronger, matériel de nidification), le maintien des interactions sociales (hébergements de plusieurs individus dans une même cage) et la surveillance quotidienne des animaux permettront de s'assurer de leurs bien-être et de détecter rapidement tout changement de comportement.

Une attention toute particulière sera portée à l'apprentissage initial de la capture et de la préhension de l'animal, et la présence continue d'un encadrant garantira la qualité de l'apprentissage du savoir-faire nécessaire à la réalisation de tous les gestes techniques enseignés.

En ce qui concerne la règle de Réduire, un nombre minimal de souris est prévu pour assurer un bon enseignement à chacun des participants aux formations.

L'objectif est de permettre aux participants d'acquérir les compétences afin de leur permettre de réaliser ensuite leur travail de recherche selon les bonnes pratiques en expérimentation animale et en accord avec la réglementation européenne.

De plus, il est important de préciser que les animaux utilisés lors de ces formations sont des animaux de réforme destinés à être mis à mort. Ce nombre annuel a été calculé au plus juste des besoins compte-tenu des objectifs de chacune des formations et du nombre de participants anticipés.

Le projet nécessitera au maximum un total de 420 souris sur 5 ans.

18489 L'uvéite est une maladie inflammatoire de l'oeil qui peut conduire à la cécité chez l'homme. Cette pathologie serait due à une réponse non contrôlée du système immunitaire.

Notre projet vise à étudier le potentiel thérapeutique de nouvelles cibles contrôlant la réponse immunitaire. Le modèle d'uvéite, l'Uvéite Autoimmune Expérimentale (EAU), permet d'étudier la maladie dans un organisme entier qui ne peut pas être dupliqué en utilisant des tissus seuls. Nous avons suivi la règle des 3R en introduisant des points limites à notre protocole. En revanche, et à notre connaissance après une recherche dans plusieurs bases de données de la littérature scientifique, il n'y a pas d'alternative à l'utilisation de modèles animaux pour étudier l'uvéite. En conséquence, nous prévoyons l'emploi d'un modèle murin simple que nous maîtrisons parfaitement au laboratoire et un total de 1200 souris seront nécessaires pour ce projet.

La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet:

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

-Réduction du nombre d'animaux suffisants pour permettre des données statistiquement fiables. Les études in vivo développées dans ce projet permettent des approches fonctionnelles sans mise à mort de l'animal permettant un suivi pendant plusieurs semaines réduisant ainsi le nombre d'animaux utilisés -Raffinement le stress/fatigue/douleur de l'animal est réduit à son maximum par une surveillance quotidienne et l'expérimentation réduit à 4 semaines. De plus, nous utilisons des anesthésiques dans le cas des procédures qui le nécessite.

18490 Les troubles anxieux et de l'humeur associés au stress, tel que la dépression et le stress post-traumatique, sont parmi les premières causes d'invalidité dans le monde. Pour autant, les changements cérébraux qui précipitent l'apparition de ces pathologies sont loin d'être compris, et les cibles thérapeutiques actuelles insuffisantes. L'objectif de ce projet est de mettre en place au sein de notre laboratoire un modèle chez la souris permettant de recapituler les changements comportementaux associés aux expériences de stress chronique et facilitant l'utilisation d'outils biologiques afin de cartographier, d'enregistrer et de manipuler les circuits cérébraux impliqués dans ces changements comportementaux. Ce modèle devra être à la fois 1) très reproductible, 2) permettre d'étudier la variabilité inter-individuelle au stress, car tous les individus exposés au stress ne développent pas nécessairement de troubles mentaux, une qualité appelée résilience, 3) induire des effets comportementaux forts et durables dans le temps, 4) être flexible dans sa mise en place afin de pouvoir l'utiliser chez l'adulte mais aussi à un stade juvénile, afin d'étudier comment le stress précoce, qui est le plus grand facteur prédictif de la dépression, modifie durablement le cerveau et précipite l'apparition de troubles dépressifs et anxieux chez l'adulte. Pour ces raisons le modèle que nous souhaitons mettre en place sera le stress de défaite sociale (SDS), largement utilisé dans la littérature et remplissant ces différentes conditions. Ce modèle consiste à introduire une souris « test » dans la cage d'une souris plus agressive (en l'occurrence une souris CD1 adulte, une lignée non consanguine qui est largement utilisée pour son comportement agressif), provoquant l'attaque et la défaite de l'individu « test », suivi par une période d'interaction sensorielle prolongée entre la souris « test » et l'agresseur, mais sans contact physique direct. Cette expérience de défaite sociale négative, renforcée par la répétition de contacts sociaux avec l'agresseur induit des changements comportementaux et neurobiologiques durables qui ont des points communs avec certains symptômes présents dans la dépression chez l'homme, notamment l'anhédonie, l'anxiété, l'aversion sociale, une suractivation du système neuroendocrinien du stress, etc. Par ailleurs, sur la base du comportement d'évitement social qui est induit par ce modèle, il est facile de séparer les individus dits susceptibles au modèle, c'est-à-dire qui présentent une diminution du comportement d'interaction social, des individus dits « résilients », qui eux ne montrent pas de modification comportementale à la suite du modèle. Si ce modèle a été largement utilisé chez des souris mâles, son utilisation chez la femelle est marginale de par la sporadicité des comportements agressifs des souris mâles envers une femelle, ou de comportements agressifs d'une femelle envers une autre femelle. Cependant les maladies psychiatriques liées au stress, en particulier la dépression, étant plus observées chez les femmes, ce projet visera à implémenter le modèle de SDS à la fois chez les mâles et les femelles. Cela nous permettra à long terme d'étudier les dimorphismes sexuels des bases neurobiologiques de la dépression et de son traitement.

Cette étude nécessitera au total 280 souris.

Concernant l'application de la règle des 3 R dans notre étude :

Remplacement : aucune méthode alternative in vitro n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée. Le stress chez l'animal, comme modèle de pathologie psychiatrique humaine, repose sur l'observation du comportement de l'animal vivant. La souris est par ailleurs un choix pertinent de par les homologues structurelles qui existent avec l'homme dans l'organisation des zones cérébrales impliquées dans la réponse au stress et les émotions.

Réduction : les effectifs sont optimisés pour prendre en compte qu'une partie des animaux (~15 à 30% selon les études) sera résiliente au protocole de SDS, ces effectifs sont donc nécessaires pour pouvoir comparer statistiquement les groupes expérimentaux pour les différentes variables comportementales (témoins, SDS susceptibles, SDS résilients). Il est par ailleurs essentiel de pouvoir identifier des CD1 agressives, ce qui est un prérequis à l'étude. Finalement, les CD1 agressives sélectionnées peuvent être réutilisées par la suite en tant qu'agresseurs au cours de nouveaux protocoles de SDS.

Raffinement : Les conditions d'élevage des animaux seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu (cabanes plexiglass et cartons, tubes). Les animaux en SDS seront suivis quotidiennement, dans l'heure suivant l'épisode de défaite sociale, avec une attention particulière portée à l'état général, l'état de chair et aux plaies cutanées potentielles des animaux tests, ce qui sera facilité par des formulaires de santé précis pour chaque souris. Des points limites énoncés plus bas seront mis en place avant intervention ou exclusion du protocole.

18491 Les maladies infectieuses restent une cause majeure de mortalité, en particulier les infections à tropisme respiratoire. La compréhension de la relation hôte microorganisme est nécessaire pour envisager de nouvelles approches thérapeutiques, en particulier immuno-thérapeutiques. Les traitements antibiotiques ont jusqu'à aujourd'hui été étudié sans tenir du contexte immunitaire. L'efficacité de l'antibiothérapie est cependant corrélée à la compétence immunitaire. La connaissance des mécanismes immunologiques précoces (innés) lors des traitements antibiotiques d'une infection microbienne doit permettre d'envisager des approches antibactériennes innovantes. L'objectif de ce projet consiste à caractériser les mécanismes immunitaires innés mis en œuvre dans l'animal lors du traitement avec des antibiotiques des infections afin de définir des bases moléculaires et cellulaires pouvant contribuer à l'efficacité des antibiotiques.

La complexité du processus infectieux et de la réponse immunitaire associée ne peut être reproduite uniquement dans des tests *in vitro*. Pour ces raisons, nos investigations nécessitent des tests chez l'animal, plus particulièrement chez la souris. Le modèle murin est à ce jour le plus pertinent pour caractériser les mécanismes moléculaires et cellulaires de la réponse anti-infectieuse respiratoire. En effet, de nombreux modèles de souris invalidées pour des gènes des cascades immunologiques sont disponibles et permettent de caractériser précisément les mécanismes immunitaires anti-infectieux. Enfin, l'immunité innée qui est ciblée dans notre projet est très conservée entre les mammifères. Ainsi les réponses obtenues dans le modèle préclinique murin pourront être extrapolées à l'humain et permettront peut-être d'envisager le transfert rapide de ces approches antibactériennes chez l'homme.

Ce projet suivra les exigences de remplacement, de réduction, et de raffinement. Ainsi, des analyses statistiques seront effectuées en amont des infections expérimentales pour définir le nombre optimal de souris pour obtenir une puissance statistique suffisante. Par ailleurs, des analyses multiparamétriques et à haut débit (analyse de l'expression génique par puces à ADN, PCR haut débit, ou dosages multi-cytokines) permettront d'obtenir le maximum de données exploitables par animal et ainsi de limiter le nombre utilisé. Les expériences seront généralement composées de 3 groupes de souris infectées (contrôles et traitement antibiotique optimal et traitement antibiotique à dose modérée) et des échantillonnages à différents temps post-traitement. Pour les expériences d'efficacité des traitements, 8 souris par groupes seront nécessaires alors que 5 souris par groupe seront utilisées pour les analyses multiparamétriques de l'immunité pour un total de 9360 souris. Alors que les infections vont induire un degré d'altération sévère chez l'animal, les doses, les voies d'administration et les durées de traitements utilisés n'induisent pas de douleur (sévérité légère à modérée sous sédation si nécessaire). Les traitements participent surtout à l'élimination du pathogène et à l'amélioration significative de l'état général des animaux, et modélisent avant tout les interventions qui pourraient être réalisés chez l'homme. De plus, les animaux seront anesthésiés durant les manipulations pour réduire toute douleur et anxiété. Enfin, une attention toute particulière sera portée sur l'état global des animaux au cours de l'infection. Un point limite sera défini en fonction des paramètres physiques, physiologiques et cliniques et permettra de limiter au maximum la souffrance des animaux.

18492 Le Parlement Européen a appelé les états membres à renforcer leurs dispositifs de sécurité sanitaire des aliments. Ceci implique notamment que l'industrie comme les autorités sanitaires s'appuient davantage sur des méthodes de screening haut-débit, sensibles et peu coûteuses afin de renforcer le suivi des dangers alimentaires prioritaires. D'énormes avancées en sécurité microbiologique ont été réalisées ces dernières années grâce aux progrès de la biologie moléculaire. En matière de sécurité chimique, le système Français repose sur deux approches 1/ des plans de surveillance et de contrôle utilisés pour détecter d'éventuelles non-conformités par rapport à la réglementation ; 2/ des études de l'alimentation totale plus ponctuelles évaluant le risque global lié à l'exposition alimentaire chronique à des teneurs faibles de contaminants. Ces teneurs étant souvent très basses, les deux approches s'appuient essentiellement sur des méthodes très sensibles mais malheureusement très coûteuses et bas débit limitant à la fois l'étendue de la surveillance réglementaire et les possibilités d'autocontrôles industriels.

En prenant la surveillance des polychlorobiphényles (= PCBs de type dioxine ou non = DL ou nDL) dans les viandes comme modèle, le premier objectif du projet ANR SENTINEL est de développer des outils complémentaires à la fois haut-débit, sensibles et à faible coût pour renforcer la détection de non conformités, mais aussi pour permettre un suivi de ces contaminants.

L'objectif de la présente étude est d'exposer, par voie alimentaire, des poulets à croissance rapide à différentes sources et doses de PCBs et en conditions parfaitement contrôlées, afin d'identifier des biomarqueurs hépatiques ou sanguins sensibles à l'exposition des animaux à ces contaminants. Ces biomarqueurs pourront ensuite être utilisés par les laboratoires lors de contrôle de la qualité sanitaire des produits carnés. Les muscles (filets et aiguillettes) de ces animaux seront également collectés en vue d'étudier la sensibilité et la fiabilité des biosenseurs qui auront été développés dans le cadre de ce projet. Au total, 116 poulets seront répartis en 7 lots (témoin non exposé, lots exposés à trois sources de PCBs et 1 à 3 doses différentes) et élevés en cages individuelles de 1 à 42 jours d'âge. A 42 jours, les poulets seront sacrifiés pour prélever différents tissus (sang, foie, filets, aiguillettes) qui serviront à la recherche de biomarqueurs de contamination et au test des biosenseurs.

Réduction : Pour limiter le nombre d'animaux mis en élevage, l'expérimentation ne portera que sur des poulets mâles placés en cages individuelles pour maîtriser l'ingéré alimentaire individuel et donc l'ingéré de contaminant. Le nombre d'animaux mis en élevage (20 pour le lot témoin, 16 pour les lots exposés) est nécessaire et suffisant pour échantillonner suffisamment de tissus et tirer des conclusions significatives selon notre expérience. Les femelles produites simultanément par le couvoir seront destinées à des fins commerciales.

Remplacement : Compte tenu de l'objectif appliqué du projet en physiologie et métabolisme animal et zootechnie, le modèle animal ne peut être substitué par un modèle d'étude in vitro ou in silico.

Raffinement : Les poulets feront l'objet d'une surveillance quotidienne par les animaliers qui ont l'expérience de l'élevage des volailles et de leur comportement. Le milieu sera enrichi avec un perchoir et des anneaux métalliques. Toute manifestation de symptômes comportementaux persistants définis par un point limite entraînera le retrait de l'animal de l'expérimentation.

18493 L'alpha-synucléine est une protéine qui se présente sous une forme agrégée dans les lésions cérébrales caractéristiques de la maladie de Parkinson et de la démence à corps de Lewy (« synucléinopathies »). La protéine bêta-amyloïde est une protéine dont l'agrégation joue un rôle central dans les démences, notamment la maladie d'Alzheimer. Un grand nombre d'études indique que ces pathologies humaines sont en réalité souvent mixtes, impliquant une co-agrégation de différentes protéines, qui représente globalement un facteur pronostic défavorable associé à une aggravation des signes cliniques comportementaux et cognitifs.

Dans ce projet, nous utiliserons des souris génétiquement modifiées qui expriment l'alpha-synucléine humaine (lignée M83) ou la protéine bêta-amyloïde (lignée APPPS1), modèles des maladies de Parkinson et d'Alzheimer respectivement, afin de mettre en place et caractériser un modèle de ces pathologies mixtes pour une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués.

Les souris étudiées exprimeront ainsi chacune de ces deux protéines, seule (APPPS1 ou M83) ou conjointement (APPM83) à l'issue de croisements de ces deux lignées ; des animaux non transgéniques (B6C3H) issus des croisements sont également inclus. Nous avons observé, dans le cadre d'une étude préliminaire de vieillissement jusqu'à l'âge de 22 mois, que de telles souris APPM83 âgées présentent des lésions dans les régions cérébrales antérieures, et non dans les régions cérébrales postérieures et la moelle épinière comme chez les souris M83 âgées, et ne présentent aucun signe clinique de paralysie identifiable jusqu'à cet âge.

L'objectif de notre projet est d'évaluer dans quelle mesure l'inoculation intracérébrale d'agrégats d'alpha-synucléine dans le striatum, par injection stéréotaxique sous anesthésie à l'âge de 5 mois, exacerbe l'apparition des lésions dans ces régions cérébrales antérieures et éventuellement entraîne des déficits cognitifs, comportementaux ou moteurs identifiés par des tests fonctionnels pendant leur suivi jusqu'à l'âge de 8 mois. A cet âge, et y compris après une telle inoculation, aucun signe de paralysie n'est attendu d'après notre expérience du modèle expérimental M83.

Concernant la règle des 3R, l'étude de la propagation de la pathologie neurodégénérative et de ses conséquences fonctionnelles ne peut pas être remplacée par l'utilisation de méthodes alternatives à l'expérimentation animale sur souris. Les expériences nécessitent au total 160 souris adultes, nombre réduit au maximum permettant d'obtenir des résultats statistiquement fiables dans les 16 groupes expérimentaux de l'étude à raison de 10 animaux par lot. Les souris sont hébergées dans un environnement enrichi de manière contrôlée compte tenu de l'effet compensatoire d'un environnement enrichi sur la mémoire. Par ailleurs, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux, les procédures chirurgicales se dérouleront sous anesthésie et des antalgiques sont prévus en cas de nécessité.

Au regard de l'un des objectifs de notre projet concernant l'évaluation des conséquences fonctionnelles de la co-expression des deux protéines, 4 lots d'animaux, parmi les 16, feront l'objet de recherche de troubles comportementaux, cognitifs ou moteurs tous les 45 jours, de l'âge de 2 à 8 mois. Ces 4 lots correspondent aux souris mâles inoculées avec des agrégats d'alpha-synucléine agrégée pour l'ensemble des génotypes de l'étude (APPM83, APPPS1, M83 et B6C3H).

Enfin, l'ensemble des animaux des 4 génotypes, mâles et femelles, inoculés par une source contenant l'alpha-synucléine agrégée (versus une source contrôle contenant de l'alpha-synucléine non agrégée), feront l'objet de prélèvements après la mort pour l'étude de la neuropathologie à l'issue d'une perfusion intracardiaque après anesthésie pour les animaux destinés aux analyses immunohistochimiques ou d'une ponction intracardiaque suivie d'une injection intrapéritonéale d'une dose létale d'euthasol pour les animaux destinés aux analyses biochimiques. Ces travaux permettront ainsi d'évaluer et comparer les effets neuropathologiques de l'inoculation intra-striatale d'alpha-synucléine agrégée dans chacun des 4 génotypes étudiés.

18494 Le glioblastome, tumeur cérébrale gliale de grade élevé, a une incidence de 3 nouveaux cas par an pour 100 000 habitants avec une fréquence plus importante entre 45 et 70 ans. Conventionnellement, ces tumeurs sont traitées par la neurochirurgie puis par radiothérapie avec chimiothérapie. Malgré les bénéfices apportés par la radiothérapie qui reste le traitement de référence, la survie médiane des patients atteints de glioblastome est inférieure à un an, le plus souvent due à une récurrence à l'intérieur même du volume irradié. L'échec des traitements actuels impose donc de développer de nouvelles stratégies de thérapie comme la thérapie génique. Celle-ci, dont le premier traitement a été approuvé par les autorités européennes, est une stratégie thérapeutique consistant, entre autre, à transférer et faire exprimer un gène d'intérêt (appelé gène thérapeutique) dans une cellule afin de traiter une maladie. Ce principe requiert un contrôle fin de l'expression du transgène afin d'éviter l'apparition d'effets secondaires liés à une expression excessive de la protéine thérapeutique. Or les systèmes de régulation actuellement disponibles n'ont jamais pu être transférés vers une application clinique pour des raisons soit de toxicité liée à l'inducteur du transgène ou de difficulté à réguler finement son expression.

D'autre part, le domaine de l'oncologie voit depuis plusieurs années un essor important d'une nouvelle classe thérapeutique : l'immunothérapie anti-tumorale. En effet, il est maintenant clairement établi que le système immunitaire a un rôle important dans le contrôle du développement

d'une tumeur maligne, et les stratégies d'immunothérapie anti-tumorale ont ainsi pour but de stimuler l'action du système immunitaire et d'inhiber les mécanismes d'immunosuppression mis en place par la tumeur. Parmi ces stratégies, certaines sont dites adoptives », ou « cellulaires », et consistent à injecter au patient des cellules.

Un exemple de thérapie cellulaire est celui de l'allogreffe de Cellules Souches Hématopoïétiques (allo-CSH), qui est certes utilisé depuis plusieurs décennies, mais qui reste à ce jour le seul traitement curatif pour de nombreuses hémopathies malignes, en particulier pour les leucémies aiguës. Mais cette thérapie s'accompagne de complications telles que la réaction du greffon contre l'hôte (GvH, Graft versus Host disease) et les infections qui limitent les indications de stratégies curatives. Ces complications représentent une cause majeure de morbi-mortalité, de mauvaise qualité de vie et un surcoût économique, du fait notamment des thérapeutiques onéreuses pour les traiter et de la majoration du temps d'hospitalisation des patients. Certes toxique, la GvH est pourtant nécessaire car sa présence est associée à une meilleure efficacité anti-tumorale (effet GvL, Graft versus Leukemia). En effet, la GvH correspond schématiquement à la reconnaissance des cellules normales du receveur comme étant étrangères par les lymphocytes T du greffon, ce qui engendre une forte réponse inflammatoire et le recrutement de lymphocytes T cytotoxiques et ainsi des dommages tissulaires parfois sévères. Les recherches pour améliorer les résultats de l'allo-CSH se poursuivent, et le développement d'un système de régulation souple et facilement réversible qui permettrait de moduler l'activité de ces cellules immunitaires apparaît donc être d'intérêt majeur. En effet, un tel système pourrait permettre de mieux contrôler l'activité des cellules allogéniques après administration au malade, en majorant leur activation ou en limitant leur toxicité sans inhiber leur efficacité anti-tumorale.

L'équipe a récemment développé un système de régulation génique (appelé AARE-gène) qui permet de réguler l'expression d'un gène thérapeutique via la nutrition. L'utilisation de ce système afin de réguler l'expression d'un gène tueur de tumeurs a permis d'en valider l'efficacité sur des cellules de gliomes humains. Désormais ce projet consiste à étudier le potentiel de ce nouveau système sur (1) la souris Nude porteuse de xénogreffes tumorales (lignées de glioblastome humain), (2) sur un modèle de tumeur induite par un agent carcinogène hépatique, (3) dans des lymphocytes T (LT) humains transduits avec un vecteur lentiviral comprenant le transgène d'intérêt puis réinjectés à des souris immunodéficientes NSG (NOD-scid IL-2R γ null), tout ceci afin de valider notre système dans plusieurs types de cancer. Ce protocole vise à réaliser la preuve de concept sur modèle in vivo du système AARE-Gène et ainsi d'apporter un nouvel élément de régulation de l'expression génique en thérapie génique. Etant donné que l'efficacité du système AARE-Gène a été préalablement validée en cellules en culture, il n'existe pas à ce stade du projet, de solution alternative à l'expérimentation animale.

Ce projet sera réalisé selon la réglementation 2010/63/UE et selon la règle des 3rs (Réduction, Remplacement, Raffinement). Le nombre d'animaux (au total 336) utilisés pour démontrer l'intérêt d'utiliser le système AARE-Gène dans le domaine du cancer est calculé, pour chaque expérience, au minimum en fonction du test statistique retenu (Réduction). Pour chaque expérience, des points limites (perte de poids, consommation. . .) seront définis et des groupes "contrôle" adaptés au protocole seront constitués avec un nombre d'animaux suffisant statistiquement (Raffinement). Ces expériences vont permettre de valider des résultats déjà obtenus in vitro et sont nécessaires pour évaluer l'impact de différents régimes testés sur l'organisme entier (Remplacement).

18495 Les approches actuelles mises en œuvre pour mesurer les effets perturbateurs endocriniens de substances chimiques chez les poissons reposent sur le développement de biomarqueurs standards ciblant largement la fonction de reproduction. L'étude de ces biomarqueurs implique des analyses histopathologiques, biochimiques et moléculaires associées à des protocoles expérimentaux souvent lourds, menés en conditions de laboratoire ou en milieu naturel, rendant la réalisation technique et l'interprétation des résultats difficiles.

L'objectif de ce projet est de développer des outils moléculaires innovants et alternatifs aux biomarqueurs invasifs utilisés aujourd'hui pour la surveillance de l'état de santé du poisson soumis aux agents chimiques et biologiques de l'environnement. Il s'agit plus spécifiquement d'étudier si

les acides nucléiques libres et présents potentiellement dans diverses matrices éco-physiologiques des poissons (eau environnante, urine, mucus, sang) pourraient constituer des marqueurs de stress de ces organismes. Le prototype de perturbateur endocrinien ciblé dans ce projet est le tébuconazole. Ce fongicide, le plus utilisé en France pour la protection des cultures de céréales, présente peu d'impacts environnementaux. Cependant, de récentes études ont révélé un caractère perturbateur endocrinien, avec des effets reprotoxiques et immunotoxiques chez le poisson.

Lors d'une première étude d'expérimentation animale, 270 truites arc-en-ciel juvéniles seront exposées à deux concentrations de tébuconazole afin de mieux appréhender le risque écotoxicologique perturbateur endocrinien associé à ce pesticide, en utilisant à la fois les biomarqueurs traditionnels et les nouveaux outils moléculaires alternatifs. Lors d'une seconde étude, les capacités de défense de 900 truites juvéniles exposées au tébuconazole seront analysées après une infection expérimentale au virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse (vNHI). Le projet apportera ainsi des informations sur les réponses des marqueurs de perturbations endocriniennes dans le cas d'exposition de poissons à un double stress chimique et biologique. A noter que l'état sanitaire du lot de truites arc-en-ciel utilisé sera évalué en amont des expérimentations animales en réalisant un examen virologique et bactériologique sur 10 individus.

Ces études expérimentales seront menées dans le respect de la règle des 3R, à savoir la réduction du nombre d'animaux utilisés au seuil de la pertinence scientifique et statistique et le raffinement dans la gestion des lots de poissons. Les mesures de raffinement viseront à assurer des conditions optimales d'hébergement des animaux, à savoir, un volume d'eau adapté en circuit ouvert avec une oxygénation suffisante en fonction de la biomasse, un rythme jour/nuit naturel, la présence de suffisamment de congénères pour exprimer un répertoire comportemental riche, une alimentation adaptée à leur stade de développement. Le remplacement n'est, en revanche, pas envisageable, car la nécessité de reproduire expérimentalement la contamination chimique et l'infection virale chez la truite, une espèce-modèle en écotoxicologie, permettra in fine de développer et valider une méthode alternative pour réaliser ce type de travaux.

18496 De nombreuses études se sont intéressées à l'impact clinique de la carence martiale sans anémie et il est maintenant communément admis que celle-ci est associée à une fatigue plus importante, à une diminution des performances musculaires et même à une mortalité plus importante à 1 an de la sortie de réanimation par rapport aux patients non carencés.

Le fer est un élément minéral indispensable au transport de l'oxygène par l'intermédiaire de l'hémoglobine, mais il est également impliqué dans le métabolisme cellulaire notamment par son rôle dans la chaîne respiratoire mitochondriale, dans le cycle de Krebs et est indispensable aux mécanismes de défenses immunitaires de l'organisme.

Cependant, si le fer est indispensable à la vie humaine, il l'est également pour les organismes pathogènes en particulier pour la réplication de l'ADN, la transcription, le métabolisme et la respiration cellulaire.

Notre objectif est de créer un modèle de souris carencées en fer mais non anémiées avec un sepsis afin d'étudier leur réponse inflammatoire, leurs fonctions immunitaires, leur mortalité ainsi que la croissance bactérienne selon qu'elles reçoivent, ou non, une supplémentation martiale.

Les souris utilisées sont issues d'une souche C57BL/6J, ce sont des mâles et des femelles âgés de 8 semaines. Elles seront séparées en un groupe « carence martiale » qui aura une saignée par ponction rétro-orbitaire puis recevra une alimentation pauvre en fer et un groupe « non carencé » recevant une alimentation normale. Chacun de ces groupes sera divisé en deux avec un groupe supplémenté en carboxymaltose ferrique et l'autre non ; ces quatre groupes auront une instillation bactérienne intranasale. Il y aura également un groupe « contrôle » constitué de souris non infectées, non carencées et non supplémentées. Soixante-dix souris seront utilisées pour la réalisation des différentes étapes du protocole. Dans l'éventualité où cela ne serait pas suffisant pour montrer une différence entre les groupes, nous prévoyons une deuxième série de 70 animaux pour refaire le même protocole. Au maximum, 140 animaux seront nécessaires.

Les résultats de cette étude pourront permettre de mieux comprendre le métabolisme du fer en contexte infectieux et surtout l'impact d'une supplémentation martiale chez des individus ayant un sepsis. Si les résultats obtenus sont en faveur d'une amélioration de la défense de l'organisme contre les pathogènes chez les individus carencés et supplémentés, cette étude pourra déboucher sur des projets de recherche clinique afin d'étudier l'impact de l'administration du fer chez l'homme en contexte septique.

Tout a été fait pour respecter au maximum la règle des 3R dans ce projet.

1) Remplacer. Nous ne pouvons nous affranchir de l'utilisation d'animaux pour ce projet qui a comme objectif d'évaluer le retentissement de la carence martiale indépendamment de l'anémie sur un organisme luttant contre une infection. Il nécessite donc d'obtenir un modèle de carence martiale sans anémie aisément reproductible et comparable à la carence martiale sans anémie observée chez l'homme. Un animal est nécessaire pour obtenir ce modèle et la souris est un bon animal pour obtenir aisément ce modèle et réaliser des prélèvements biologiques. Les procédures expérimentales à réaliser dans notre projet ne peuvent pas être réalisées sans l'utilisation d'animaux vivants puisqu'elles font appel à des prélèvements biologiques et des biopsies d'organes.

2) Réduire. Le nombre d'animaux qui sera utilisé dans le projet sera le plus faible possible. En effet, nous avons prévu une première série de 70 animaux. Si les différentes analyses permettent de mettre en évidence une différence significative entre les différents groupes sur les critères de mortalité, de fonctions immunitaires et/ou de croissance bactérienne, nous n'utiliserons pas les 70 animaux suivants. Par ailleurs, de nombreuses analyses biologiques et histologiques seront effectuées sur les animaux afin de recueillir un maximum d'informations et de ne pas avoir à répéter le même type d'expérimentation pour récupérer les données manquantes.

3) Raffiner. Les souris auront libre-accès à l'eau et à une alimentation adaptée. Tout sera fait pour que les animaux souffrent le moins possible. Toutes les cages seront munies d'une cachette et leur milieu sera enrichi par une boîte d'œufs. Une grille d'évaluation pour la surveillance des points limites a été établie. La ponction rétro-orbitaire et l'instillation intranasale seront réalisées sous anesthésie générale par isoflurane 2%, la mise à mort des animaux se fera sous anesthésie générale par isoflurane 5% associée à une analgésie par Buprénorphine 0,1 mg/kg par voie sous-cutanée, en dehors des locaux d'hébergement. Les animaux anesthésiés seront surveillés étroitement à l'aide de leur fréquence respiratoire, de leur mécanique ventilatoire, la température sera monitorée et ils seront réchauffés à l'aide d'un tapis chauffant puis dans une enceinte chauffée pendant une à deux heures, jusqu'à leur récupération totale. Les règles de sécurité microbiologiques relatives à un agent du groupe 2 (*Staphylococcus aureus*) seront respectées avec notamment une instillation intranasale sous hotte.

Les comparaisons entre les groupes seront réalisées au moyen de tests non paramétriques (Wilcoxon-Mann-Whitney pour les variables quantitatives et Chi² ou test exact de Fisher pour les variables qualitatives).

18497 L'hémophilie A est une maladie hémorragique rare affectant principalement les hommes (1 naissance de garçons sur 5000 environ). Il s'agit d'une maladie génétique et le gène affecté est celui du facteur VIII (FVIII), une protéine clé de la cascade de la coagulation. Il existe plusieurs types d'hémophilie A (mineure, modérée et sévère) en fonction du taux résiduel du facteur VIII circulant. On parle d'hémophilie sévère lorsque le FVIII est totalement absent, d'hémophilie modérée lorsque le taux de FVIII est situé entre 1% et 5% de la normale et d'hémophilie mineure lorsque le taux de FVIII est situé entre 5% et 40% de la normale. En France, il existe environ 7500 patients hémophiles dont 40% d'hémophiles sévères et 60% d'hémophiles modérés/mineurs. Il s'agit de la plus fréquente des maladies hémorragiques graves. Sans traitement, l'espérance de vie est en moyenne de 15 ans pour un hémophile sévère. En ce qui concerne l'hémophilie sévère, un certain nombre de modèles animaux ont été développés et de ce fait, de nombreuses études ont été réalisées au cours de 20 dernières années. Par contre l'hémophilie mineure/modérée est beaucoup moins bien comprise. Même si les saignements spontanés sont rares, les patients ont une qualité de vie altérée et développent au fil du temps des atteintes articulaires importantes, potentiellement invalidantes. De plus, les femmes traditionnellement considérées comme « porteuses saines » de l'hémophilie

sont de plus en plus prises en compte car elles sont également sujettes à des épisodes hémorragiques et sont désormais considérées comme souffrant également d'hémophilie, même s'il s'agit des formes mineures/modérées.

Le but de notre projet consiste à mieux comprendre le phénotype hémostatique d'un modèle murin exprimant entre 5% et 10% de FVIII, donc à la limite entre hémophilie mineure et modérée, et d'utiliser ce modèle afin de tester des traitements innovants actuellement réservé à l'hémophilie sévère.

Pour ce projet d'une durée de 5 ans, nous prévoyons d'utiliser au maximum 464 souris. Les expériences sont planifiées en accord avec la règle des 3R :

Remplacement : Seule une approche expérimentale in vivo permet de rendre compte de la complexité des systèmes biologiques. Toutefois, toute information obtenue par l'expérimentation animale sera immédiatement transposée à des systèmes in vitro pour analyses ultérieures.

Réduction : Le nombre de répétition des expériences sera défini de manière rationnelle : si une expérience donne des résultats statistiquement significatifs avec une puissance appropriée, elle ne sera pas répétée, sinon elle sera répétée une à deux fois maximum. Les organes, sérum et cellules des souris sacrifiées en fin d'expérience sont conservés; ainsi, aucune expérience supplémentaire ne doit-elle être faite si des questions nouvelles surviennent.

Raffinement : les souris seront hébergées en accord avec les lois d'éthique françaises. Les animaux seront contrôlés quotidiennement pour évaluer et réduire au maximum tout risque de douleur. Les gestes susceptibles d'entraîner une douleur seront réalisés sous anesthésie. Les animaux malades seront soignés ou euthanasiés. Les conditions de vie seront améliorées au maximum (5 souris maximum par cage, ajout de nids végétaux et de tunnels en carton).

18498 Les progrès récents de l'imagerie médicale ont permis l'identification d'un grand nombre de malformations du cortex cérébral chez des patients souffrant de retard mental et/ou d'épilepsie. Cette dernière représente environ 40% des épilepsies pharmaco-résistantes chez l'enfant. Parmi ces malformations cérébrales, l'Hétérotopie Nodulaire Périventriculaire (HNP) se caractérisent, à l'IRM, par la présence de nodules de neurones ectopiques positionnés le long de la paroi des ventricules latéraux et sont fréquemment découvertes à l'âge adulte. Sur le plan clinique, les HNP s'associent à une épilepsie et une atteinte cognitive d'intensité variable, le niveau intellectuel peut effectivement varier de normal à un déficit sévère. De nombreux gènes sont déjà connus comme pouvant provoquer ces HNP. Néanmoins, le rôle précis de ces gènes dans le développement cérébral et les conséquences fonctionnelles et pathologiques de leur dysfonctionnement restent méconnus. Cela nécessite des études plus approfondies et notamment chez la souris et le rat qui présentent un développement et une organisation cérébrale similaire à la nôtre.

Pour nos études, nous reproduirons cette altération cérébrale humaine chez ces deux modèles animaux en utilisant la technique d'électroporation in utero. Ensuite, en comparant le phénotype de nos modèles avec celui observé chez les patients nous espérons établir des corrélations entre la mutation génétique et le phénotype observé. Nous espérons que ces études pourront faire émerger un tableau clinique, lié à des altérations de ces gènes et améliorer le diagnostic de ces pathologies chez d'autres enfants. D'autre part, bien que le lien entre la malformation et l'épilepsie ait été bien établi, les mécanismes responsables restent obscurs. Il est notamment difficile de savoir si les foyers épileptiques impliquent les neurones mal placés, le cortex sain ou les deux. Nous envisageons donc d'analyser les propriétés morphologiques et fonctionnelles des neurones mal placés en les comparant à ceux présents dans le cortex adjacent. Nous évaluerons également l'apparition de crises spontanées sur nos animaux à l'âge adulte en réalisant des enregistrements électrocorticographiques (EEG).

En résumé, il est essentiel de mieux comprendre les mécanismes à l'origine de l'épilepsie et/ou du déficit cognitif afin de suggérer de nouvelles approches thérapeutiques ayant pour but d'améliorer les conditions de vie des patients épileptiques. Il relève donc par essence d'un manque profond de connaissances sur le sujet, et ne peut pas être remplacé (1) par des approches alternatives, in silico

par exemple. Ce projet de recherche s'inscrit dans les principes de réduction (2) et de raffinement (3) des règles éthiques sur l'expérimentation animale.

(2) Notre projet de recherche s'effectue en étapes successives, dont les résultats conditionnent au fur et à mesure la poursuite du projet, ce qui nous permettra de n'utiliser qu'un minimum de groupes de souris ou de rat.

(3) Les animaux sont hébergés dans une animalerie conventionnelle, dans des cages avec environnement enrichi et au nombre limite d'animaux par cage respecté, avec accès à l'eau et à la nourriture ad libitum, dans des pièces thermo-contrôlées et au cycle jour/nuit en 12h/12h. Les animaux seront suivis de près pour guetter l'apparition éventuelle de signes et paramètres cliniques, comportementaux ou biologiques indiquant leur souffrance. Dès qu'un signe sera observé, l'animal sera pris en charge immédiatement et tout sera mis en œuvre pour réduire la douleur notamment par l'utilisation d'analgésique. Cependant, si les indicateurs comportementaux de douleur persistent ou s'ils sont trop prononcés, le protocole expérimental sera arrêté. Dans ce projet, nous utiliserons un total de 1923 animaux dont 1412 souris et 511 rats sur une durée de 5 ans.

18499 L'apron du Rhône, en danger critique d'extinction au niveau mondial, n'est plus actuellement présent que sur 16,6% de son aire de répartition observée jusqu'au début du XXe siècle. De par son statut fragile, l'espèce a bénéficié d'un plan national d'action (PNA) entre 2012-2016. Le bilan du plan a soulevé un manque d'informations sur l'utilité de certaines mesures de restauration, notamment sur l'efficacité des passes-à-poissons. Une nouvelle action a été acceptée au deuxième PNA (2020-2030), elle vise à étudier les déplacements de l'espèce par la télémétrie. Parmi les techniques disponibles, la RFID (radio frequency identification) présente le plus d'avantages. Elle permet la reconnaissance individuelle des poissons par de petites marques (12 mm) à durée de vie illimitée. Déjà utilisée dans de nombreuses études, elle présente a priori peu de risque pour les petits poissons et ce marquage a déjà été utilisé sur des aprons d'une taille supérieure à 100 mm. Toutefois, l'étude proposée dans le second PNA prévoit de suivre les aprons dès leur stade juvénile. Compte tenu de leur fragilité, il demeure indispensable de tester l'effet de ce type de marquage sur les jeunes aprons. L'étude in situ des populations sauvages ne sera possible que si l'innocuité du marquage est avérée.

L'objectif de ce projet est d'étudier l'impact du marquage RFID sur l'apron, et l'usage d'animaux y est nécessaire (R-remplacement). Pour ne pas peser davantage sur l'état fragile des populations, des tests de marquage seront réalisés sur des aprons d'élevages, de tailles entre 70 et 100 mm. Un lot test (poissons marqués et manipulés) et un lot contrôle (uniquement manipulés) seront constitués, chacun de 99 individus. 10 individus en plus seront nécessaires pour réaliser les pré-tests comportementaux pour valider/ajuster le procédé. Douze autres individus seront gardés en stabulation (mais non manipulés) pour remplacer les éventuelles pertes avant l'expérimentation. Au total, 220 poissons sont donc nécessaires (99+99+10+12) pour les besoins de l'étude. Ce nombre, réduit au minimum (R-réduction), reste suffisant pour détecter (avec un risque d'erreur minimal) une faible mortalité induite par le marquage. Tous les aprons seront mesurés, pesés sous anesthésie (R-raffinement) et seulement le lot test sera marqué. L'implantation de la marque se fera dans la cavité abdominale via une incision chirurgicale ventrale (2-3 mm). Les poissons seront hébergés, sous surveillance quotidienne, dans des bacs à faible courant, agrémentés de substrat (galets, tubes PVC) pour créer des refuges (R-raffinement). La survie et la croissance seront suivies au cours des 60 jours après le marquage. Des tests complémentaires seront conduits ensuite pour vérifier si le port de la marque n'influence pas l'activité des poissons ni leur capacité de fuite devant prédateurs. Les déplacements (spontanés ou et réactions de fuite) seront enregistrés et comparés entre les individus marqués et non-marqués. La réaction de fuite sera provoquée par des stimuli sans danger pour le poisson et le test sera limité au maximum à 3 tentatives par individus testé. A la fin de l'expérimentation, les animaux seront anesthésiés puis euthanasiés par surdose d'anesthésique (le repeuplement du milieu naturel étant suspendu).

18500 Le cancer est la seconde cause de décès dans le monde, comptant pour 10 millions de morts en 2020. Le cancer est défini par une prolifération cellulaire incontrôlée, et peut apparaître dans une

variété d'organes. Cette prolifération anarchique est due à l'accumulation de mutations génétiques intervenant dans le contrôle du cycle cellulaire. Malgré les différentes origines des cellules cancéreuses, celles-ci partagent certaines caractéristiques communes. L'une de ces caractéristiques est leur capacité à échapper au système immunitaire.

Aujourd'hui plusieurs thérapies anti-cancéreuses existent : la chimiothérapie, la radiothérapie mais aussi plus récemment, les immunothérapies. Cette dernière est constituée d'un large spectre de nouvelles thérapies se concentrant sur le renforcement du système immunitaire contre le cancer. Cependant, il existe chez certains patients une résistance aux immunothérapies. Cette résistance résulte de plusieurs caractéristiques comme le manque d'antigènes présentées par les cellules cancéreuses chez ces patients.

Le système immunitaire est capable de protéger quotidiennement notre organisme en surveillant, puis en éradiquant les cellules non-saines. Les cellules immunitaires sont capables de distinguer une cellule saine, dite du « soi », d'un organisme pathogène dit du « non soi ». Cette différenciation se produit grâce à des petites protéines, appelées « antigènes », exprimées à la surface de chaque cellule. Les cellules saines qui deviennent cancéreuses expriment des antigènes spécifiques provenant de l'accumulation de mutations génétiques.

Dans cette étude, nous utiliserons les propriétés biologiques de petites molécules ayant la capacité de favoriser l'expression d'antigènes spécifiquement sur les cellules tumorales. Notre stratégie thérapeutique est donc de favoriser l'expression d'antigènes au sein de la tumeur lors de son développement facilitant sa reconnaissance par le système immunitaire et donc, sa régression et/ou son élimination. Cette réactivation du système immunitaire à l'aide de nos molécules pourrait aussi être combinée avec des immunothérapies déjà existantes afin de lever la résistance chez les patients concernés.

Pour évaluer les effets de nos molécules stimulant la présentation antigénique dans les cellules cancéreuses, ce projet nécessite des procédures expérimentales utilisant des animaux vivants, ici la souris. L'utilisation d'animaux vivants est indispensable car seul un animal vivant, entier, peut permettre d'étudier dans leur globalité, les différentes cellules immunitaires intervenant dans la réponse au traitement, mais aussi la combinaison entre les immunothérapies avec nos molécules sur la réponse anti-cancéreuse dans un environnement tumoral représentatif, avec toutes les interactions nécessaires, impossibles à reproduire *in vitro* ou *ex vivo*.

Après plusieurs tests *in vitro*, nous avons isolé plusieurs molécules candidates qui favorisent fortement l'expression antigénique et ce, sur plusieurs lignées de cellules murines à l'origine du sarcome (6 molécules), du mélanome (4 molécules) ainsi que du carcinome pulmonaire bronchique non à petites cellules (6 molécules). Chez l'Homme, le traitement de première intention reste la résection chirurgicale. Les récurrences sont possibles et les traitements par immunothérapie montrent pour l'instant une efficacité partielle. Ces molécules seront donc testées chez la souris afin d'évaluer les meilleures candidates d'un point de vue de la régression tumorale observable lorsqu'elles se développent en sous-cutané. Afin de pouvoir être largement utilisées en thérapeutique, nos molécules d'intérêt seront testées sur plusieurs types de cellules cancéreuses résistantes aux thérapies actuelles à l'origine des cancers cités précédemment.

Le projet nécessitera 7296 souris. Ce nombre important d'animaux se justifie par les différentes molécules, combinaisons thérapeutiques et les différents types cancers testés. Cependant, les molécules qui ne présentent pas d'effet thérapeutique (régression tumorale) lors de la première procédure d'évaluation ne seront pas conservées pour la suite. En ce sens, le nombre d'animaux mentionné est le nombre maximal utilisé dans le cas où toutes les molécules présenteraient un effet anti-tumoral significatif impliquant la présentation de nouveaux antigènes spécifiques aux tumeurs. Les procédures expérimentales respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement. Les molécules candidates appartenant à une même famille pourront être testées simultanément le cas échéant, lors des expérimentations afin d'être comparées entre elles en terme d'efficacité. Ceci limitera également le nombre de souris contrôles non traitées à un seul groupe par expérience pour une et/ou plusieurs molécules testées le cas échéant.

Les groupes seront constitués d'un minimum d'animaux assurant la fiabilité des résultats en termes de statistiques. Le nombre de prélèvements pré- et post-mortem seront optimisés afin d'étudier le plus grand nombre de paramètres possibles. Enfin, les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux, en ayant recours à l'anesthésie locale ou générale dépendant des gestes techniques.

La contrainte principale pour les animaux sera la taille des tumeurs. Cette contrainte sera limitée par un suivi très strict avec application de points limites, suivi des tailles de tumeurs par mesure physique (sous-cutanée) ou au moyen d'imagerie optique de luminescence (qui permet aussi un suivi longitudinal non invasif plus raffiné).

18501 Il existe différents types de cellules souches (CS) : les CS embryonnaires ou cellules ES, les CS induites expérimentalement ou cellules iPS et les CS adultes (CSA), également dénommées somatiques pour les différencier des cellules ES. Les CSA sont définies par leur propriété unique de s'auto-renouveler et de persister tout au long de la vie d'un individu, tout en étant capables de se différencier dans tous les types cellulaires d'un tissu donné ; elles assurent ainsi le renouvellement des cellules sénescents ou bien endommagées à la suite d'un stress. Les plus connues de ces CSA sont les CS hématopoïétiques résidant dans la moelle osseuse et générant la totalité des cellules sanguines. Mais il existe des CSA dans la plupart des épithéliums comme ceux de la peau, de la prostate, ou du sein. Du fait de leur capacité élevée de régénération, ces CSA offrent des perspectives thérapeutiques, ouvrant la voie à une nouvelle médecine dite régénérative. De plus, elles présentent aussi un énorme intérêt dans l'étude des cancers car il existe dans la majorité des cancers des cellules cancéreuses ayant des propriétés de CSA. Elles sont dénommées cellules souches cancéreuses (CSC) et elles jouent un rôle central dans le maintien de la tumeur, dans son pouvoir métastatique, et surtout dans la résistance aux traitements anticancéreux. Le projet présenté ici concerne l'isolement et la caractérisation des CSA du tissu mammaire et des CSC de tumeurs mammaires, en utilisant des souris transgéniques. En combinant différents modèles de souris transgéniques, notre objectif est de comprendre l'origine et la nature des CSA et des CSC de la glande mammaire. Etant donné que la caractéristique principale d'une CSA est de pouvoir générer après greffe un tissu complet et pour la CSC de générer une tumeur reproduisant l'hétérogénéité de la tumeur initiale, le projet décrit dans cette demande concerne ces études in vivo qui sont donc essentielles et incontournables à la démonstration de la nature de CS. Nous estimons l'implication de 264 souris par an, soit 1320 souris sur les 5 années du projet décrit dans cette demande. Il est à noter que ce projet est la suite d'un précédent projet qui avait été évalué et accepté pour l'isolement de CSA de la prostate. Nous profitons donc de cette expérience pour évaluer au mieux les besoins de cette nouvelle étude. Tout a été fait dans ce projet pour satisfaire au mieux à la règle des 3R : Réduction : le nombre d'animaux a été estimé au plus juste en se basant sur l'expertise de l'investigateur principal, et en utilisant des modèles animaux déjà décrits dans la littérature, ce qui permet d'estimer au plus juste le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir les résultats attendus. Raffinement : ce projet sera conduit dans des conditions d'élevage optimales : en animalerie SOPF, en portoirs ventilés, enrichissement de l'environnement des souris, suivi sanitaire permanent par les responsables de l'animalerie ; de plus, dans le cas de phénotype dommageable c'est à dire de développement de tumeurs mammaires, nous pouvons suivre la progression tumorale par palpation et examen visuelle des mamelles des souris. Nous connaissons l'âge d'apparition des tumeurs dans ces modèles, et son évolution au cours du temps ; nous améliorerons le suivi des animaux pour décider l'interruption de l'expérience en cas de suspicion de souffrance de l'animal. Malheureusement, dans le cas précis des cellules souches, il n'est pas possible de Remplacer ces modèles animaux. La souris est le modèle de référence pour étudier les cellules souches normales ou cancéreuses de la glande mammaire ; mais un point important est que l'utilisation ici de souris transgéniques déjà étudiées par nous et la communauté scientifique permet une optimisation des deux autres « R » et permet une meilleure approche expérimentale. L'objectif final de ce projet est de caractériser au niveau moléculaire ces CSA et CSC, ce qui permettra une meilleure connaissance des voies de signalisation et des marqueurs qui leur sont

spécifiques, dévoilant ainsi des cibles potentielles pour des traitements plus efficaces du cancer du sein.

18502 Notre laboratoire s'intéresse au mécanisme d'action d'une hormone, qui joue un rôle majeur dans l'équilibre de la balance hydrosodée. A travers l'analyse de son récepteur, nous souhaitons étudier son implication en physiologie et en physiopathologie endocrinienne chez l'homme. Une altération de la fonction de ce récepteur peut induire le développement de maladies cardiovasculaires, rénales ou métaboliques. Des molécules antagonistes, bloquant son action, améliorent la fonction cardiaque des patients, certains troubles métaboliques, la fibrose rénale et ont aussi un impact sur le système nerveux central (mémorisation, processus cognitifs, régulation du stress et de l'humeur). Les mécanismes impliqués dans le contrôle de l'expression de ce récepteur sont mal connus. Récemment, nous avons montré dans un modèle de cellules rénales que les variations de tonicité, qui sont observées dans le néphron, modulent l'expression de ce récepteur puisque l'hypertonie réprime son expression alors que l'hypotonie l'augmente. Ces modulations de l'expression de ce récepteur peuvent avoir un retentissement majeur sur l'équilibre de la balance hydrosodée. Nous avons aussi identifié de nouveaux régulateurs de l'expression de ce récepteur, dont l'expression est elle-même induite par l'hypertonie. Nous souhaitons à présent étudier l'expression de ces régulateurs in vivo chez la souris en injectant du furosémide, un diurétique utilisé en clinique, qui permet d'augmenter l'hypertonie luminale dans le néphron distal. Les souris traitées et les souris contrôles seront placées dans des cages à diurèse pendant 4 heures afin de récupérer les urines et sans accès à l'eau de boisson. Nous quantifierons l'expression de ces régulateurs dans les urines récoltées car ces derniers peuvent agir de façon paracrine ou endocrine sur des cellules cibles à distance. Les souris seront ensuite sacrifiées et les deux reins seront prélevés afin d'analyser l'expression de ces régulateurs et leur impact sur l'expression de ce récepteur.

Les modèles cellulaires ne permettent pas de récapituler le fonctionnement des organes rendant indispensable l'utilisation de l'animal pour mieux comprendre le rôle de ce récepteur en physiologie et en physiopathologie endocrinienne. Par ailleurs, la physiologie générale chez le rongeur est suffisamment proche de celle de l'être humain pour que les informations obtenues soient pertinentes d'un point de vue médical. Afin de respecter la règle des 3R, nous avons préalablement rédigé et optimisé les protocoles, dont les objectifs sont clairs et les procédures suffisamment détaillées, et qui réduisent les répétitions inutiles en limitant nos expériences à l'étude des mécanismes ayant déjà montré leur efficacité dans le modèle cellulaire rénal afin d'avoir de fortes chances de fournir des résultats concluants avec une réduction au maximum du nombre d'animaux utilisés. Des tests de puissance statistique ont été utilisés pour calculer le plus petit nombre d'animaux nécessaires à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Nous utiliserons au total un maximum de 16 souris sur 6 mois. Enfin, dans un souci de raffinement des procédures, un soin particulier sera apporté aux questions relatives au bien-être animal : les conditions d'élevage et d'hébergement seront appropriées pour réduire la douleur, la souffrance, l'angoisse ou des dommages durables que pourraient ressentir les animaux (période d'acclimatation de 7 jours, cages adaptées à l'animal et à sa taille en maintenant les animaux par 8 dans chaque cage, et par enrichissement du milieu par copeaux de bois/tunnel en carton et cabanes). Enfin, les animaux seront observés quotidiennement par les membres qualifiés de l'animalerie et le responsable du projet.

Notre projet vise à apporter des nouvelles informations sur la signalisation relayée par ce récepteur qui participe au contrôle de l'équilibre de la balance hydrosodée. Il devrait faciliter le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques dans la prise en charge des maladies endocriniennes, des maladies cardiovasculaires (hypertension), des désordres métaboliques, et d'autres pathologies hormono-dépendantes.

18503 La mémoire procédurale, la mémoire des habitudes motrices, se crée avec la répétition d'un comportement. Les ganglions de la base constituent la base neuronale de cette forme de mémoire. En harmonie avec le cortex cérébral, leur rôle est d'extraire les informations pertinentes de l'environnement pour mettre en place un comportement adapté. Le but du présent projet est de

caractériser les propriétés (composition, activité globale, plasticité) des réseaux neuronaux substrats de la mémoire procédurale et de comprendre comment ces propriétés sont modifiées lors de l'apprentissage. Les ganglions de la base sont fortement affectés dans le cadre de la maladie de Huntington. Ce projet vise également à caractériser les anomalies au niveau de la composition et l'activité des réseaux neuronaux lors des phases pré-symptomatiques de la maladie de Huntington. Cette maladie neurodégénérative héréditaire est caractérisée par des désordres moteurs apparaissant progressivement (chorée), un déclin cognitif et des troubles psychiatriques. Les patients meurent habituellement 15-20 ans après l'apparition des premiers symptômes et il n'y a aujourd'hui aucun traitement efficace pour prévenir ou retarder la progression de cette maladie. En France, 12. 000 patients sont touchés et environ 6. 000 personnes développeront la maladie dans les 20 prochaines années. Ce projet permettra de caractériser d'éventuels dysfonctionnements dans les réseaux neuronaux dans les phases pré-symptomatiques de la maladie et pourrait donc aider à développer des stratégies thérapeutiques plus précoces.

L'utilisation de vecteurs viraux permettant de cibler spécifiquement une structure d'intérêt et des populations neuronales spécifiques constitue une approche unique pour disséquer la composition et la dynamique des réseaux neuronaux. La souris apparaît comme le modèle de choix pour ce projet compte-tenu de la similarité de l'organisation anatomo-fonctionnelle de son cerveau avec celle de l'homme et de l'existence chez cette espèce des outils de transgénèse nécessaires. Le nombre total d'animaux prévu pour cette étude (2 procédures expérimentales) est de 736. Ce nombre a été déterminé de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées. Notamment, dès que possible, l'animal sera utilisé comme son propre contrôle afin de diminuer le nombre de groupes expérimentaux nécessaires. Ce projet implique de la neurochirurgie et certaines tâches comportementales correspondant à un niveau de douleur de classe modérée. La chirurgie sera effectuée sous anesthésie générale avec une prise en charge antalgique adéquate. Les animaux seront groupés par 2 ou 3 par cage après l'opération, dans un milieu enrichi. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de bien-être. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée si des signes de souffrance apparaissent.

Le projet traitant du fonctionnement des réseaux neuronaux et nécessitant des approches intégrées et comportementales, il nous est impossible de remplacer le modèle animal vivant par des cultures cellulaires ou des simulations informatiques.

18504 Le mélanome est un cancer qui se développe initialement au niveau de la peau (mélanome cutané) ou de l'œil (mélanome uvéal). Des cellules du système immunitaire empêchent la tumeur primaire de se développer. A un stade plus avancé de la maladie, d'autres cellules immunitaires favorisent la migration de cellules tumorales vers d'autres sites et donc le développement de métastases. Parmi les cellules immunitaires qui infiltreront les mélanomes, les lymphocytes B (LB), dits B1 et B2, exercent un rôle encore controversé. Des résultats obtenus dans un modèle murin de mélanome de l'œil montrent qu'à un stade précoce de la maladie, la tumeur primaire est majoritairement infiltrée par des lymphocytes B2, alors que les lymphocytes B1 sont plus nombreux au niveau de la tumeur primaire à un stade tardif de la maladie.

Ce projet vise à étudier l'impact de ces deux populations de LB sur la réponse immunitaire et la progression tumorale. L'objectif est d'évaluer si les lymphocytes B2 retardent le développement tumoral et si au contraire les lymphocytes B1 contribuent à l'agressivité tumorale chez des souris développant spontanément un mélanome de l'œil à l'âge de 3 semaines qui métastase rapidement, mais aussi dans un modèle de mélanome induit par des transplantations de cellules de mélanome. Les souris seront soumises à un traitement qui élimine les lymphocytes B2 ou les lymphocytes B1. Des transferts de ces LB permettront de confirmer leur importance respective dans la progression du mélanome. Cette étude ne peut être atteinte par des techniques de « remplacement » in vitro.

L'utilisation d'animaux est justifiée par la complexité de la réponse immunitaire au niveau de la tumeur et des organes lymphoïdes secondaires des vertébrés qui ne peut être reproduite par des

méthodes alternatives. Nous souhaitons également évaluer l'impact de ces deux populations lymphocytaires B sur le développement de la tumeur primaire et des métastases.

Ce projet nécessitera l'utilisation de souris génétiquement modifiées ou déficientes en lymphocytes B. Seul le phénotype des souris développant spontanément un mélanome est dommageable. Bien que la maladie progresse avec une cinétique différente d'une souris à l'autre dans ce modèle, les données bibliographiques permettent de réduire au maximum le nombre de souris nécessaires pour l'étude et ainsi de respecter le principe des 3R.

En terme de « réduction », des lots d'animaux les plus restreints possibles mais suffisants seront utilisés pour obtenir des données statistiques fiables. Chaque souris, mâles ou femelles, développant spontanément un mélanome sera suivie quotidiennement et mise à mort à 12 semaines pour une analyse post-mortem des cellules infiltrant la tumeur primaire et les métastases. La tumeur des souris transplantées avec les cellules de mélanome B16 sera aussi mesurée 3 fois par semaine.

Les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum. Le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification et de maisons. En terme de "raffinement", nous nous efforcerons à chaque instant de garantir le bien-être des animaux grâce à une surveillance attentive et des soins adaptés. L'administration d'antalgiques et anesthésiques est notamment prévue pour l'une des procédures nécessitant une chirurgie. Des points limites ont été définis et permettront de mettre à mort l'animal de façon anticipée en cas de souffrance.

Ce projet permettra d'élucider les mécanismes d'action des lymphocytes B dans le contexte tumoral. Le nombre total de souris utilisées sera de 420 pour l'ensemble du projet qui se déroulera sur trois ans.

18505 L'axone est un prolongement des neurones qui transmet les signaux électriques à d'autres neurones localisés à distance dans le cerveau ou le reste du corps. Le positionnement correct des axones pendant le développement embryonnaire requiert un guidage complexe et précis ainsi qu'une source d'énergie. Un dysfonctionnement de ce processus conduit à plusieurs pathologies neurologiques dont, par exemple le syndrome L1.

Ce projet a pour objectif la validation sur un modèle souris des données obtenues par des approches cellulaires qui montrent que l'énergie générée dans l'extrémité de l'axone est nécessaire au guidage des axones. Pour cela nous allons modifier le processus de production d'énergie de façon généralisée et non-invasive en utilisant un régime alimentaire cétogène composé d'environ 80% de matière grasse pendant la moitié de la gestation. Nous allons également inhiber ce processus de façon très localisée par une technique de chirurgie sur l'embryon permettant de modifier génétiquement certains types de neurones. Les effets de ces changements seront évalués par des études anatomiques et histologiques et par l'analyse de la connectivité fonctionnelle du cerveau par une technique d'imagerie à ultrasons sur des animaux éveillés. La connectivité fonctionnelle repose sur l'évaluation des corrélations spatiales entre les variations spontanées du flux sanguin dans le cerveau. Elle permet de mettre en évidence des réseaux d'aires cérébrales connectées entre elles de manière fonctionnelle.

A l'heure actuelle, il n'existe pas de méthode de remplacement permettant de reproduire la complexité du cerveau en développement, ce qui rend l'utilisation d'un modèle animal indispensable à la réalisation de ce projet. La souris est un modèle très utilisé et bien connu pour l'étude du développement du cerveau car le génome est accessible pour des modifications génétiques. L'analyse de la connectivité sur animal éveillé n'a été mise au point à ce jour que chez la souris. Le nombre total de souris nécessaire à la réalisation de ce projet est de 722 pour une durée de 4 ans. Pour réduire le nombre d'animaux, nous avons estimé la taille des échantillons permettant une analyse statistique fiable des résultats grâce aux données collectées au cours d'expériences précédentes. Ce projet met en jeu deux procédures chirurgicales et une technique d'imagerie cérébrale à ultrasons et sera réalisé dans le respect de la règle des 3R. Pour éviter toute souffrance, les procédures de chirurgie se feront sous analgésie et anesthésie générale. Les séances d'imagerie seront réalisées sur animal vigile dont la tête sera immobilisée mais dont le mouvement

des pattes ne sera pas entravé ; des séances d'habituations seront effectuées au préalable pour limiter le stress. Les souris seront observées quotidiennement et tout signe de douleur, souffrance, angoisse ou stress sera soulagé avec des analgésiques. Une grille précise d'évaluation des points limites sera utilisée ; l'atteinte d'un des points limites entraînera la mise à mort des animaux.

À terme, les résultats de ces travaux aideront à mieux comprendre la mise en place des connections axonales dans le cerveau lors du développement embryonnaire.

Amendement 1: le nombre de souris a été changé de 722 à 922 pour inclure des tests de comportement.

18506 Les troubles de l'humeur (dépression, anxiété) sont un problème majeur de santé publique dont l'incidence augmente tout particulièrement en condition de stress chronique ou chez des patients atteints de maladies associées à une inflammation comme l'obésité. Ces derniers sont aussi plus souvent résistants aux traitements antidépresseurs classiques, ce qui aggrave d'autant plus la situation. Diverses données récentes suggèrent l'implication de processus inflammatoires dans le développement de symptômes dépressifs, ainsi que dans la résistance aux traitements antidépresseurs. Si cette implication est vérifiée, la possibilité de cibler l'inflammation pour améliorer la réponse aux traitements antidépresseurs constituerait une stratégie particulièrement pertinente pour mieux prendre en charge et traiter les troubles de l'humeur. Il apparaît donc important de caractériser plus spécifiquement les mécanismes contribuant à la résistance aux antidépresseurs et de vérifier en particulier le rôle de l'inflammation. Parmi les stratégies anti-inflammatoires possibles, les approches nutritionnelles sont particulièrement prometteuses, de par la capacité de certains nutriments à moduler le fonctionnement du système immunitaire. Dans ce contexte, le safran, dont les effets bénéfiques sur la santé et sur les troubles de l'humeur ont déjà été rapportés dans la littérature, constitue un candidat de premier ordre. Des études menées sur des modèles animaux de dépression ont également rapporté que des extraits de safran réduisent les changements comportementaux modélisant les symptômes de dépression et d'anxiété chez l'animal.

L'objectif de ce projet est double. Il s'agira tout d'abord d'identifier les mécanismes impliqués dans la résistance aux antidépresseurs dans deux modèles de souris chez lesquels des symptômes de dépression sont induits soit par l'exposition à une diète riche en lipides (modèle de dépression associée à une inflammation), soit par l'exposition à un stress chronique modéré (modèle de dépression non-inflammatoire). La comparaison de ces deux modèles permettra ainsi de vérifier si la présence d'une inflammation perturbe effectivement la réponse aux antidépresseurs. Nous pourrions alors évaluer l'impact de l'apport d'extraits de safran sur la réponse aux antidépresseurs. Pour cela, nous analyserons les effets d'un traitement antidépresseur et/ou des extraits de safran sur les comportements de types anxieux et dépressif dans ces deux modèles de dépression. Ces mesures comportementales s'accompagneront d'investigations biologiques au niveau sanguin et cérébral. Les résultats ainsi obtenus apporteront des données scientifiques très utiles pour une meilleure compréhension des mécanismes d'action des différents nutriments d'intérêt testés sur l'humeur.

Afin de déterminer la dose efficace d'antidépresseur et d'extraits de safran à utiliser chez la souris, ainsi que la voie d'administration optimale, une première étude sera réalisée dans laquelle nous comparerons les effets de différentes doses des produits testés, ainsi que ceux de plusieurs modes d'administration de safran. Nous aurons besoin pour cette étude de 156 animaux (13 groupes de 12 animaux), qui nous permettront de définir toutes les conditions expérimentales à utiliser par la suite dans l'ensemble de nos expériences. Nous aurons ensuite besoin de 22 groupes supplémentaires (de 14 animaux) pour les différentes études permettant de répondre aux objectifs de ce projet. Compte-tenu des différents groupes d'étude nécessaires et des contraintes expérimentales, nous aurons besoin de 464 souris (C57BL/6J) mâles au total. Ce calcul a été fait sur la base de 12 à 14 animaux par groupe, nombre minimal requis afin d'atteindre une puissance statistique suffisante. En effet, il existe une grande variabilité interindividuelle et les évaluations comportementales chez les animaux sont influencées par de nombreux paramètres ce qui nous impose d'avoir un nombre d'animaux nécessaire et suffisant pour garantir la robustesse de nos

résultats, tout en nous restreignant à des effectifs les plus faibles possibles (Réduire). S'agissant de la mesure d'effets comportementaux, nous ne pouvons remplacer les animaux par d'autres techniques. Cependant, lorsque l'objectif le permettra, des études seront faites en culture cellulaire afin d'éviter l'utilisation d'animaux supplémentaires (Remplacer). Nous prenons enfin en compte le bien-être des animaux via l'enrichissement des cages avec des carrés de coton, des igloos en carton et des bâtons de bois et via la stabulation en cages collectives dès que possible afin de réduire le stress des animaux. Afin de réduire au maximum la souffrance causée aux animaux, nous avons déterminé avec attention les points limites du projet nous permettant, le cas échéant, d'administrer un traitement de confort aux animaux afin de prendre en charge la douleur si nécessaire, ou d'euthanasier des animaux si les points limites sont dépassés et que leur état ne s'améliore pas (Raffiner ; cf détails dans la suite de la demande). Ainsi, nous respectons l'obligation réglementaire des 3 R : Réduire, Remplacer et Raffiner.

18507 Des diarrhées sont très souvent observées chez le jeune mammifère et en particulier chez les veaux l'élevage laitier, principalement de la naissance au sevrage. Elles représentent la seconde cause de mortalité des veaux, après la mortalité au vêlage. Ces diarrhées s'accompagnent souvent de retards de croissance qui peuvent être irréversibles, pénalisant ainsi le bon développement de l'animal et l'expression de son potentiel de production à l'âge adulte. Dans le contexte actuel de lutte contre l'antibiorésistance, des moyens de prévention permettant de diminuer le recours aux antibiotiques devraient émerger pour préserver la santé animale et humaine. A ce jour, la compréhension de la mise en place du microbiote digestif chez le jeune veau laitier et des facteurs pouvant la moduler constitue une voie d'identification de leviers pour prévenir l'apparition de ces diarrhées. Parmi les facteurs externes de modulation du microbiote digestif, on retrouve des facteurs alimentaires comme l'addition de levures vivantes (levure probiotique), de parois de levures. L'objectif de ce travail est d'étudier l'effet d'une supplémentation en parois de levure sur la mise en place du microbiote digestif et le statut immunitaire du veau laitier. Cette étude est réalisée dans une station expérimentale, où 26 veaux sont répartis en 2 lots : un lot témoin (sans apport de parois de levure) et un lot traité (recevant des parois de levure). Les animaux sont élevés dans des conditions d'élevage conventionnel dans des cases individuelles jusqu'à l'âge de 9 semaines (en accord avec la directive européenne 2008/119/CE). Les veaux sont suivis de la naissance au sevrage (9 semaines) et reçoivent une alimentation à base d'aliment d'allaitement, de foin et d'un aliment concentré riche en céréales et en protéagineux. Des prélèvements de contenu ruminal et de contenu fécal dédiés à l'analyse du microbiote digestif sont réalisés à 3, 15, 35, et 63 jours après la naissance. A ces mêmes dates, des analyses complémentaires sur les fèces sont réalisées afin d'estimer l'état des selles des veaux (mesure de la teneur en matière sèche) et d'identifier les pathogènes potentiellement présents (bactéries, virus et parasites). Des prises de sang sont réalisées à J3, J15, J35 et J63 afin de suivre le statut immunitaire de chaque veau. L'étude du microbiote digestif devrait permettre de comprendre l'action des parois de levure sur la mise en place du microbiote digestif et de trouver, à terme, des solutions nutritionnelles destinées aux jeunes veaux pour favoriser la mise en place d'un microbiote digestif induisant une plus grande résistance du jeune aux diarrhées. L'étude de la réponse de l'hôte à un apport de parois de levure dans son alimentation implique l'utilisation d'animaux. Aucune mise à mort n'est prévue dans cet essai. A la fin de l'essai, les veaux intégreront directement un élevage. Aucune souffrance n'est infligée aux veaux. Ils sont élevés dans des conditions d'élevage conventionnelles. Le nombre d'animaux prélevés est limité à 13 veaux par lot, permettant de mettre en évidence l'existence ou non d'une modulation du microbiote digestif par l'ajout de parois de levure à l'alimentation du jeune. Une observation générale biquotidienne du comportement des veaux ainsi que de leur consommation d'eau et d'aliments permettra de s'assurer du bon déroulement du projet.

18508 Le cadre général de ce projet s'inscrit dans l'évaluation des effets de nouvelles formulations nutritionnelles sur la performance sportive.

Plus spécifiquement, nous faisons l'hypothèse qu'une formulation nutritionnelle originale permettrait de retarder l'apparition de l'épuisement lors d'un effort d'endurance. Ce projet cible tous types de

sports d'endurance, individuel ou d'équipe, amateur ou professionnel. Les résultats pourraient être étendus aux stratégies nutritionnelles dans le cadre du traitement de l'obésité/surpoids.

Nous évaluerons chez des souris males C57Bl6j âgés de 2 mois l'effet de formulations nutritionnelles (de composition confidentielle) différentes pendant 5 semaines. Quatre groupes de 9 souris (soit 36 animaux) seront constitués : un groupe contrôle recevant une alimentation standard, un groupe recevant la formule A, un groupe la formule B, un groupe la formule C.

Les animaux seront soumis à un test d'endurance à la 5ème semaine. Les modifications métaboliques seront identifiées à l'issue du protocole par des dosages de marqueurs circulants et tissulaires des voies du métabolisme énergétique, musculaire et mitochondriale. Des marqueurs inflammatoires et du stress oxydant seront également recherchés.

Ce projet prendra en compte la règle des 3 Rs :

Remplacement : il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode de substitution in vitro pour étudier l'impact de formules nutritionnelles sur la performance sportive et musculaire.

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

Raffinement : les méthodes utilisées sont non invasives. Les animaux seront hébergés en cage de 3, et l'environnement sera enrichi par la présence d'un igloo en plastique et de matériel de nidification (bandelettes de papier kraft), avec une roue d'exercice. Les animaux seront manipulés régulièrement pour les habituer à notre contact et ainsi limiter leur stress. Enfin, une anesthésie locale sera réalisée lors des prélèvements sanguins.

18509 Le 17β estradiol, hormone stéroïde naturelle synthétisée par les ovaires, contrôle le développement, la différenciation et la fonction de la reproduction ainsi que le métabolisme et l'homéostasie de nombreux autres tissus. La diminution de la production du 17β estradiol par les ovaires à la ménopause entraîne souvent des symptômes climateriques (bouffées de chaleur et sueurs nocturnes, insomnie et instabilité de l'humeur) en raison de la baisse des œstrogènes dans le système nerveux central. La thérapie hormonale à la ménopause utilisant les oestrogènes est développée pour améliorer les symptômes des femmes ménopausées pour prévenir les symptômes climateriques, ainsi que le risque d'ostéoporose, de diabète et de maladies coronaires. Cependant, l'hormonothérapie peut augmenter 2 risques : celui de la thrombose veineuse et celui de cancer du sein. Cela souligne la nécessité d'une optimisation de l'hormonothérapie en conservant les principaux effets bénéfiques des œstrogènes et en minimisant les risques. Plusieurs options sont possibles pour améliorer ce traitement, allant de la voie d'administration alternative à l'utilisation de nouveaux œstrogènes.

La voie d'administration intranasale des œstrogènes pourrait permettre leur distribution préférentielle au système nerveux central, renforçant les actions souhaitées (prévention des bouffées de chaleur, de la prise de poids et des anomalies métaboliques), tout en diminuant l'exposition aux œstrogènes du foie et des cibles sexuelles et, partant, les risques de thrombose veineuse et cancer du sein. L'Estetrol, un stéroïde naturel synthétisé par le foie du fœtus, est un modulateur des récepteurs des oestrogènes et il est sans impact hépatique sur les facteurs de coagulation. L'Estetrol a une activité oestrogénique plus faible que le 17β estradiol. L'Estetrol mime plusieurs effets du 17β estradiol tels que l'inhibition de l'ovulation (contraception) ou la prévention des bouffées de chaleur (ménopause) (phases cliniques 3 et 2). L'Estetrol n'augmente pas les facteurs de coagulation hépatiques circulants. L'Estetrol pourrait représenter un avantage, en particulier concernant les effets sur le foie.

Le projet s'inscrit dans le cadre de développement de nouvelles stratégies pour le traitement hormonal substitutif de la ménopause et la neuroprotection. Des souris C57Bl6 femelles adultes ovariectomisées seront utilisées. L'ovariectomie éliminera la principale source d'œstrogènes endogènes, et permettra d'étudier les effets des doses des oestrogènes exogènes administrées. Différentes doses de 17β -oestradiol ou d'Estetrol seront testées. Les taux des œstrogènes dans le cerveau, le plasma et le foie seront déterminés et l'activité transcriptionnelle associée aux taux d'œstrogènes induits par le traitement sera évaluée. Les données montreront les activités centrales

et périphériques des différentes doses de 17 β -oestradiol et d'Estetrol administrées par voie intranasale en comparaison à la voie sous cutanée. Une étude cinétique avec la dose efficace sera réalisée afin de déterminer la durée pendant laquelle 17 β -oestradiol et d'Estetrol administrés par voie intranasale restent dans le tissu cérébral et dans la périphérie (plasma et foie) à des niveaux significatifs. Les voies extracellulaires et intracellulaires et les cibles des œstrogènes dans le cerveau à différents temps après son administration intranasale seront étudiées par immunofluorescence.

La règle des 3 R: 1) Remplacer, 2) Réduire et 3) Raffiner sera appliquée le long de ce programme.

1) Cette étude d'optimisation d'administration des œstrogènes nécessite des expériences in vivo, utilisant des animaux et ne peut être faite in vitro ou in silico. L'utilisation des animaux permettra de trouver la dose optimale, les taux atteints dans le plasma, cerveau et foie et les voies de pénétration dans le cerveau

2) Le nombre d'animaux par point expérimental est réduit au minimum (8 par groupe), de façon à mettre en évidence des différences statistiques avec un risque d'erreur moins que 5%. Nous utiliserons 392 souris C57Bl6 en 5 ans. C'est un nombre moyen de souris qui est calculé et réduit au minimum tout en gardant la puissance requise pour une analyse statistique et des conclusions fiables. La procédure expérimentale est optimisée pour utiliser le strict minimum des animaux

3) Une surveillance quotidienne des souris sera effectuée afin de s'assurer du bien-être des animaux utilisés. Des points limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire. Les résultats escomptés constitueraient la base préclinique pour une utilisation thérapeutique chez la femme du 17 β -oestradiol ou de l'Estetrol par voie intranasale pour un traitement substitutif à la ménopause.

18510 Pour ce projet, d'une durée de 5 ans, un maximum de 4 100 souris seront utilisées.

Le but de ce projet est de caractériser des biomarqueurs de la croissance osseuse et d'évaluer l'efficacité d'un traitement pour l'achondroplasie, qui est la forme de nanisme la plus fréquente chez l'Homme. Cette maladie est due à des mutations génétiques encodant un récepteur transmembranaire important, entre autres dans la régulation de la croissance linéaire des os longs. Nous utiliserons dans ce projet des souris sauvages (non génétiquement modifiées) et des souris qui présentent la même pathologie que celle exprimée chez l'homme. Il s'agit d'une souche à phénotype dommageable (troubles de la locomotion, paralysie unilatérale, paralysie bilatérale avec atteinte de la vessie, troubles respiratoires). Nous apporterons une attention toute particulière à chacun des animaux issus de cette souche. Ce projet nécessite l'utilisation de ces animaux à phénotype dommageable afin d'évaluer l'efficacité du traitement et de transposer leur utilisation chez l'Homme, et ainsi continuer le développement clinique du médicament. Les projets précédents ont permis de sélectionner une molécule de référence qui a démontré son efficacité sur la croissance de souris nouveau-nées.

Ce projet aura des bénéfices pour l'Homme puisque les résultats précliniques obtenus permettront de transposer l'utilisation de ce traitement de façon plus adéquate chez l'enfant, l'adolescent ou le jeune adulte. À l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement pour l'achondroplasie. Le potentiel candidat thérapeutique sélectionné permettrait de restaurer une croissance osseuse et donc de permettre aux patients de grandir mais surtout d'éliminer les complications liées à cette pathologie, notamment les paralysies au niveau de la moelle épinière.

Afin de satisfaire aux exigences de la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement), nous avons mis en place différentes stratégies pour ce projet.

Tout d'abord dans un but de remplacement, le sponsor a choisi les molécules optimisées après avoir réalisé des expériences sur cellules afin de ne tester chez l'animal que les molécules présentant un potentiel thérapeutique élevé.

Dans un but de raffinement, nous réalisons une évaluation précise de l'état des animaux au cours des procédures expérimentales grâce à des grilles de suivis adaptées et l'établissement de points limites précoces pour respecter le bien-être des animaux.

Dans un but de réduction, nous allons utiliser un nombre d'animaux restreints par lot tout en restant statistiquement exploitable.

Dès leur arrivée, les animaux seront hébergés dans des cages collectives avec un environnement enrichi (igloos, briques de bois à grignoter, buchettes, commutation progressive de la lumière et interactions fréquentes avec les humains...). Boisson et nourriture seront disponibles ad libitum.

Des points limites préalablement définis et adaptés permettront d'assurer un suivi de l'état général des animaux et de préserver leur bien-être. En cas d'altération de l'état de l'animal, la surveillance sera rapprochée grâce à une grille de suivi individuelle adaptée.

18511 Les particules fines ($\leq 2.5 \mu\text{m}$) pénètrent profondément dans le poumon, atteignant les petites voies aériennes et les alvéoles pulmonaires. Ce phénomène est impliqué à la fois dans le rôle des polluants atmosphériques dans l'apparition des maladies pulmonaires chroniques telles que l'asthme et la bronchopathie chronique obstructive, et dans l'efficacité des traitements administrés sous forme d'aérosols ou de poudres inhalées. Nous savons que le transport de ces particules est gouverné par le flux de l'air dans les voies aériennes. Cependant, le flux gazeux dans les régions périphériques du poumon, c'est à dire au niveau des acini qui représentent des grappes d'alvéoles, dépend étroitement de la structure du tissu pulmonaire. Ce que nous savons sur le transport et la déposition des aérosols dans cette région du poumon provient essentiellement de modèles mathématiques et de simulations numériques. La limite actuelle de ces méthodes est qu'elles supposent des parois alvéolaires rigides, ce qui est radicalement différent de la réalité car nous savons que les structures tissulaires se déforment au cours de l'inspiration avec l'entrée de l'air dans le poumon, et que cette déformation est susceptible de modifier de manière importante la prédiction des modèles de déposition de microparticules. Il n'existe pour le moment, aucune donnée in vivo sur la déformation des structures tissulaires pulmonaires avec la respiration. A ce jour, l'estimation quantitative de la déformation structurelle du poumon au cours du cycle respiratoire provient d'études histologiques, et des mesures indirectes. Nous avons développé un modèle mathématique de prédiction de la déposition de microparticules qui est basé sur la comparaison de la concentration de ces particules dans l'air inspiré et expiré. Afin d'augmenter la précision de ce modèle et de le valider, il est nécessaire d'obtenir des données quantitatives sur la déformation des structures alvéolaires du poumon, et notamment la variation de leur volume, avec la respiration. L'objectif de ce projet : est de mettre au point une méthode d'imagerie haute résolution au rayons X, chez le rat in vivo, et de l'utiliser pour obtenir de données quantitatives sur le changement de volume et de conformation spatiale des acini pulmonaires, qui seront ensuite utilisées pour la validation de notre modèle de calcul. Une fois validé, notre modèle computationnel permettra de remplacer le modèle expérimental chez l'animal, et respectant le principe des 3R. La mise au point de la méthodologie et l'acquisition des données quantitatives nécessitera des expériences in vivo sur 2 groupes de 15 animaux, soit 30 rats anesthésiés et sous ventilation mécanique au total.

18512 La radiothérapie est l'une des méthodes les plus efficaces et les plus utilisées pour traiter les cancers. Au moins 70 % des patients atteints d'un cancer seront traités par radiothérapie durant leur maladie. Le principal défi de la radiothérapie est de parvenir à déposer une dose curative dans la tumeur tout en s'assurant que les tissus sains environnants soient préservés dans leur intégrité. Ceci est d'autant plus crucial pour les tumeurs radiorésistantes comme les gliomes (tumeurs cérébrales), qui sont actuellement traitées uniquement de façon palliative. Dans ce contexte, notre objectif principal s'inscrit dans l'amélioration des traitements de radiothérapie. En effet, l'une de ces techniques innovantes a montré dans de précédentes études un intérêt significatif dans la préservation des tissus sains (même à des doses très élevées) ainsi qu'un effet très intéressant sur le contrôle de la croissance tumorale chez le rat.

Dans le cadre de ce projet, nous comparerons l'efficacité de la technique par mini-faisceaux () à celle de la radiothérapie classique

Notre critère d'évaluation pour l'efficacité de cette technique va porter sur la préservation des tissus sains aussi bien au niveau histologique que fonctionnel. Aussi, le recours à des méthodes

alternatives n'est pas envisageable dans ce projet et il nous est indispensable de développer des modèles animaux.

Pour la réalisation de ce projet, 1580 rats seront nécessaires. Dans un premier temps nous comparerons l'impact des deux techniques à différentes doses sur les fonctions cérébrales. Ainsi, des rats sains (non porteurs de tumeur) seront irradiés puis feront l'objet d'une série de tests comportementaux afin d'évaluer leurs fonctions cérébrales.

Ensuite, le but sera d'évaluer les altérations fonctionnelles, aussi bien motrices, émotionnelles et cognitives, dues à la présence de tumeur cérébrale (gliome) et de voir dans quelle mesure ces altérations peuvent être atténuées ou même corrigées avec la radiothérapie. Pour cela des rats porteurs de tumeur seront nécessaires.

Toutes ces séries expérimentales seront réalisées avec deux lignées cellulaires de gliome Luc+ (RG2 et F98) pour s'assurer que cette technique est efficace sur différents types de gliomes.

Le nombre d'animaux a été statistiquement défini pour permettre l'obtention de résultats fiables avec le moins d'animaux possible. Notre projet va nécessiter de travailler sur des rats chez lesquels la taille du cerveau est plus importante que celle de la souris. En effet, les types d'irradiations proposées dans le cadre des procédures expérimentales ne sont possibles qu'avec une taille de cerveau au moins égale à celle d'un rat.

En accord avec les réglementations internationales dans le domaine de la cancérologie, les conditions d'hébergement des animaux sont optimisées pour limiter leur stress. Les animaux seront observés quotidiennement pour déceler d'éventuels signes de détresse ou de mal-être et des mesures adéquates seront prises pour arrêter immédiatement leur souffrance.

18513 Le cancer colorectal (CCR) est le deuxième cancer le plus fréquent dans le monde. Une récurrence de la maladie (métastases hépatiques) apparaît chez 50% des patients. Dans ce cas ; le traitement chirurgical (le traitement de référence) peut être réalisé dans moins de 30% des cas. De plus, les autres thérapeutiques tel la chimiothérapie ont une efficacité de traitement limitée par leur toxicité et par l'acquisition d'une résistance au traitement. Depuis quelques années, les traitements locaux par la chaleur comme les radiofréquences (RFA) sont très utilisés chez les patients pour traiter le cancer et ses métastases lorsque la chirurgie classique n'est pas réalisable. Chez ceux-ci, une augmentation de la réponse immunitaire a été observée mais ne permet pas d'éviter les taux élevés de récurrence. D'autre part, beaucoup de travaux ont été consacrés au développement d'immunothérapies anti tumorales, aboutissant à la validation de vaccins contre le cancer.

L'objectif de notre projet consiste à optimiser la réponse immunitaire anti tumorale en associant un traitement thermique par RFA à une immunothérapie. Une première étude nous a permis de valider notre stratégie thérapeutique, il s'agit ici de maximiser la réponse antitumorale obtenue en définissant une formulation pouvant être utilisée chez l'homme. Le cancer est une maladie complexe et seule l'expérimentation animale, mimant le plus fidèlement l'environnement tumoral, permet d'étudier l'efficacité de ces traitements. L'efficacité de notre stratégie sera évaluée sur un modèle murin métastatique de cancer colorectal sous-cutané, bien caractérisé et largement étudié comme un modèle mimant le microenvironnement métastatique.

Dans un premier temps, le système immunitaire des animaux sera stimulé par les candidats vaccins. Deux semaines plus tard, les animaux recevront par une implantation sous cutanée 1 (modèle M1) ou 2 fragments (modèle M2) de cellules cancéreuses d'origine colorectales transformées pour être émettre de la lumière (CT26-luc). Cette implantation mimera la tumeur primaire colorectale métastatique retrouvée en clinique. Au stade de croissance tumorale souhaité, le traitement des tumeurs primaires sera réalisé : il consistera à réaliser le traitement thermique par RFA en association à une injection intra tumorale d'un thermo-gel contenant les candidats vaccins. Les animaux qui ne développent pas de tumeurs secondaires métastatiques à ce stade (modèle M1) recevront en parallèle, par injection sous cutanée des cellules CT26-luc. Enfin, pour les souris développant déjà une métastase (modèle M2) des injections intra-péritonéales d'anticorps (anti-PD1), reconnus pour empêcher l'inhibition de la prolifération cellules immunes par les cellules tumorales, compléteront le traitement. Les animaux seront imaged tous les 3 jours après le

traitement afin de suivre l'évolution tumorale. A la fin de l'étude, la rate, les ganglions drainants et les tumeurs secondaires seront prélevés afin d'analyser la réponse immunitaire au traitement.

Nous utiliserons 926 souris Balb/C femelles pour optimiser cette stratégie thérapeutique.

Dans l'objectif de suivre la règle des 3R réduire, raffiner, remplacer, nous limiterons le nombre d'expériences et de souris nécessaires. Remplacer : nous avons préalablement évalué par des expériences *in vitro* plusieurs formulations d'hydrogels thermosensibles pour ne tester chez l'animal que les formulations finales. Réduire : l'utilisation de l'imagerie optique nous permet de réaliser en temps réel le suivi de l'évolution tumorale. Cette technique non invasive nous permet ainsi de réduire au maximum le nombre d'animaux. Si une formulation est efficace à plus de 90% l'étude sera interrompue et de ce fait le nombre d'animaux sera réduit.

Raffiner : Afin de limiter au maximum la souffrance et l'anxiété infligées aux animaux, les interventions chirurgicales et les examens d'imagerie seront réalisés sous anesthésie générale. De plus, des antalgiques seront systématiquement donnés après les procédures chirurgicales. Chez la souris anesthésiée, tout signe de douleur (mouvement soudain, vocalisation) induira un arrêt de la procédure, une analgésie (Buprénorphine à 0,05 mg/kg par voie sous-cutanée) et une nouvelle induction de l'anesthésie dans une boîte à induction à 2% d'isoflurane. Une surveillance quotidienne sera assurée après la chirurgie : la souris sera placée dans une cage thermostatée le temps du réveil et de la récupération post chirurgicale et post examen d'imagerie. De plus, l'utilisation de l'imagerie optique nous permet de réaliser en temps réel le suivi de l'évolution tumorale. Cette technique non invasive nous permet de réduire au maximum le nombre d'animaux. Une surveillance journalière sera assurée après la chirurgie. Enfin, des points-limites généraux avec l'établissement d'une grille d'évaluation regroupant les critères relatifs au bien-être tout le long de l'étude ont été établis.

A terme, les résultats de cette étude nous permettront de définir la formulation optimale pour l'essai clinique chez l'homme pour intégrer cette stratégie dans le traitement du cancer colorectal métastatique.

18514 Actuellement, les glucocorticoïdes (GC) sont très largement utilisés pour le traitement d'affections aiguës ou chroniques comme les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI). Dans la littérature, des études montrent que l'utilisation prolongée de ce type de traitement entraîne des effets délétères sur le métabolisme musculo-squelettique aboutissant à une diminution de la résistance osseuse suite à la prise au long cours de corticoïde (i. e. ostéoporose secondaire dite cortico-induite). La perte osseuse observée touche davantage l'os trabéculaire que l'os cortical aboutissant à un risque fracturaire important. L'ostéoporose cortico-induite se développe en fonction du temps de traitement et de la dose administrée. Les études montrent que, même à faible dose, le risque de fracture de fragilité est important pendant le premier mois de traitement. De façon intéressante, les observations cliniques montrent que la prévalence du nombre de fractures diminue dès le troisième mois suite à l'arrêt du traitement. Les mécanismes mis en jeu dans cette récupération osseuse suite à l'arrêt des GC restent encore aujourd'hui inconnus. Dans ce projet, nous souhaitons étudier cette récupération : la cinétique et les mécanismes mis en jeu. Pour répondre à ces questions, nous utiliserons un modèle murin de MICI : le modèle de colite ulcéreuse induite par le Dextran Sodium Sulfate. Cette molécule endommage l'épithélium du colon et aboutit à la mise en place d'une réponse inflammatoire. Cependant, le mode d'action exacte de cette molécule est encore peu connu. Pour les animaux ayant une colite, les dommages attendus sont une perte de l'appétit, une perte de poids (5-20% de perte de poids), des diarrhées, l'apparition de douleur conduisant à une altération du comportement comme une diminution du nettoyage de leur pelage. Ce modèle de colite étant sévère, des points critiques seront observés chaque jour (perte de poids, diminution globale de l'activité, changement comportementale, aspect du pelage). Nous administrerons aussi un GC pour traiter la pathologie. Concernant les animaux sous ce traitement, une perte de masse osseuse est attendue, cependant, cette diminution n'aboutira pas à l'apparition de fracture.

Pendant cette étude, nous suivrons la densité minérale osseuse des animaux grâce à l'utilisation d'un micro tomographe au rayon X (microscanner) qui permet une évaluation de la densité minérale

osseuse in vivo. Ceci nous permettra d'avoir une étude dans le temps et de suivre la cinétique de récupération de l'os suite à l'arrêt du traitement avec les GC. Nous regarderons aussi les mécanismes inflammatoires connus dans les MICI ainsi que les marqueurs de la formation et de la résorption osseuse et l'activation des différentes cellules osseuses. Pour répondre à nos objectifs, des rats mâles Sprague Dawley (92 rats) seront utilisés. Pour suivre la cinétique de récupération osseuse une technique d'analyse de la densité osseuse corps entier grâce à un microscanner in vivo sera utilisée. Cette méthode permet d'analyser la densité osseuse en gardant les animaux vivant tout le long du protocole et permettant ainsi de réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés. Les rats suivront la micro tomographie une fois par semaine pendant 5 semaines puis une dernière fois à la fin du protocole. Les acquisitions durent en moyenne 45 minutes pendant lesquelles les rats sont sous anesthésies gazeuses et positionné dans un tube de contention spécifique au micro scanner.

Pour ce projet et afin d'être en conformité avec la règle des 3R, le nombre d'animaux nécessaire a été calculé et réduit au minimum pour que les résultats obtenus aient une puissance statistique nécessaire pour montrer des différences lors de comparaisons intergroupe. Concernant l'hébergement et l'enrichissement fournis aux animaux, des éléments comme des Rat Corner ou de play tunnel seront ajoutés dans les cages. Le nombre de rats par cage respectera la réglementation. Pour ce projet, l'utilisation du modèle animal in vivo reste indispensable, car même si au laboratoire nous avons accès à des modèles cellulaires, la complexité osseuse et la relation entre la prise de GC et le tissu osseux ne peuvent pas être reproduites. Enfin, nous avons choisi comme animal le rat, car c'est un modèle qui a été utilisé précédemment au laboratoire et nous avons une connaissance solide dans l'analyse du tissu osseux chez cet animal. Une observation quotidienne sera réalisée avec la mise en place d'un registre d'observation et des points limites ont été définis.

18515 La prévalence des troubles de stress post-traumatique serait de 5 à 12% dans la population générale. Les patients atteints de ces troubles, suite à leur exposition à un événement traumatique, souffrent de symptômes sévères tels que la peur intense, des flash-backs, des cauchemars et des pensées imposées et incontrôlables. Malgré les avancées scientifiques importantes dans ce domaine, il n'y a aujourd'hui aucune thérapie réellement efficace sur l'ensemble des symptômes des troubles du stress post-traumatique.

La psychothérapie est considérée comme la thérapie de première ligne et la plus efficace pour traiter les patients souffrants de ces troubles. La psychothérapie est un traitement coûteux et chronophage que beaucoup de patients finissent par abandonner sans parvenir à contrôler leurs symptômes. La pharmacothérapie est basée sur des inhibiteurs de recapture de la sérotonine dont l'efficacité est modérée, d'où la nécessité de continuer la recherche pour comprendre mieux la physiopathologie de ces troubles et trouver une pharmacothérapie plus efficace.

Afin de contrer ces problématiques cliniques, chez l'homme ou l'animal qui peut aussi manifester des troubles de stress post-traumatiques, et de disposer de médicaments efficaces et sûrs, il est aujourd'hui encore nécessaire d'effectuer des tests sur l'animal. Ces tests consistent à étudier l'efficacité et la toxicité potentielle des futurs médicaments, avant leur mise sur le marché et ainsi limiter tout risque sur l'Humain adulte, les enfants ou les nourrissons. Souvent, ces médicaments serviront de base pour en produire de nouveaux utilisables en médecine vétérinaire pour traiter les maladies animales.

Les modèles animaux des troubles psychiatriques demeurent des éléments critiques dans la compréhension de la physiopathologie de ces maladies, l'identification des nouvelles cibles et de nouveaux candidats médicamenteux ainsi que la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents. Ce projet vise à mettre en place un modèle de trouble de stress post-traumatique chez le rat qui intègre la variabilité individuelle de la sensibilité au traumatisme observée chez l'humain, et remplit un ensemble multidimensionnel de critères de validité scientifique. Ce modèle sera utilisé afin de tester l'efficacité des médicaments existants ou en cours de développement.

Avant les tests sur l'animal, les produits sont généralement testés et présélectionnés dans des études in vitro. Demeurent certains tests nécessitant l'utilisation de rongeurs ou de gros animaux

qui ne peuvent être efficacement remplacés par des méthodes alternatives. En effet, pour ces tests, seul l'animal de laboratoire dans son entièreté permet d'étudier la disponibilité d'un produit dans un tissu donné (sain ou malade), de son influence sur le métabolisme, de sa vitesse d'élimination et de sa toxicité.

Néanmoins, les procédures utilisées dans ce projet ont été étudiées attentivement et caractérisées de façon extensive par une bibliographie approfondie. Ainsi, les techniques utilisées dans ce projet ont été optimisées, afin d'assurer un maximum de bien-être pour l'animal dans le strict respect des 3Rs.

Un soin particulier dans le raffinement des méthodes est assuré et garantit l'utilisation systématique du modèle apportant le maximum de réponses scientifiques et le minimum de souffrance pour l'animal. En particulier, des points limites clairs sont établis (incluant une surveillance de l'aspect général, l'aspect du pelage, des yeux, la posture, les réactions de l'animal quand il est approché ou stimulé, la respiration, l'appétit, le poids, l'état d'hydratation, les tremblements ou convulsions), afin d'assurer d'une part, un bon suivi des animaux et d'autre part, une fin sans souffrance ou angoisse excepté lorsque nécessaire. Les méthodes d'euthanasie choisies sont sélectionnées pour supprimer toute forme d'angoisse, de stress ou de douleur.

De leur arrivée au laboratoire jusqu'à leur sortie de l'étude, les animaux sont manipulés avec soin, habitués à l'humain, manipulés fréquemment et leurs conditions de vie sont constamment améliorées pour garantir un environnement de vie enrichi (Tunnels, matériels de nidation et à ronger). Les rats sont hébergés en groupes, tout en conservant l'espace individuel nécessaire à l'expression des comportements de vie normal. En fait, des études ont montré un effet positif de l'enrichissement environnemental sur les déficits comportementaux dans des modèles animaux des troubles post-traumatiques d'où l'intérêt de limiter l'enrichissement environnemental des rats dans ce projet.

Enfin, nous ajoutons en fin d'expérience et quand c'est possible tous les prélèvements nécessaires (histologie, prélèvement de sang, structures cérébrales etc...) de façon à pouvoir effectuer l'ensemble des analyses nécessaires sur les mêmes lots. Cela permet de réduire significativement le nombre d'études et d'éviter d'avoir à dupliquer des expériences. Pour des raisons scientifiques, des prélèvements seront également réalisés sur des lots séparés des études comportementales, qui peuvent induire des modifications moléculaires et cellulaires indépendamment des traitements pharmacologiques qui seront évaluées.

L'en semble de ces mesures permet de réduire le nombre d'animaux inclus dans les expériences, de façon à optimiser les réponses scientifiques tout en garantissant une puissance statistique suffisante pour interpréter les résultats de façon correcte, évitant ainsi une répétition des tests. Le nombre des rats qui seront utilisés dans le cadre de ce projet est 1746 rats.

18516 Les pathologies liées à une inflammation excessive non maîtrisées sont nombreuses. Parmi elles, on retrouve un grand nombre de maladie auto-immunes tel que la maladie de Crohn (inflammation de la paroi d'une partie du tube digestif), mais aussi des infections bactériennes. Quand l'inflammation est aiguë et excessive celle-ci peut mener à des chocs septiques et/ou à des lésions organiques importantes à long terme. Une des causes menant à une inflammation excessive dans ces pathologies est l'infiltration de composés de la paroi bactérienne tel que des Lipopolysaccharides (LPS) dans la cavité abdominale. Les cellules du systèmes immunitaires en présence du LPS vont sécréter un trop grand nombre de petites molécules, appelées cytokines. Ces cytokines sont à l'origine de l'inflammation ce qui crée un déséquilibre immunitaire. Ainsi, le rééquilibrage de ce dysfonctionnement immunitaire est crucial pour lutter contre ces pathologies encore difficilement traitables.

Certaines protéines sécrétées par les bactéries du microbiote ont été identifiés comme jouant un rôle crucial dans certaines pathologies auto-immunes et inflammatoires. Ainsi, notre étude vise à caractériser de nouveaux composés issus du microbiote humain (de patients sains) comme pouvant avoir une activité anti-inflammatoire à des fins thérapeutiques.

Pour ce faire, nous proposons de valider l'activité anti-inflammatoire de nos composés après injection d'une dose sublétales de lipopolysaccharides (LPS) en intrapéritonéale (ip) chez la souris. Le LPS est un composant de la paroi bactérienne, il est connu comme induisant fortement l'inflammation lorsqu'il se retrouve en présence des cellules immunitaires de notre corps. Celui-ci est utilisé dans notre étude comme inducteur de l'inflammation. Le but de nos composés est donc d'inhiber ou de réduire au maximum l'inflammation induite par le LPS.

L'activité et la toxicité de chaque composé ont été validés in Vitro sur cellules primaires Humaines, Murines ainsi que sur une lignée cellulaire. Ces tests ont permis de présélectionner et de réduire le nombre de candidats thérapeutiques. Cependant, l'activité anti-inflammatoire des composés doit être définitivement validée dans des modèles animaux qui restent les seuls modèles permettant d'étudier la réponse immunitaire attendue chez l'homme.

Afin de réduire les répétitions expérimentales inutiles nous avons choisi un modèle bien connu et très utilisé ne nécessitant pas de mise au point. Les animaux n'auront qu'une seule injection de LPS (faible dose) et du composé d'intérêt en ip et gardés en observation pendant 24h ou 72h avant l'euthanasie.

L'utilisation d'une dose sublétales de LPS ainsi qu'une cinétique courte permet de réduire au maximum la douleur et l'inconfort subit par les animaux. Ceux-ci seront maintenus dans des conditions environnementales contrôlées (température, humidité, cycle jour / nuit), dans un espace suffisant, en groupe pour maintenir les interactions sociales et avec un enrichissement environnemental permettant de répondre aux besoins physiologiques et comportementaux des souris. Notre protocole ne nécessite ni l'utilisation d'animaux génétiquement modifiés ni de maintien en élevage. Toutes les manipulations seront réalisées dans le respect de l'animal et la règle des 3R.

Ce projet sera composé de 15 études expérimentales visant à étudier 15 différents composés de nature protéique ou peptidique sur la souris. Ces études comprendront chacune au plus 48 animaux (6 groupes de 8 souris), soit un total maximum de 720 animaux.

18517 Les syndromes myélodysplasiques (SMD) et leucémies aiguës myéloïdes (LAM) sont des cancers du sang impliquant les cellules souches hématopoïétiques (CSH). Les CSH sont des cellules immatures qui permettent la production des cellules sanguines matures (globules blancs, globules rouges et plaquettes). Elles sont localisées dans la moelle osseuse, au sein d'une entité appelée niche hématopoïétique.

En situation normale, les cellules de la niche vont contribuer au bon fonctionnement des CSH. Cependant, de nombreuses études ont montré qu'une dérégulation des cellules de la niche pouvait participer au développement des LAM et SMD. Malgré des avancées thérapeutiques, les SMD et LAM demeurent des maladies de mauvais pronostic, associées à une mortalité et à un taux de rechutes importants. Ainsi, le développement de nouvelles alternatives thérapeutiques s'avère aujourd'hui indispensable pour une meilleure prise en charge de ces maladies.

Pour mieux comprendre le rôle de la niche dans le développement de ces cancers, il existe des systèmes de co-culture in vitro visant à mettre directement les cellules de la niche au contact des CSH. Ces systèmes ont déjà permis de répondre à plusieurs de nos questions. Cependant, ils ne permettent d'appréhender que très partiellement l'organisation complexe de la niche hématopoïétique. Pour étudier de façon plus fine et plus complète ce compartiment, nous avons donc besoin de modèles in vivo.

La transplantation de CSH pathologiques chez des souris immunodéprimées est un modèle couramment utilisé pour étudier ces maladies. Néanmoins, lorsque ce modèle de transplantation « classique » est appliqué aux SMD et à certains sous-types de LAM, l'efficacité de la greffe des CSH dans la moelle osseuse des souris s'avère souvent médiocre. Ce plus, ce modèle pose le problème de spécificité inter-espèce entre l'homme et la souris.

Ces dernières années, un modèle alternatif a été développé : il s'agit des niches ectopiques humanisées ou « osselets ». Ces derniers sont formés à partir de cellules stromales mésenchymateuses humaines (CSMh) issues de la moelle osseuse des patients. Des expériences préliminaires ont montré que ces osselets étaient capables d'accueillir en leur sein des CSH et que

ces dernières pouvaient se différencier en cellules plus matures. Ce modèle présente l'avantage de mimer plus fidèlement l'organisation de la niche hématopoïétique et permet de s'affranchir du problème de spécificité inter-espèce homme/souris.

Notre projet est donc d'appliquer ce modèle aux SMD et LAM afin d'avancer dans la compréhension du rôle de la niche dans la physiopathologie de ces hémopathies, dans un but final d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Pour nos expériences, nous utiliserons des souris immunodéprimées de type NOD scid gamma (NSG), chez lesquelles nous allons créer des osselets par injections sous-cutanées de CSM d'origine humaine (CSMh). Après formation des osselets sur le flanc des souris, nous administrerons en intraveineux des CSH issues de patients atteints de SMD et LAM et évaluerons après plusieurs semaines l'efficacité de la prise de greffe dans ces niches en comparaison à la moelle osseuse.

Pour mener à bien notre projet nous prévoyons un total de 250 souris sur une période de 5 ans.

Afin de suivre la règle des 3R :

REDUCTION :

- Des expériences préliminaires réalisées sur un nombre réduit d'animaux seront mises en œuvre de façon à affiner les protocoles utilisés par la suite.
- Le nombre d'animaux par lot a été évalué pour être un minimum permettant d'assurer la robustesse des résultats.

RAFFINEMENT :

- Des mesures visant à réduire la douleur des animaux seront prises. Les injections de CSMh et les prélèvements sanguins et de moelle seront effectués sous anesthésie. Un suivi attentif des animaux est prévu à chaque étape de la procédure. Un traitement antalgique préventif et curatif sera mis en place pour les procédures susceptibles d'induire une douleur. Les animaux seront régulièrement évalués à l'aide de points limites bien définis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.
- Pour chaque animal sacrifié, nous exploiterons un maximum de données disponibles.

REEMPLACER :

- Pour répondre à des questions ponctuelles de biologie cellulaire et moléculaire, nous aurons recours à des systèmes de culture.

18518 Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) sont un groupe hétérogène d'hémopathies malignes caractérisées par un blocage de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques de la lignée myéloïde en cellules immunitaires matures, c'est à dire un dysfonctionnement du processus qui vise à déterminer l'identité des futures cellules sanguines. Elle entraîne ainsi une prolifération excessive de cellules (dites blastes myéloïdes), dans la moelle osseuse et le sang. Ainsi ces blastes prennent la place des cellules sanguines, les empêchant ainsi d'accomplir leurs fonctions. Le traitement standard est très efficace pour tuer les cellules cancéreuses de LAM. Mais malgré un taux élevé de rémission complète, la survie globale à 5 ans est très mauvaise (20%), notamment à cause d'une repousse tumorale initiée par des cellules leucémiques chimiorésistantes (RLCs).

Dans nos modèles animaux de cancer, les cellules leucémiques sont injectées au stade jeune adulte car cela permet un meilleur établissement de la maladie et une meilleure résistance. Mais la durée d'établissement est variable ; certaines souris sont vieillissantes mimant ainsi mieux les conditions réelles, les patients atteints de LAM étant majoritairement âgés. En revanche, l'âge a l'impact sur le métabolisme général de l'hôte, et le métabolisme peut être fortement influencé par les apports nutritionnels.

Le but de ce projet est donc de comprendre et de mettre en évidence l'impact du vieillissement sur le système hématopoïétique et le métabolisme de l'hôte, en faisant varier les apports nutritionnels chez les souris âgées parallèlement à de jeunes souris.

Nous étudierons aussi l'impact de ces facteurs sur la sensibilité aux traitements dans nos modèles xénogreffés.

Nous nous intéresserons ainsi à trois catégories d'alimentation : une alimentation riche en acides gras, une alimentation cétogène, et une alimentation carencée en certains acides aminés d'intérêt au laboratoire.

Ce projet s'intéresse au suivi des cellules leucémiques humaines de LAM issues de patients ou de lignées cellulaires, injectées seules ou en association avec d'autres cellules humaines in vivo chez des souris immunodéficientes.

Ce projet nécessitera l'utilisation de 6500 souris pour une durée de 5 ans.

La règle des 3R sera appliquée comme suit :

- Remplacement par des modèles in vitro en première intention pour le criblage de molécules et les carences, malgré une utilisation nécessaire de modèles in vivo pour étudier le développement tumoral au sein de son microenvironnement et l'évolution dans un organisme vivant. Les changements de milieu de culture cellulaire donneront les indications mais ne miment pas parfaitement la composition de l'alimentation animale ni les interactions avec le métabolisme de l'hôte. De plus, le vieillissement cellulaire ne peut remplacer le vieillissement d'un organisme entier, les lignées cellulaires sont immortalisées et très homogènes contrairement à la variabilité du vivant.
- Réduction de l'effectif des cohortes en utilisant des outils statistiques et un logiciel de simulation. Les études antérieures permettront aussi d'optimiser le nombre d'animaux et d'échantillons issus de l'animal.
- Raffinement grâce à une procédure de suivi du bien-être des animaux adaptés au modèle et aux potentiels effets indésirables des procédures. Les protocoles sont étudiés afin de limiter au plus le stress et la douleur et les études antérieures ont permis de mieux appréhender les points limites de la maladie.

18519 Le développement et la progression du cancer sont profondément influencés par des facteurs extérieurs aux cellules tumorales. Parmi ceux-ci, le système immunitaire joue un rôle prépondérant en encourageant ou en inhibant la progression tumorale. Les Lymphocytes T sont de parfaits exemples de cette dualité. Ainsi, les Lymphocytes T effecteurs sont de puissants acteurs anti-tumoraux alors que les lymphocytes T CD4 régulateurs (Tregs) sont des acteurs cruciaux de l'inhibition des réponses immunitaires anti-tumorales. Les stratégies thérapeutiques ciblant ces derniers sont donc prometteuses.

A l'état basal, 2 sous-populations de Tregs coexistent dans l'organisme. Les Tregs sont dits thymiques (tTregs) quand ils sont produits dans le thymus et sont spécifiques du "Soi". Les Tregs sont périphériques (pTregs) quand ils sont générés en périphérie lors de l'activation de cellules T CD4 naïves. Au contraire des tTregs, les pTregs dépendent de l'élément CNS1 du gène Foxp3 pour leur génération.

Il a été récemment montré que le niveau de fer dans l'organisme affectait l'activation, le profil de différenciation ou la prolifération des Lymphocytes T. Leur différenciation en Lymphocytes T effecteurs CD4 Th1 et Tc1 d'une part et en Tregs d'autre part pouvant être modulée in vitro par les niveaux de fer environnementaux.

Alors que les Tregs ont fait l'objet de nombreux travaux dans le contexte tumoral, il est étonnant de noter que la contribution plus spécifique des pTregs à la progression tumorale n'a pas été établie. Ce projet vise à déterminer à la fois (1) la contribution spécifique des tTregs et pTregs à la progression tumorale et (2) l'effet de la modulation de l'activité des populations de lymphocytes T anti-tumoraux par les variations de fer environnementales. Il implique deux procédures s'appuyant sur un modèle de cancer colorectal induit par injection d'un produit tumorigène chez la souris. Ce modèle sera appliqué à (1) des animaux déficients pour diverses fonctions et populations de cellules T dont les pTregs et à (2) des animaux des mêmes lignées génétiquement modifiées qui auront été préalablement nourris avec une alimentation riche en fer pour évaluer le potentiel thérapeutique d'un tel régime sur le développement tumoral.

L'utilisation de l'expérimentation animale pour ce projet est justifiée par la complexité inhérente à la biologie des tumeurs qui ne peut pas être récapitulée par des expériences in vitro.

En conformité avec les exigences 3R :

- Des expériences préliminaires ont été réalisées in vitro pour évaluer nos hypothèses (remplacement). Ces expériences nous ont permis, par exemple, de confirmer l'influence du fer et de l'élément régulateur CNS1 sur la différenciation des cellules T en effecteurs.
- Des lots d'un nombre réduit d'animaux seront utilisés en anticipant la validité statistique des données obtenues (réduction). L'utilisation de techniques d'imagerie par échographie pour le suivi longitudinal du développement de la tumorigenèse colique nous permettra de limiter au strict nécessaire le nombre d'animaux inclus dans cette étude. Ce suivi longitudinal réduira en effet le nombre d'expériences en nous permettant d'analyser des animaux dont nous connaissons a priori le nombre et la taille des tumeurs coliques induites.
- Des expériences préliminaires réalisées sur des nombres réduits d'animaux seront mises en œuvre de façon à affiner les protocoles utilisés par la suite.
- Des mesures visant à réduire la douleur des animaux seront prises. Toutes les injections se feront ainsi sous anesthésie générale et un suivi attentif des animaux est prévu pour chaque procédure. Pour réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux, nous utiliserons des techniques non invasives comme l'imagerie par échographie et la coloscopie qui permettent un suivi longitudinal du développement de la tumorigenèse colique. Cette approche méthodologique nous permet de faire des études sur des tumeurs de petites tailles, à des stades précoces, ce qui évite la souffrance engendrée par un développement tumoral important.
- Des points-limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

Le nombre total d'animaux est estimé à 1584 souris pour l'ensemble du projet durant 5 ans. Les résultats obtenus dans le modèle animal devraient apporter une meilleure compréhension de la contribution des lymphocytes T CD4 régulateurs et effecteurs à l'inhibition de la réponse anti-tumorale et nous permettre d'envisager le développement de stratégies les ciblant.

18520 La lumière, en plus de son rôle dans la vision, est également impliquée dans la régulation des rythmes circadiens, de l'humeur, de la vigilance ou encore des performances cognitives. La pollution lumineuse et l'exposition croissante à de nouvelles sources de lumière (LEDs, objets connectés...) ont des conséquences importantes sur la santé. Le développement des LEDs et des nouveaux médias favorise l'exposition à des sources lumineuses dont le spectre de couleur est hétérogène, enrichi en composantes monochromatiques, souvent à des moments circadiens inappropriés avec une exposition chronique dont les effets sur notre physiologie et notre comportement restent encore mal connus, bien que déjà identifiés comme délétères. Les données épidémiologiques montrent que l'impact de cette utilisation extensive et inappropriée de lumière est à l'origine d'une prévalence accrue de problèmes de santé, parmi lesquels figurent des troubles du sommeil et de la vigilance, troubles du rythme circadien, troubles de l'humeur et affaiblissement des performances attentionnelles et cognitives.

Si les effets de la lumière sont souvent considérés au travers de leurs effets néfastes, l'impact d'une exposition lumineuse sur la physiologie et le comportement peut aussi bien s'avérer délétère que bénéfique, en fonction des paramètres de l'exposition. En effet, lorsque l'on considère les effets d'une exposition lumineuse, il convient de prendre en compte la durée et le moment d'exposition, le niveau de luminance et enfin sa composition spectrale. Si les deux premiers facteurs restent les mieux étudiés, le rôle des différentes longueurs d'ondes reste très mal compris.

L'objectif de notre projet est de mieux comprendre les mécanismes qui sous-tendent l'influence du spectre de couleur sur l'organisation et la qualité du sommeil, notamment par le biais de son action sur les différents types de cellules photoréceptrices au sein de la rétine et sur les centres supérieurs du cerveau impliqués dans la régulation des rythmes circadiens, du sommeil et de la veille. Les lumières monochromatiques bleue, verte et rouge seront donc évaluées et comparées à la lumière blanche polychromatique.

Grâce à différents modèles de souris déficitaires pour certaines voies de phototransduction et de photointégration, nous pourrions évaluer l'effet spécifique de chacune de ces voies sur le comportement suite à différentes expositions lumineuses.

Remplacer : L'utilisation de l'animal entier est nécessaire au vu de la question posée, impliquant des systèmes biologiques divers et complexes allant de la rétine, avec l'intégration du signal lumineux, au comportement de l'animal, en passant par des systèmes neuronaux complexes.

Réduire : Afin d'optimiser le nombre d'animaux, chaque lot pourra subir différents paradigmes lumineux consécutifs en respectant un temps minimal entre chaque paradigme afin d'obtenir une récupération complète de l'architecture naturelle du sommeil entre deux conditions.

Raffiner : Dans le cadre du raffinement des conditions d'hébergement, les animaux sont maintenus jusqu'à l'expérience en groupe sociaux, un enrichissement est réalisé par l'ajout de nids. D'autres enrichissements tels que tubes, maisons ou balancettes ne peuvent être utilisés car empêcheraient l'exposition des animaux à la lumière et donc fausseraient les résultats du projet. Les procédures invasives seront réalisées sous anesthésie profonde et analgésie. La température sera maintenue grâce à un tapis chauffant thermostaté. Les animaux seront suivis quotidiennement et la douleur évaluée grâce à une grille d'évaluation objectivée comportant des points limites prédictifs parfaitement établis. Ces points permettront d'interrompre les procédures à tout moment limitant ainsi la douleur et/ ou l'inconfort infligé à l'animal.

Au vu de la variabilité dans les réponses comportementales, le projet, effectué sur une durée maximale de 5 ans, implique un effectif total maximal de 150 souris par génotype. Les génotypes les plus pertinents seront sélectionnés aux vues des premiers résultats obtenus. Pour une bonne faisabilité de l'étude, un maximum de 750 souris mâles adultes sera utilisé au cours de ces cinq années.

18521 Au cours de la maladie rénale chronique (MRC) s'accumulent des déchets appelés toxines urémiques. La modification de la flore intestinale au cours de la MRC semble être un facteur clé dans la génération de ces toxines.

Comme ces toxines sont peu éliminées par la dialyse, trouver des solutions thérapeutiques pour réduire leurs concentrations est urgent. La modification du microbiote par l'utilisation de probiotiques semble être une option thérapeutique intéressante.

Le but est d'évaluer l'intérêt d'un symbiotique sur la production de toxines urémiques et les paramètres métaboliques, rénaux et intestinaux dans un modèle de souris ayant une MRC. Deux combinaisons de symbiotiques seront testées. Les symbiotiques contiendront : un probiotique (bactéries ayant un effet bénéfique potentiel sur l'organisme), un prébiotique (fibres alimentaires qui favorisent la croissance de certaines bactéries) et un postbiotique (composé produit par les bactéries intestinales).

La première combinaison sera un probiotique (*Lactobacillus johnsonii*) avec un prébiotique (cellobiose) et un postbiotique (butyrate-MCT).

La deuxième combinaison sera un probiotique (*Lactobacillus johnsonii*) avec un prébiotique (cellobiose + galacto-oligosaccharides) et un postbiotique (butyrate/caprylate).

S'il est mis en évidence un effet positif du probiotique, un essai thérapeutique chez des patients atteints de MRC pourra être envisagé.

Les symbiotiques seront administrés pour une durée de 6 semaines. Les symbiotiques seront incorporés dans l'alimentation standard des souris. À la fin du traitement, la tolérance au glucose sera évaluée par une mesure de la glycémie après une administration de sucre. La fonction rénale sera déterminée en mesurant la quantité de protéines dans les urines récoltées dans des cages métaboliques. En post-mortem seront collectés les reins, l'intestin, les muscles, le foie et les tissus adipeux pour une analyse histologique et moléculaire. Le sang sera collecté pour mesurer la concentration des toxines urémiques.

Remplacer : les mécanismes impliqués dans la production de toxines urémiques sont multifactoriels et ne sont pas modélisables in vitro. La MRC et les toxines urémiques ont un effet délétère sur

l'ensemble des tissus de l'organisme comme le rein et la régulation du glucose. Il est donc nécessaire de recourir à une étude in vivo pour étudier l'impact des symbiotiques sur l'ensemble de ces paramètres étant donné l'impact systémique de la MRC. Toute expérimentation in vitro et/ou méthode substitutive est donc impossible.

Réduire : le nombre de souris nécessaires a été calculé au plus juste afin d'offrir la puissance statistique maximum. Au maximum, 120 souris seront donc utilisées.

Raffinée : L'induction de la MRC sera réalisée chez la souris par une méthode chirurgicale en deux étapes séparées sous anesthésie générale avec l'utilisation d'analgésiques péri- et post-opératoires permettant une limitation de la douleur. Un enrichissement du milieu de vie sera mis en œuvre pour l'hébergement des souris. Les animaux seront maintenus par 5 afin d'éviter le stress de l'isolement et, les souris seront surveillées 5 fois/semaine (deux fois par jour en post-chirurgie) afin d'identifier et de limiter tout risque de souffrance ou de mal-être. Les points limites définis en amont selon le rationnel expérimental seront recherchés quotidiennement pour éviter toute souffrance animale.

18522 La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative incurable qui entraîne la perte progressive et irréversible des fonctions mentales et notamment de la mémoire. C'est la forme la plus fréquente de démence chez l'homme. Une des causes associées à cette maladie est un dysfonctionnement de la transmission de l'information entre les neurones.

Dans le cerveau, et tout particulièrement dans l'hippocampe, une structure jouant un rôle clé dans la mémoire, l'astrocyte est un partenaire clé des neurones. En effet, cette cellule, communément appelée cellule gliale régule l'efficacité avec laquelle les neurones communiquent au niveau de la synapse. Pour se faire, tout comme les neurones, les astrocytes libèrent des substances actives, appelées gliotransmetteurs, comme la D-sérine.

En libérant la D-sérine, les astrocytes contrôlent à l'échelle cellulaire la mémoire de la synapse. Des données obtenues au laboratoire et récemment publiées indiquent qu'à un stade précoce de la maladie d'Alzheimer, la synthèse du précurseur de la D-sérine est diminuée, entraînant des troubles de la mémoire synaptique et de mémoire. De manière très intéressante, ces troubles n'apparaissent plus lorsque les souris sont nourries avec une nourriture enrichie en L-sérine à 10%, qui est le précurseur de la D-sérine.

Le but de ce projet est d'identifier si un traitement plus long pourrait avoir un effet bénéfique sur le développement de la maladie, à un stade plus tardif.

L'ensemble de ce projet nécessite l'utilisation de 464 souris de fond génétique C57BL6/129sV, dont une lignée transgénique, communément appelée 3xTg-AD. Il n'existe actuellement pas de modèle in vitro et donc de méthode alternative permettant de REMPLACER les animaux. Afin de respecter la règle des 3R, nous avons REDUIT à 464 le nombre d'animaux que nous prévoyons d'utiliser pour une période de 5 ans. Il s'agit du nombre minimal d'animaux nécessaire à l'obtention de données de qualité exploitable et permettant une analyse statistique fiable. Des mesures de RAFFINEMENT seront mises en place durant toute la durée du projet. Les animaux seront hébergés au sein d'un établissement utilisateur agréé dans des conditions d'hébergement favorisant leur bien-être (enrichissement, suivi quotidien par du personnel qualifié,...). Enfin, des points-limites ont été établis entraînant une prise en charge de l'animal afin d'anticiper toute souffrance et réduire au mieux l'inconfort des animaux (anesthésie, analgésie, gel oculaire, tapis chauffant,...).

18523 L'utilisation de fongicides de types inhibiteurs de succinate déshydrogénase (SDHi) est en forte augmentation en agriculture depuis 5 ans, pour le traitement des semences et de la vigne contre les moisissures (mildiou). Ces molécules de synthèse bloquent l'activité cellulaire enzymatique de la succinate déshydrogénase (SDH) sans distinction d'espèce (entre les champignons et l'Homme). Les SDHi pourraient donc affecter le métabolisme cellulaire, tout d'abord chez les agriculteurs qui sont exposés pendant le traitement avec ces produits et enfin chez les consommateurs des produits traités.

Des travaux ont montré qu'un déficit génétique de la SDH entraîne des pathologies neurologiques et cancéreuses. C'est pourquoi, dans ce projet qui fait partie d'un vaste programme d'étude, nous

allons étudier l'effet neurotoxique de l'exposition chronique à deux fongicides chez la souris saine, mais aussi sur des souris atteintes de pathologies neurodégénératives, comme facteurs aggravant. Ces expériences seront réalisées dans les meilleures conditions en respectant les règles de bioéthiques (grâce au recours à l'anesthésie et à l'utilisation d'analgésie), des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner) et conformément à la législation en vigueur.

REMPLACEMENT : nous souhaitons évaluer l'impact des pesticides SDHi sur la physiologie et physiopathologie, nécessitant l'utilisation de modèles animaux pouvant mimer la complexité de la maladie chez l'humain.

REDUCTION : nous utilisons des tests comportementaux qui sont non invasifs et permettent un suivi au long cours sur un même animal. Cette étude concerne un consortium composé de 6 laboratoires français qui à la fin de l'étude récupéreront des échantillons afin d'effectuer des études biochimique, énergétique et histologique, limitant ainsi l'expérimentation animale à cette seule étude.

RAFFINEMENT : les animaux sont hébergés dans des conditions veillant au respect de leur bien-être (en fratrie) et avec un milieu enrichi afin de limiter leur stress. Les animaux sont suivis quotidiennement afin de détecter tout inconfort ou souffrance. Une étroite collaboration entre le personnel de l'animalerie et notre équipe d'expérimentateurs permet d'intervenir immédiatement sur les animaux en cas de nécessité.

Pour réaliser ce projet nous utiliserons 774 souris sur 5 ans, permettant de répondre à de multiples questions scientifiques sur l'effet des pesticides SDHi sur la santé humaine.

18524 Le projet porte sur l'étude de l'efficacité de différents additifs alimentaires en élevage truiticole. Pour mesurer cette efficacité portant sur la réponse immunitaire, une meilleure survie, le gain de poids et la variabilité de cette prise de poids des poissons, des aliments complétés à l'aide de différentes préparations seront distribués à des lots de truites arc en ciel en conditions expérimentale. En effet, il est important de renforcer l'immunité dans les élevages truiticoles afin d'améliorer la viabilité, mais aussi l'homogénéité des performances de croissance, diminuant de ce fait les tris et manipulations contraignante pour les éleveurs et stressante pour les poissons.

L'objectif de l'étude est de travailler sur des additifs permettant de renforcer le système immunitaire, de réduire la mortalité, une meilleure homogénéisation des lots et donc un nombre de tris moins fréquent. Pour ce projet, 1000 truites seront triés pour obtenir 660 truites de 100 grammes avec un coefficient de variation compris entre 2-3% seront utilisées. 60 truites arc en ciel seront allotées dans 6 bacs de 10 individus pour déterminer la dose infectieuse (DL50) qui sera utilisée pour le challenge infectieux. 600 truites arc en ciel seront allotées en 24 bacs de 25 individus. Chaque individu sera pesé pour permettre la constitution de lots présentant une variabilité de poids inférieur à 3% en début d'expérimentation. Les lots seront réalisés à minima en triplicat pour limiter la densité dans les bassins, augmenter la puissance statistique et ainsi réduire le nombre d'animaux pour l'expérimentation. Les lots de 25 poissons seront ensuite nourris avec des aliments complétés ou non (7 régimes différents) sur une période de 8 semaines, période minimale pour observer le doublement de poids des poissons et permettre l'extraction de résultats pertinents relatifs à l'effet des additifs sur les performances de croissance. L'étude statistique appliquée au projet sera une analyse mixte linéaire avec l'aliment en effet mixte et le bac en effet aléatoire.

Sur la moitié des bacs, pour évaluer les performances de croissance, les individus seront pesés au début, à quatre semaines d'expérimentation et à la fin de l'expérimentation (8 semaines). Chaque pesée sera réalisée après anesthésie des individus pour diminuer le stress de la manipulation. La ration alimentaire sera ajustée en fonction de la biomasse des lots et distribué de façon raisonnée deux fois par jour pour permettre l'évaluation de la non prise alimentaire.

Sur l'autre moitié des bacs, un challenge infectieux sera effectué après 4 semaines, afin d'évaluer la résistance des individus au pathogène bactérien *Aeromonas salmonicida*, pathogène entraînant des pertes importantes dans les élevages de salmonidés. Le suivi des mortalités sera réalisé deux fois par jour et pendant 15 jours. Des prélèvements sanguins seront réalisés au début

du challenge et à la fin sur 3 poissons par bac (9 poissons par traitement) pour suivre les paramètres immunitaires lors du challenge.

Toutes les manipulations de poissons (pesée, challenge, prise de sang) se fera sous anesthésie pour diminuer le stress de la manipulation. L'anesthésique utilisé est la tricaine en balnéation, anesthésique considéré comme molécule très efficace chez le poisson.

Les paramètres d'ambiance (température, oxygénation) seront suivis tous les jours et en continue (sondes) pour contrôler les valeurs critiques de l'élevage. Un enrichissement (tubes en plastique servant de cache) sera apporté dans chaque bacs. Tous individus présentant des troubles de santé seront sortis de l'expérimentation.

18525 Notre projet concerne les nouvelles technologies et techniques chirurgicales d'assistance (tissulaire et/ou mécanique) et de réparation de l'insuffisance cardiaque post-infarctus.

Suite à une crise cardiaque, de nombreux patients commencent à souffrir d'insuffisance cardiaque car un tissu cicatriciel se forme et nuit à la fonction cardiaque. Les chercheurs doivent améliorer leurs connaissances afin de prévenir la formation du tissu cicatriciel et de permettre une réparation efficace du cœur, ou afin d'assurer le positionnement le plus judicieux d'une technologie d'assistance.

C'est dans cet axe de recherche plutôt fondamental que s'inscrit cette étude, qui nous permettrait d'améliorer notre compréhension des mécanismes de réparation du cœur notamment des modifications de la matrice extracellulaire cardiaque qui constitue un élément capital dans la préservation de l'intégrité structurale et fonctionnelle du cœur.

Dans la majorité des tissus animaux, le constituant majeur n'est pas la cellule mais la matrice extracellulaire (MEC), une structure 3D constituée de différentes protéines sécrétées par les cellules. Or, la MEC ne sert pas simplement d'échafaudage mécanique, mais peut aussi transduire des signaux qui sont importants pour la survie et la fonction cellulaires. La plupart des affections pathologiques cardiaques sont associées à l'expansion de la MEC cardiaque et à des altérations marquées de sa composition; ces changements perturbent la fonction cardiaque. Nous souhaitons analyser en détail cette MEC, identifier l'impact de l'insuffisance cardiaque sur sa composition protéiques (qualitative et quantitative) et sa structure 3D afin de pouvoir envisager une réparation fidèle à du tissu cardiaque sain ou le positionnement le plus judicieux d'une technologie d'assistance car en dépit de la reconnaissance accrue de son rôle dans la médiation des réponses biologiques cellulaires, la contribution de la MEC en pathophysiologie cardiaque reste mal connue et probablement sous-estimée. Nous souhaitons obtenir ces données durant la phase inflammatoire (7 jours post-infarctus) et la phase de remodelage post-infarctus (30 jours). Les infarctus seront créés par ligature d'une artère du cœur : l'artère coronaire. Cette étude nécessitera 16 rats mâles wistar au maximum.

L'opération sera réalisée sous anesthésie générale. A la fin de la procédure, l'animal sera réveillé et gardé en vie plusieurs jours afin de permettre au tissu inflammatoire ou cicatriciel de se former. Un contrôle de la fonction cardiaque sera réalisé sous anesthésie par imagerie afin de visualiser l'étendue et la localisation des lésions. Puis une surdose d'euthanasique entraînera la mort de l'animal, sans souffrance, avant de réaliser le prélèvement du cœur en vue des diverses analyses sur le tissu cardiaque.

Cette étude nécessite l'utilisation d'animaux car l'objectif est d'étudier la structure 3D et la composition protéique du tissu cardiaque infarci, il est donc impératif de travailler sur un modèle entier vivant. Aucun modèle in vitro ne permet d'appréhender ces paramètres.

Nous avons établi des points limites (modification des paramètres cardiaques et respiratoires indiquant un réveil, une douleur ou un inconfort de l'animal durant l'opération chirurgicale mais aussi comportement inadéquat, modifications physiques... pendant toute l'étude) qui ne seront pas dépassés grâce aux procédures médicamenteuses disponibles au laboratoire (analgésie, anesthésie chirurgicale) ou à une prise en charge suffisamment précoce avec des soins adaptés.

Ce modèle est déjà en place dans notre structure ce qui permet de réduire le nombre d'animaux. Ainsi, maximum 16 rats sont nécessaires permettant une étude statistiquement exploitable. Les

conditions d'hébergement (enrichissement du milieu), de soins (établissement de points limites) et surtout les méthodes utilisées (opérations sous anesthésie générale, analgésie contrôlée) qui sont des méthodes dérivées directement de la pratique clinique chez l'homme permettent ainsi un raffinement de la méthodologie.

18526 L'étude et l'exploitation du microbiote intestinal, c'est-à-dire l'ensemble des microorganismes qui habite l'intestin, promet de révolutionner la médecine de précision. En effet, il est démontré qu'en cas de dysfonctionnement, ce que l'on appelle une dysbiose, le microbiote intestinal est lié à différentes maladies majeures (maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, certains cancers, des pathologies métaboliques, neurologiques ou encore neuropsychologiques). Ainsi l'étude du microbiote est un axe d'intérêt prioritaire pour des acteurs de solution de nutrition ou de thérapie et est également un espoir pour le diagnostic et le suivi thérapeutique. Le microbiote de l'intestin grêle est peu connu car impossible d'accès de façon non invasive. Cependant son rôle est déterminant pour l'immunité et la nutrition. Aujourd'hui la R&D de solutions ciblant l'intestin grêle se base sur des approches précliniques artificielles et non-représentatives. Les méthodes actuelles pour l'étude du microbiote intestinal sont coûteuses et complexes comme l'endoscopie et la coloscopie, tandis que l'étude du microbiote fécal n'est pas représentative du microbiote intestinal. Ainsi, une solution simple d'usage et représentative est nécessaire. C'est pourquoi une société a développé un dispositif médical de prélèvement du microbiote de l'intestin grêle se présentant sous la forme d'une gélule pharmaceutique sans électronique et mécanique classique capable d'effectuer des prélèvements multiples in-situ.

Le présent projet vise donc à évaluer la répétabilité et la représentativité des prélèvements de contenu intestinal obtenus à partir de ces gélules sur un modèle porc.

L'étude se fait sur un modèle porc car son anatomie digestive est comparable à celle de l'homme. Il n'est pas possible de remplacer l'utilisation d'animaux vivants dans ce projet, car aucun modèle in vitro ne peut mimer l'intégralité du tractus digestif avec l'ensemble de ces composantes biotiques et abiotiques ainsi que le transit digestif. Etant donné la variabilité inter-individuelle, trois animaux sont nécessaires pour l'ensemble de l'étude. Ils sont menés en parallèle pour évaluer la représentativité des prélèvements par les gélules par rapport au contenu digestif réel. Le choix de trois animaux s'est appuyé sur notre expérience dans le but de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Dans une optique de raffinement, les porcs arrivent sur place deux semaines avant le début des manipulations pour leur permettre de s'habituer au lieu et ainsi de diminuer leur stress. Cela permet aussi d'avoir un microbiote stable au début de l'étude. Pour les besoins du projet, ils sont logés individuellement dans des boxes adjacents, agrémentés de jouets et sur une litière de copeaux de bois leur permettant d'exprimer leur comportement de fouissement. En cas de température inférieure à 10 degrés dans l'animalerie, un système de chauffage individuel est activé. L'administration des gélules se fait sous sédation légère afin de limiter le stress des animaux. De plus, le personnel animalier observe le comportement des porcs matin et soir lors de la distribution de la nourriture afin de repérer d'éventuels signes de mal-être ou de souffrance. Ces signes inhabituels sont immédiatement signalés au responsable de l'expérimentation. Les animaux qui présenteraient des signes de mal-être ou de souffrance seront soignés et si jugé nécessaire par le vétérinaire traitant retirés de l'essai.

18527 Chaque année 1,5 millions d'européens sont victimes d'un traumatisme crânien le plus souvent subit lors d'un accident de la route, d'une chute ou au cours de pratiques sportives. 70 000 personnes perdent la vie des suites du traumatisme et environ 100 000 ne présentent pas de récupération totale et demeurent handicapées, notamment chez les enfants et les jeunes adultes qui représentent une population particulièrement vulnérable en regard de ce type de traumatisme. Bien qu'au cours des dernières années un raffinement des procédures de prise en charge par les urgences et les hôpitaux a permis de réduire la mortalité des traumatisés crâniens, il est apparu qu'un grand nombre de patients souffrent par la suite de désordres chroniques invalidants tels que : épilepsie, dépression, démence progressive, etc. À ce jour, aucun traitement ne permet d'empêcher la mise en place de tels désordres à la suite d'un traumatisme crânien.

Le projet que nous avons développé vise à étudier les changements qui se mettent en place à la suite d'un traumatisme crânien (TC) au sein du cerveau et qui contribuent aux atteintes comportementales à long terme. Nous allons nous focaliser dans ce projet sur les atteintes des vaisseaux sanguins ainsi que sur les processus inflammatoires qui se mettent en place après un TC. Le caractère unique de ce projet est assuré par l'utilisation d'une technique innovante permettant d'imager les cerveaux de souris se comportant grâce à un mini-microscope qui sera implanté sur leur tête.

Notre équipe utilisera un modèle de traumatisme crânien (TC) chez la souris peu invasif, nous permettant d'étudier sur le long cours, à l'aide de tests comportementaux et d'outils d'imagerie innovants, les processus de neuroinflammation et de dégénérescence au niveau du système nerveux central avec une définition encore inaccessible chez l'homme.

De plus, ce modèle chez la souris nous permet de moduler le processus d'inflammation chronique du système nerveux central à l'aide d'une souche de souris transgénique et ainsi d'envisager le développement de nouveaux traitements.

Suite à l'induction du TC, les animaux (souris sauvages et transgéniques) seront implantés avec le système de base du microscope puis seront soumis à une évaluation comportementale permettant d'évaluer leurs capacités locomotrices, leur niveau d'anxiété et leur mémoire. De plus, les animaux réaliseront également une imagerie IRM à différents temps post-TC afin d'évaluer les éventuels dommages causés par le TC. A la fin de l'étude les animaux seront sacrifiés afin de réaliser des études cellulaires et moléculaires sur le cerveau.

Le projet respecte et applique les exigences de Remplacement, Réduction et Raffinement en matière d'expérimentation animale. Les procédures expérimentales décrites dans le projet impliquant le suivi longitudinal d'animaux réalisant des études comportementales et des imageries ont un caractère de stricte nécessité et ne peuvent être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information. Le projet concerne 406 souris. Ce nombre est réduit par l'utilisation d'un suivi longitudinal non invasif par imagerie et correspond au nombre minimum requis pour la réalisation de tests statistiques. Le projet s'appuie sur des méthodologies respectueuses du bien-être des animaux mises en œuvre uniquement par du personnel technique / de recherche formé et qualifié qui respecte la règle des 3R. Le bien-être des animaux est un facteur clé de la réussite du projet et pour le garantir, les animaux sont hébergés selon les standards prévus par la réglementation : en groupes sociaux, dans un environnement adapté et enrichi (matériel de nidification, rouleau en carton et barre à ronger). Des points limites en adéquation avec les besoins expérimentaux ont été déterminés afin d'éviter toute souffrance ou détresse des animaux. Les procédures de traumatisme crânien et d'implantation du microscope ont été validées par la vétérinaire désignée de l'établissement afin de garantir un protocole d'anesthésie/analgésie optimal ainsi que des soins post opératoires adaptés. Nous avons ainsi mis en place une surveillance accrue des animaux après induction du traumatisme afin de réagir et interrompre rapidement l'expérimentation si un animal montre des signes de souffrance.

18528 La qualité individuelle des individus peut avoir un impact important sur la descendance. L'étude de ces effets transgénérationnels est cruciale pour comprendre les parcours ontogéniques des individus et comprendre la manière dont les performances des individus peuvent être impactés par la qualité des soins parentaux qui leurs ont été prodigués par leurs parents lors de leur développement. Dans cette étude, nous visons à faire se reproduire des diamants mandarins et à suivre leur deux premières reproductions (lorsqu'ils sont des reproducteurs inexpérimentés (première reproduction) et expérimentés (deuxième reproduction)). L'objectif est de comprendre comment leurs propres conditions de développement et leur expérience de reproduction peut impacter leur descendance. Ces diamants mandarins sont issus d'une étude précédente qui a manipulé leurs conditions de développement (température d'incubation des œufs). Ce projet sera associé avec un suivi de la reproduction, un suivi de croissance et des prélèvements sanguins chez les poussins produits. Cette étude sera fondée sur l'utilisation de 30 couples de diamants mandarins qui seront suivis pendant deux cycles de reproduction et sur les 180 poussins qui en seront issus

(3 poussins par couple et par cycle de reproduction en moyenne). Ceci constituera en tout l'utilisation de 240 diamants mandarins. La règle des 3R a été prise en compte de la manière suivante. Remplacement : l'étude concerne spécifiquement la reproduction et les conditions de développement de cette espèce domestique, animal modèle pour les oiseaux nidicoles, pour laquelle la littérature disponible permet la bonne interprétation des résultats et la comparaison entre étude. Il n'est pas possible de remplacer. Réduction : Le nombre d'individus sera réduit au maximum (30 couples, 6 poussins par couples) pour permettre de détecter des différences significatives. Raffinement : l'angoisse associée aux procédures sera réduite au maximum (minimisation du temps de manipulation lors des prélèvements sanguins). Des observations comportementales adaptées seront utilisées pour détecter précocement les points limites. Un suivi journalier sera effectué dès l'entrée en procédure pour identifier les points limites (apparence physique, comportement, alimentation). Dès qu'une anomalie apparaîtra dans ce suivi journalier, l'individu fera l'objet d'un suivi plus poussé, le vétérinaire référent sera contacté, et les individus sortiront de procédure. Les prélèvements sanguins ne seront pas effectués dans ce cas. Ce suivi journalier sera démarré dès l'entrée en reproduction pour les adultes et dès l'éclosion pour les poussins. Il durera jusqu'à la fin du projet (fin de reproduction pour les adultes et indépendance des jeunes). Remplacement (4R) : les animaux seront remplacés suite à l'étude.

18529 La greffe d'îlots pancréatiques de Langerhans est une thérapie de remplacement cellulaire peu invasive permettant de traiter le diabète de type 1. La transplantation se fait par perfusion des îlots de Langerhans dans la veine porte.

Cela n'est pas sans risque et l'hémorragie est la complication la plus commune après une transplantation d'îlots de Langerhans; la 2ème complication la plus fréquente est la thrombose de la veine porte. Pour prévenir cela, un anticoagulant, l'héparine est typiquement ajoutée à l'instillation de cellules pancréatiques chez les patients transplantés dans le but de prévenir la thrombose de la veine porte, cependant, elle est associée à un risque accru d'hémorragie.

Le but de ce programme de recherche est de tester un médicament en développement ayant aussi bien une efficacité comme inhibiteur de la formation de caillots (anticoagulant) mais également comme inhibiteur de l'inflammation. L'intérêt de ce candidat médicament est que son utilisation n'augmenterait pas le risque de saignement inhérent aux anticoagulants utilisés dans ce type de soins médicaux. Il semble représenter une alternative prometteuse aux anticoagulants couramment utilisés lors de la transplantation d'îlots de Langerhans.

Aucune étude visant à étudier son effet sur la thromboprotection dans le cadre de la greffe d'îlots pancréatiques n'a été réalisée à ce jour.

Dans cette étude, nous ne pouvons pas "Remplacer" l'usage de l'animal car nous étudions des mécanismes physiologiques de thrombose suite à la transplantation. Le porc est un modèle de choix car la cascade de coagulation intervenant dans la formation de thrombi est très similaire à celle de l'Homme. Nous estimons le nombre de porcs nécessaires à 35 individus. Nous avons réduit au minimum le nombre d'animaux ("Réduire") sans en faire souffrir les statistiques. Le "Raffinement" est envisagé en réalisant un maximum de tests et de prélèvements tissulaires par individu ainsi qu'en étant attentif à leur bien-être en utilisant des traitements analgésiques avant, pendant et après toute chirurgie ainsi qu'à leur conditions d'hébergement. Nous ne pouvons pas "Remplacer" l'usage de l'animal car nous étudions des mécanismes physiologiques complets (cascade de coagulation).

18530 La Tomographie par Emission de Positons (TEP) est une technique d'imagerie fonctionnelle utilisée couramment par les services de médecine nucléaire. Après l'administration intraveineuse d'une molécule radio-marquée (radiopharmaceutique ou radiotraceur), cette technique aide au diagnostic et à l'évaluation de stratégies thérapeutiques, principalement en oncologie, neurologie et cardiologie. Cependant, le nombre de radiotraceur disponible reste faible et seul le [18F]-FDG est utilisé régulièrement en milieu hospitalier. Notre équipe, à l'interface de la chimie-radiochimie et de la biologie, développe de nouveaux radiopharmaceutiques à partir de petites molécules hétérocycliques marqués au fluor-18 (18F), ou au carbone-11 (11C) et destinés à la recherche clinique et préclinique en imagerie TEP. Ces travaux sont d'un intérêt majeur et permettent de

fournir aux chercheurs et médecins des radiotraceurs toujours plus performants (diagnostic plus précis, suivi thérapeutique, aide au développement de candidats médicaments, ...).

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

Pour comprendre le devenir d'un radiopharmaceutique dans un organisme vivant, les essais *in vitro* sont pour l'instant très insuffisants, en raison de la grande complexité des processus physiologiques en jeu, et les évaluations ne peuvent se faire que sur l'animal vivant. Cette demande d'autorisation porte sur l'étude du comportement de radiopharmaceutiques innovants dans l'organisme, c'est à dire leurs pharmacocinétiques (cinétiques de distribution, de métabolisation et d'élimination). Ces travaux préliminaires sont une première étape indispensable à l'évaluation d'un nouveau radiotraceur et permettent de vérifier la faisabilité technique de l'utilisation d'un composé en imagerie TEP avant de débiter des études de plus grande envergure, faisant appel à des modèles animaux de pathologie ou pour des études de pharmacologie plus poussées et qui feront alors l'objet de demandes d'autorisation d'expérimentation dédiées.

Tous les animaux sont hébergés en animalerie conventionnelle respectant leurs besoins physiologiques et comportementaux. Un radiotraceur devant, par définition, être formulé en solution injectable et administré à dose « traceuse », c'est à dire sans effets biologiques ou radiologiques, aucune douleur n'est attendue suite à son administration. Les caméras μ TEP/ μ TDM et μ TEP/ μ IRM ainsi que l'ensemble de l'environnement technique sont adaptés aux rongeurs, permettant ainsi d'étudier *in vivo* le devenir d'une molécule tout en respectant leurs besoins physiologiques. Cette technique d'imagerie permet de valider un nouveau radiopharmaceutique avec un nombre limité d'animaux, en réduisant fortement le besoin de recourir aux méthodes *ex vivo*. Afin de limiter leurs mouvements durant l'imagerie, les animaux seront anesthésiés par voie gazeuse avec un monitoring de température et un suivi de la fréquence respiratoire. Les mises à mort, en fin de protocoles expérimentaux, se font par du personnel qualifié sous overdose d'anesthésie gazeuse.

Avec 4 radiotraceurs en cours de développement, nous estimons nos besoins pour les 2 ans à venir à 32 souris SWISS males et 32 rats Wistar males. La souris présente l'avantage de pouvoir être imagée en intégralité (corps entier) dans notre caméra TEP, ce qui est particulièrement intéressant pour étudier globalement la distribution d'un nouveau radiotraceur. La taille plus importante du rat permet d'imager des parties du corps plus petites, comme les structures cérébrales. Cependant, les composés radio-marqués ne seront testés *in vivo* que si nos travaux en chimie/radiochimie aboutissent à une méthode de production fiable et reproductible, ce qui peut fortement réduire le recours aux animaux en cas d'échec. Cette demande d'autorisation sera renouvelée tous les 2 ans afin d'adapter le nombre d'animaux, l'espèce, voire la souche et le sexe en fonction des projets à venir.

Pour chaque molécule étudiée, nous suivons la démarche suivante :

- la procédure 1 a pour objectif l'obtention de la cinétique de distribution dans les organes d'intérêt par imagerie TEP. Par exemple, dans le cadre d'un projet étudiant une cible cérébrale, une attention particulière sera portée sur la capacité du composé à traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE). Cette méthode d'imagerie permet aussi d'évaluer la cinétique d'élimination du composé.
- la procédure 2 permet de compléter les données d'imagerie TEP par des travaux *ex-vivo* (administration du radiotraceur puis mise à mort à un temps donné pour prélever des échantillons). D'abord, par l'étude de la cinétique de métabolisation (l'imagerie ne permet pas de différencier le composé parent d'éventuels métabolites), puis par de la dissection (organes hors champ de vue de la caméra, structures cérébrales, ...) ou de l'autoradiographie sur coupes histologiques.

En cas d'échec durant l'une des étapes, le projet prendra fin, réduisant ainsi fortement le nombre d'animaux utilisés. Ces études étant préliminaires, les résultats scientifiques nécessitent d'utiliser un nombre restreint d'animaux par condition expérimentale (5 maximum) pour que les tests statistiques soient valides, représentatifs d'éventuelles variations interindividuelles, et permettant d'appliquer des tests paramétriques (ANOVA puis test Post Hoc) suivant le principe de réduction du nombre final d'animaux à utiliser.

18531 L'impossibilité de traiter des infections causées par des bactéries résistantes à l'ensemble des antibiotiques disponibles est devenue une réalité, et essayer de contrôler l'émergence et la dissémination de ces multi-résistances est l'un des enjeux prioritaires de santé publique. Cette émergence est entre autre expliquée par l'acquisition, par les pathogènes, de gènes de résistances présents sur des molécules d'ADN dites mobiles, capables d'être transférées entre souches ou même espèces bactériennes différentes. Les filières d'élevage d'animaux de rente sont considérées comme de fortes contributrices de cette émergence, de par leur consommation importante d'antibiotiques. Ainsi, les flores bactériennes (microbiotes) des animaux étant régulièrement exposées aux antibiotiques, elles ont accumulé les gènes de résistance mobiles et pourraient faire office de réservoir pour les agents pathogènes zoonotiques.

Toutefois, malgré de nombreuses études démontrant cette accumulation, les bactéries porteuses de ces gènes restent à ce jour inconnues, de même que la fréquence à laquelle se font les échanges de gènes au sein du microbiote.

Le présent projet a pour objectif de déterminer les espèces bactériennes du microbiote intestinal aviaire capables d'acquérir un vecteur mobile de résistance donné, et à quelle fréquence. Des poussins seront infectés en début de vie avec une bactérie de laboratoire porteuse d'un vecteur de résistance marqué, et les bactéries ayant acquis ce vecteur seront identifiées tout au long de la vie des animaux par des méthodes de culture bactérienne et des méthodes de séquençage haut débit sans culture préalable. Un total de 66 animaux au maximum sera utilisé, répartis en deux expérimentations.

Ces expérimentations répondent aux exigences de la règle des 3 R :

Remplacement : A ce jour, il n'existe pas de modèle ex vivo capable de reproduire la complexité de la communauté microbienne intestinale des animaux. L'étude des échanges de gènes de résistance au sein du microbiote aviaire ne peut donc se faire que via des expérimentations animales.

Réduction : Le nombre d'animaux est réduit au minimum statistique possible, avec l'incertitude inhérente au caractère pilote de ce projet.

Raffinement : Les animaux seront maintenus dans des hébergements adaptés en taille, dans des conditions environnementales contrôlées, avec nourriture et boisson à volonté. Ils bénéficieront d'un enrichissement social et comportemental systématique. La bactérie utilisée pour l'infection engendre a priori un portage asymptomatique, donc sans douleur, et aucune procédure n'est considérée comme douloureuse pour l'animal. Il n'y a donc pas de disposition particulières à prendre pour réduire la douleur. L'apparition de signes cliniques d'infection sera toutefois surveillée.

18532 La mise à contribution de modèles animaux mutés pour une protéine permet l'investigation de l'utilité de la fonction de cette protéine dans l'organisme étudié. Les modèles génétiquement modifiés disponibles actuellement sont limités à quelques espèces dont une grande majorité de souris et de rats. Malheureusement, ces animaux n'étant pas des espèces considérées comme saisonnières, ils ne sont pas adaptés à l'étude des rythmes saisonniers pour lesquels les recherches sont plus que jamais d'actualité. Effectivement, les travaux sur la saisonnalité, bien que peu nombreux, sont d'une utilité majeure pour le domaine agro-économique dans lequel les débats sur la suppression des traitements hormonaux pour les productions issues d'animaux d'élevage prennent de plus en plus d'importance. Ces productions (viande, lait, œufs, fromage) étant souvent dépendantes de la saison, la compréhension des mécanismes par lesquels les contraintes environnementales agissent sur les fonctions biologiques des espèces est donc nécessaire pour la création d'élevages non traités. Par ailleurs, de plus en plus d'études montrent l'importance des variations saisonnières et de leur impact physiologique chez l'humain. L'étude de l'intégration de ces facteurs saisonniers dans le système nerveux constitue donc un premier pas vers une meilleure connaissance des mécanismes par lesquels l'humain est affecté par les variations annuelles de facteurs tels que la lumière ou la température. Le hamster étant le modèle de rongeur saisonnier le mieux caractérisé, nous souhaitons donc développer des modèles de hamster génétiquement modifiés permettant une étude approfondie de la fonction de certaines protéines impliquées dans la saisonnalité.

Le système CRISPR Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) est un outil permettant de couper l'ADN à un endroit ciblé du génome dans un embryon qui est ensuite transféré chez une mère porteuse. Les embryons manipulés, pour être génétiquement modifiés, sont produits par super-ovulation de femelles. Cette super-ovulation est pratiquée par injection d'hormones (pour augmenter le nombre d'ovocytes produits naturellement). Cette technique permet de réduire le nombre de femelles nécessaire pour la création d'une lignée transgénique. Ces embryons sont ensuite manipulés pour produire des animaux génétiquement modifiés et transférés dans une femelle mère-porteuse de la même espèce par une intervention chirurgicale. Les petits, nés des mères-porteuses, sont ensuite analysés pour identifier les individus transgéniques. Le génome du hamster syrien étant connu, les contrôles de spécificité de la lésion du gène cible pourront être réalisés. L'utilisation de la technique du CRISPR cas9 est donc adaptée pour la génération de lignées de hamsters Syriens mutés pour des gènes cibles. Ces nouveaux modèles nous permettraient d'avancer dans la compréhension de certains mécanismes impliqués dans la saisonnalité et l'utilisation du CRISPR Cas9 chez le hamster pourrait apporter des informations techniques importantes pour la génération future de mutations génétiques chez des espèces non-conventionnelles.

Néanmoins cette technique nécessite de nombreuses étapes de manipulation des embryons et il a été montré que les embryons de hamster sont très sensibles aux variations de leur environnement (pH, lumière, température, niveau d'oxygène. . .). Récemment une autre approche méthodologique, le i-GONAD est venue proposer une alternative à la technique du transfert d'embryons. Cette méthode consiste à introduire le système CRISPR par électroporation in vivo directement dans l'oviducte. Les embryons électroporés protègent des variations environnementales dans l'oviducte intégreront alors la séquence CRISPR et pourront alors être modifiés génétiquement. Bien que cette technique n'ait pas été éprouvée sur le hamster syrien, si elle était réalisée avec succès elle pourrait représenter un raffinement du projet en diminuant drastiquement le nombre d'animaux utilisés.

Nous porterons une attention particulière aux aspects éthiques de la recherche expérimentale sur animaux. REMPLACER : Les mécanismes saisonniers font intervenir des voies de signalisation complexes dans différents types cellulaires, tissus et organes, nous empêchant donc de travailler sur un modèle in vitro en remplaçant les animaux par des cellules isolées.

REDUIRE : Il a été montré dans la littérature que ce système, comparé à d'autres permet de réduire le temps et le nombre d'animaux utilisés pour la génération de modèles mutés. De plus, afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, nous nous entourons d'une équipe compétente ayant l'habitude du matériel et de la technique que nous utiliserons pour réduire le nombre de tests nécessaires à la mise au point de chaque étape. Toutes les estimations pourront être revues à la baisse concernant le nombre d'animaux si leur nécessité pour l'expérience n'était pas justifiée.

Nous avons établi qu'un total de maximum 1450 hamsters Syriens. RAFFINER : En termes de raffinement, les hamsters seront hébergés dans des cages avec de l'eau et de la nourriture ad libitum, le milieu sera enrichi avec du matériel de nidation et un barreau à ronger. Ce projet nécessite des approches invasives, une attention particulière sera donc portée à la réduction de la douleur et du stress des animaux tout au long de l'expérience (habituation à l'expérimentateur, anesthésiques, analgésiques), d'autant plus qu'un stress excessif ou une douleur prolongée pourraient limiter l'implantation des embryons modifiés chez les femelles, compromettant ainsi l'expérience. L'état de santé des animaux sera évalué à l'aide d'une grille de score de la douleur et des points limites ont été établis permettant d'interrompre les procédures à tout moment et ainsi de réduire la souffrance animale.

18533 La Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) est la maladie musculaire la plus fréquente chez l'enfant avec une prévalence d'environ 1 garçon sur 5 000 à la naissance. Elle est due à une mutation sur le gène *Dmd* situé sur le chromosome X qui code la protéine Dystrophine, indispensable au maintien de l'intégrité des fibres musculaires. L'absence de Dystrophine entraîne une fragilisation des muscles à chaque contraction et donc une dégénérescence musculaire progressive. La DMD se traduit dans un premier temps par une faiblesse musculaire importante des membres inférieurs, puis, la faiblesse musculaire atteint les membres supérieurs. L'atteinte du

diaphragme entraîne également une défaillance respiratoire. Avec le progrès de la prise en charge multidisciplinaire, l'espérance de vie des patients s'est considérablement allongée. Cependant, l'apparition inéluctable d'une cardiomyopathie dilatée, entraînant une insuffisance cardiaque, reste responsable d'une majorité de décès des patients avant l'âge de 30/40 ans. A ce jour, la prise en charge symptomatique et préventive de la défaillance cardiaque reste insuffisante pour obtenir une stabilisation de la maladie et il n'existe aucune solution thérapeutique satisfaisante. Il est donc primordial de développer un traitement pour l'atteinte cardiaque chez le patient DMD.

La thérapie génique est une des approches prometteuses pour le traitement de la DMD. L'efficacité thérapeutique passe par le transfert dans les muscles (squelettiques et cardiaque), à l'aide d'un vecteur viral recombinant dérivé du virus adéno-associé (AAVr), d'un gène thérapeutique. La très grande taille du gène de la dystrophine empêche son insertion complète dans un vecteur AAVr (capacité maximale d'encapsidation = 4,7kb). Il est cependant possible d'utiliser comme gène thérapeutique une copie miniaturisée du gène de la dystrophine humaine, capable de remplacer le gène déficient et de produire une protéine «microDystrophine » fonctionnelle. Un grand nombre de microDystrophines différentes peuvent être générées, selon les domaines de la protéine Dystrophine qu'elles contiennent. Selon leur structure, les microDystrophines vont être plus ou moins stables dans les tissus et surtout vont plus ou moins interagir avec des partenaires essentiels à sa fonction dans les cellules musculaires, et donc être plus ou moins thérapeutiques.

L'objectif de ce projet est de réaliser une étude pilote afin d'évaluer la tolérabilité et l'efficacité d'expression de produits de thérapie génique codant pour 5 types différents de transgènes microDystrophines, après injection intraveineuse chez la souris mdx, modèle murin de la DMD. La tolérabilité sera évaluée par une observation bi-quotidienne des animaux, ainsi que par le suivi hebdomadaire de leur poids. Les animaux seront sacrifiés à 4 ou 12 semaines post-injection (selon les groupes expérimentaux) afin de réaliser des analyses post-mortem (expression et restauration du complexe protéique associé à la Dystrophine) sur les tissus musculaires (dont le cœur). Le modèle de la souris mdx ne présentant que peu de symptômes phénotypiques de la DMD, notamment au niveau cardiaque, il n'y aura pas d'évaluation de l'efficacité thérapeutique de ces microDystrophines dans cette étude. Par contre, les résultats de tolérabilité et d'expression obtenus dans ce modèle simple nous permettront de sélectionner les 2 constructions les plus efficaces (en terme de tolérabilité, expression, stabilité de cette expression et restauration du complexe protéique associé à la Dystrophine), afin d'ensuite tester leur efficacité thérapeutique dans un autre modèle animal de la DMD, présentant un phénotype DMD marqué, et cela avec un nombre d'animaux plus important par groupe expérimental afin d'assurer la robustesse de ces évaluations phénotypiques. Cette seconde étude fera l'objet d'une autre demande d'autorisation de projet.

Dans ce projet, nous incluons un maximum de 72 souris mdx (60 + 12 animaux de remplacement si nécessaire (1/groupe)) avec un nombre de 5 animaux par groupe expérimental, afin de tester la tolérabilité et l'expression des 5 constructions microDystrophines différentes, à 2 temps post-injection.

Dans le respect de la règle des 3R, nous REDUIRONS le nombre d'animaux à 5 souris par groupe. Ce nombre d'animaux par groupe est basé sur notre expérience précédente de protocoles de thérapie génique lors desquels nous avons pu obtenir des résultats cohérents et reproductibles dans des groupes de cette taille, pour les analyses de tolérabilité et d'expression qui seront réalisées ici. Cela semble être un nombre minimal qui permette d'assurer la robustesse des résultats sans qu'il soit excessif en terme d'animaux à inclure. Une analyse statistique sera réalisée, en utilisant des tests non paramétriques de type Kruskal- Wallis.

D'autre part, l'identification des constructions les plus efficaces, cette étude pilote permettra de REDUIRE le nombre total d'animaux qui seront à inclure dans l'étude qui suivra et qui visera à évaluer l'efficacité thérapeutique des 2 meilleures constructions dans un autre modèle animal de la DMD, présentant un phénotype DMD marqué. En effet, tester d'emblée l'efficacité thérapeutique des 5 constructions différentes dans cet autre modèle animal aurait demandé l'inclusion d'un nombre très important d'animaux, supérieur au nombre qui sera inclus au total via ces 2 études.

Ce projet utilise des animaux sans phénotype dommageable, ne fait intervenir que des procédures légères et se termine par l'euthanasie des animaux. Malgré tout, nous RAFFINERONS cette étude par:

- 1) de bonnes conditions d'hébergement selon la réglementation en vigueur avec un enrichissement du milieu (mise à disposition de tunnels en cartons ou PVC, frisottis de papier, bûchettes de bois et hébergement à deux animaux dès que possible).
- 2) un suivi régulier des animaux (observations biquotidiennes, pesées régulières, analyse du comportement)
- 3) l'instauration de points limites pertinents et la mise en place de mesures adaptées si nécessaire (anesthésies, traitements analgésiques ou autre, ou euthanasie si pas d'autre alternative)
- 4) afin d'améliorer la réactivité du personnel animalier, une grille de scoring de la douleur sera mise en place dès que celle-ci s'avère nécessaire afin de pouvoir détecter précocement tout point limite et mettre en place les actions adéquates (cf. exemple en annexe de la saisine).
- 5) la mise en place de mesures adaptées en fonction des procédures expérimentales (anesthésie et analgésie si nécessaire).

Le REMPLACEMENT d'animaux ne sera pas possible dans cette étude, car il n'existe pas aujourd'hui de méthode alternative pour tester l'effet d'un traitement de thérapie génique in vivo. L'animal est le seul organisme vivant permettant d'étudier l'impact d'un transfert de gène dans différents types cellulaires (différents organes) et sur le long terme (plusieurs semaines et mois après injection).

18534 L'amélioration de l'efficacité alimentaire est un enjeu économique et environnemental majeur de la filière porcine. Il permet une réduction de la part du coût alimentaire dans le coût de production des animaux. Une meilleure utilisation des aliments par les animaux permet une réduction de l'impact environnemental de l'élevage, par la diminution des rejets (urine et fèces). Depuis 2000 une expérience de sélection a permis de créer 2 lignées porcines divergentes pour leur efficacité alimentaire.

La présente demande concerne l'hébergement des truies et de leurs petits. En effet les surfaces d'hébergement en conditions expérimentales et en élevages agricoles sont différentes. Il est nécessaire pour cette expérience de sélection d'élever et de tester les porcs dans les conditions d'hébergement en élevages standards, et non dans des conditions d'hébergement de type expérimentation animale, pour obtenir des résultats utilisables sur le terrain par les éleveurs. La procédure de testage et de sélection ne nécessite pas de prélèvements ni de contention spécifique engendrant une douleur ou un inconfort des animaux. Il s'agit d'élever ces animaux comme ils le seraient dans une ferme classique, soit par exemple avec une surface de 0,4m²/porc de 40kg, au lieu de 0,7 m² en élevage expérimental.

Afin d'observer de la variabilité entre les porcs, de sélectionner ceux à performances particulièrement élevées ou particulièrement faibles et de mesurer les effets de la sélection sur les performances, un nombre élevé de porcs doit être produit. Dans ce dispositif, il s'agit de 2592 porcelets par an, plus leurs parents, soit 12960 porcs (5 x 2592 porcelets + 102 parents tous les 2,08 ans) pour la durée de 5 ans couverte par cette demande.

La règle des 3R est prise en compte dans ce projet :

-Remplacer : par nature, le projet concerne l'espèce porcine. Les résultats de ces études sont cependant communiqués plus largement que dans la communauté porcine, servant en particulier pour d'autres productions de monogastriques en croissance (lapins, volaille).

-Réduire : l'effectif total d'animaux est élevé, pour observer une grande variabilité des performances et maintenir la diversité génétique de la population. Nous ne pouvons le réduire, mais aucun prélèvement invasif n'est appliqué à ces animaux.

-Raffiner : De façon à favoriser le bien-être des animaux, tout en respectant le type de conduite classique utilisé en élevage, des procédures d'élevage sont mises en œuvre dans l'établissement utilisateur: les truies gestantes sont conduites en larges groupes sans contrainte, avec

enrichissement par des chaînes fixées au sol, des zones chauffées sont organisées pour limiter la déperdition de chaleur des jeunes porcs après la naissance et après le sevrage, les porcs en croissance bénéficient d'enrichissement (chaînes, bois à ronger) etc.

18535 L'insuffisance cardiaque (IC), stade ultime de presque toutes les maladies cardiaques, est un syndrome de plus en plus répandu où la pompe cardiaque n'est plus capable d'assurer un débit sanguin suffisant pour satisfaire les besoins de l'organisme. En tant que principale cause des décès d'origine cardiovasculaire dans les pays occidentaux, l'IC représente donc un problème majeur de santé publique associé à des taux de mortalité et de morbidité élevés. Des estimations récentes suggèrent qu'il y a vingt-six millions de patients atteints d'IC dans le monde et plus d'un million et demi de personnes atteintes de ce syndrome rien qu'en France. Malgré une prise en charge efficace et d'importantes avancées thérapeutiques, la mortalité reste élevée, près de la moitié des patients souffrant d'IC décèdent dans les cinq ans suivant le diagnostic. Les traitements actuels ne permettent toujours pas de soigner la dysfonction du myocarde et ne font à ce jour que retarder l'avancée de la pathologie et doivent donc être améliorés pour, à terme, permettre une guérison complète des patients et éviter le recours à la transplantation cardiaque. La cause principale de l'IC gauche est l'hypertension artérielle (HTA) chronique mal contrôlée alors que pour l'IC droite c'est l'hypertension pulmonaire (HTP). En tant que syndrome clinique multifactoriel, l'IC représente encore une menace épidémique, soulignant la nécessité de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires responsables de la détérioration de la fonction ventriculaire gauche et droite afin de développer des stratégies thérapeutiques innovantes et curatives. La dérégulation du Ca²⁺ intracellulaire est une des causes majeures de la dysfonction de la pompe cardiaque. C'est pourquoi, ce projet vise à étudier et comprendre le rôle de la protéine STIM1L à l'aide d'une souris génétiquement modifiée pour le gène *stim1l* puisque STIM1L a été précédemment identifiée comme un des acteurs impliqués dans la dysfonction ventriculaire lors du développement d'une IC gauche et droite suite à une hypertension artérielle et pulmonaire. Malgré les avancées dans le domaine de l'expérimentation animale, l'utilisation d'animaux reste indispensable à l'évaluation de la fonction cardiovasculaire et ne peut malheureusement pas être remplacée par des méthodes alternatives telles que les cultures cellulaires (les cellules cardiaques ne se divisent pas). De plus, le prélèvement de tissus ventriculaires sur des patients malades est très risqué, il est donc indispensable de pouvoir réaliser ces expériences sur des animaux. Toutes les procédures présentées dans ce projet sont conçues pour respecter le principe des 3R (Réduction, Raffinement, Remplacement) et ont été minutieusement planifiées de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en préservant la validité statistique de l'étude et en conservant une puissance statistique suffisante pour observer un effet. Les fonctions cardiovasculaires sur l'animal entier adulte seront étudiées, tant que cela est possible, par des méthodes non invasives (échocardiographie) permettant de limiter le nombre d'animaux utilisés et les animaux seront euthanasiés en fin d'expérimentation selon des méthodes reconnues par la législation en vigueur. Dans le but de minimiser encore le nombre d'animaux intégrés dans l'étude, les tissus prélevés en phase terminale seront partagés et répartis de manière à multiplier les analyses effectuées sur chaque animal. Pour cette étude, une IC gauche et droite sera induite chez des souris selon un protocole maîtrisé de longue date au laboratoire qui respecte les procédures de bien-être animal et limite la souffrance par le respect des méthodes anesthésiques et analgésiques. Les animaux seront surveillés quotidiennement et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer que les animaux ne subissent aucun stress. Afin d'améliorer leurs conditions d'hébergement, leur environnement sera enrichi au moyen de dispositifs dont l'efficacité est désormais largement reconnue. Le nombre total de souris utilisées sera de 396 sur l'ensemble de l'étude en combinant plusieurs approches expérimentales par différents expérimentateurs sur le même animal. Des expériences de biochimie, de biologie moléculaire et de physiologie cellulaire à partir des différents tissus collectés et des cellules isolées à partir des organes seront effectuées dans la mesure du possible afin de réduire le nombre d'animaux utilisés. A l'heure actuelle les mécanismes responsables du développement de l'IC gauche et droite suite à l'hypertension artérielle et pulmonaire sont mal connus, c'est pourquoi nous allons utiliser pour ce projet un modèle unique au monde de souris génétiquement modifiées pour

le gène *stim1* afin d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans la dysfonction ventriculaire gauche et droite.

18536 Les maladies de gencive – parodontites - sont des pathologies inflammatoires d'origine infectieuse très répandues dans la population mondiale. Elles se caractérisent par une infection et une inflammation des tissus de soutien des dents (gencive, os) aboutissant au déchaussement et à la perte des dents. Depuis de nombreuses années, il est démontré que ces pathologies peuvent influencer la santé générale en favorisant l'initiation et le développement de pathologies telles que les maladies cardio-vasculaires, la polyarthrite rhumatoïde ou le diabète.

L'objectif de ce projet est d'évaluer le rôle joué par certaines bactéries parodonto-pathogènes telles que *Porphyromonas gingivalis* dans le développement de maladies systémiques et l'activation de la réponse inflammatoire et immunitaire. Un des mécanismes proposé comme étant induit par l'infection serait associé à la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires pouvant être portés par des microvésicules, celles-ci pouvant par effet paracrine, entraîner l'activation du recrutement de cellules immunitaires. Les données recueillies concernant l'effet induit par l'infection permettront de mieux comprendre les mécanismes impliqués à la fois dans le développement des maladies parodontales et des pathologies associées afin de pouvoir, par la suite développer de nouvelles thérapeutiques. L'ensemble de ce projet utilisera au maximum 180 souris sur la période de 5 ans.

Remplacement : Cette approche in vivo permettra de confirmer les résultats obtenus par l'approche in vitro ayant permis de mettre en évidence des preuves de concept et l'identification de nouveaux mécanismes moléculaires associant bactériémie et maladies systémiques car il n'est pas possible de reproduire de manière fidèle la complexité des interactions tissulaires et cellulaires des tissus entourant les dents in vitro. Un modèle expérimental d'injection intra-péritonéale permettra de mimer la situation clinique observée à savoir la bactériémie associée aux parodontites.

Réduction : Le nombre d'animaux sera réduit par l'emploi de méthodes statistiques adaptées. Les mécanismes seront dans un premier temps évalués in vitro dans des cultures cellulaires pour déterminer les cibles d'intérêt physiopathologiques et thérapeutiques.

Raffinement : Le raffinement se fera par une prise en compte du bien-être animal (enrichissement du milieu comprenant la mise à disposition de languettes de papier et d'un large tube en carton. Ce tube est utilisé comme refuge ou bien déchiqueté par les rongeurs comme substrat permettant, en complément des languettes de papier et de la litière, la composition d'un nid et soins quotidiens aux animaux) et par l'établissement de points limites permettant de limiter la douleur et la souffrance de l'animal.

18537 Les odeurs sont captées dans la cavité nasale par des neurones sensoriels qui transmettent cette information au cerveau dans une région appelée le bulbe olfactif. Dans le bulbe olfactif, les interneurones inhibiteurs sont largement plus nombreux que les neurones principaux excitateurs. L'inhibition bulbaire joue donc vraisemblablement un rôle crucial dans l'élaboration de la perception des odeurs. Il est donc important de décrire la diversité des interneurones inhibiteurs du bulbe olfactif et de comprendre les implications fonctionnelles de cette diversité. Les neurones appelés cellules périglomérulaires (PG) constituent une des grandes familles d'interneurones bulbaires et regroupent plusieurs sous-types différents jusqu'ici peu étudiés. L'objectif de nos recherches est d'identifier les divers types de cellules PG, de décrire leurs propriétés et de comprendre le rôle de chaque type au cours du traitement central des odeurs. Pour ce faire nous avons au cours des dernières années adopté deux stratégies: soit nous avons étudié directement un sous-type spécifique de cellules PG identifiable et manipulable dans une lignée de souris génétiquement modifiés, soit nous avons utilisé d'autres animaux transgéniques nous permettant de stimuler sélectivement les neurones qui régulent l'activité électrique de chaque sous-type de cellule PG.

Dans ce cadre, la version initiale du projet autorisée en janvier 2017 pour une durée de 4 ans prévoyait trois procédures nécessitant l'agrément du comité d'éthique : (1) des injections stéréotaxiques de constructions virales dans le bulbe olfactif ou dans le télencéphale basal de souris. (2) des électroporations de constructions virales dans les cellules souches de la zone sous-ventriculaire de souris nouveaux nés et (3) des enregistrements électrophysiologiques sur la souris

adulte anesthésiée. Un total de 540 souris avait été jugé nécessaire pour accomplir ce projet. A ce jour, seules les procédures (i) et (ii) ont été mis en œuvre sur un total de 260 souris.

Cet avenant est demandé pour une prolongation de 1 an nécessaire pour terminer la description d'une population de cellules PG jusqu'alors ignorée. Nos travaux nous ont permis de découvrir que ces cellules PG sont contrôlées à la fois par des neurones GABAergiques et par des neurones cholinergiques localisés dans le télencéphale basal, plus précisément dans un noyau appelé la branche horizontale de la bande diagonale de Broca (ou HDB). Ce projet repose uniquement sur des injections stéréotaxiques de constructions virales dans la HDB de souris transgéniques (procédure 1, adaptée pour cet avenant avec ajout d'une nouvelle lignée), afin d'induire dans les neurones de la HDB l'expression de molécules photo-activables qui pourront être stimulés sélectivement par la lumière. Cette approche expérimentale permet de stimuler sélectivement les neurones de la HDB qui projettent vers le bulbe olfactif. Les souris transgéniques utilisées permettent une infection virale conditionnelle soit des neurones GABAergiques de la HDB, soit des neurones cholinergiques.

Les injections seront réalisées sur des souris transgéniques âgées de 3 à 8 semaines et 2-3 semaines plus tard il sera possible d'étudier sur des tranches aigues de bulbe olfactif la réponse des cellules PG à une stimulation optique des axones en provenance de la HDB. Un maximum de 50 souris est estimé nécessaire pour terminer le projet. Donc sur la durée du projet, le nombre total d'animaux utilisés sera au maximum de 590.

Les injections stéréotaxiques dans le cerveau sont des procédures invasives dont nous avons une parfaite expertise. Pour réduire le stress ou la souffrance des souris, la procédure chirurgicale est réalisée sous anesthésie générale et analgésie, à température corporelle stable et contrôlée. Notre approche expérimentale vise aussi à réduire le nombre d'animaux utilisés. En combinant optogénétique et expression conditionnelle dans des souris transgéniques nous cibons génétiquement les populations de neurones que nous voulons stimuler précisément et spécifiquement. Une stimulation à l'aveugle, en absence de ciblage spécifique, compliquerait l'interprétation des résultats et nécessiterait d'utiliser davantage d'animaux.

Ces expériences sur l'animal ne peuvent pas être remplacées. Notre étude impose de conserver l'organisation, la diversité neuronale et surtout l'intégrité des connections neuronales ce qui justifie l'utilisation du modèle animal. La complexité de ce réseau neuronal encore méconnu ne peut pas être reproduite in vitro ou modélisée in silico.

Pour raffiner notre procédure, les souris sont hébergées en cage collective avec enrichissement (matériel de nidification et bâton à ronger). Après réveil, les souris sont hébergées avec leur congénères dans une cage enrichie. L'état de santé des animaux est surveillé quotidiennement après la procédure chirurgicale et estimé selon une grille de score pondérée. Des points limites prédictifs ont été établis permettant d'interrompre les procédures limitant ainsi la souffrance animale.

18538 La dépendance à la nicotine demeure un problème majeur de santé publique dans le monde entier, et les traitements pour les fumeurs qui veulent arrêter de fumer ne restent que marginalement efficaces. L'usage de la nicotine peut entraîner une dépendance par le biais de processus complexes qui sont régulés à la fois par ses effets récompensants et par ses effets aversifs. En fait, les humains comme les animaux de laboratoire régulent leur consommation de nicotine lorsqu'ils s'auto-administrent de la nicotine, en jouant sur cette balance renforcement/aversion. L'effet primaire de la nicotine sur le système nerveux central est d'activer les récepteurs de la nicotine, modifiant ainsi l'activité électrique des neurones. Il existe de nombreux types de récepteurs de la nicotine, qui ont des propriétés biophysiques et des distributions tissulaires variées. Identifier et comprendre le rôle spécifique de certains types de récepteurs et de certaines voies neuronales dans la transmission des effets récompensants et aversifs de la nicotine est crucial à la compréhension des mécanismes de la dépendance au tabac et au développement de nouvelles thérapies.

Le but de ce projet est 1) d'identifier les voies neuronales et les récepteurs nicotiniques impliqués dans la régulation de la consommation de nicotine (renforcement et aversion) ; 2) de caractériser par électrophysiologie ex vivo et in vivo les modifications moléculaires et cellulaires de ces voies suite à une exposition à la nicotine soit aiguë (injections) soit chronique (mini-pompes osmotiques ou eau de boisson) et 3) de manipuler en ligne la consommation de nicotine, en ciblant les récepteurs et voies neuronales impliqués.

Pour cela nous utiliserons des souris normales et des souris transgéniques qui permettent d'affiner l'étude. Notamment, certaines souris permettent de cibler l'expression des récepteurs modifiés dans un sous-type de neurone ; ces souris sont classiquement utilisées dans les laboratoires et n'ont aucun phénotype dommageable. Nous utiliserons également des souris invalidées pour un certain type de récepteur de la nicotine, qui n'ont aucun phénotype dommageable. Enfin, nous utiliserons des souris transgéniques récemment produites par le laboratoire, qui permettent de contrôler l'activité des récepteurs nicotiniques avec la lumière. Ces souris consistent en une mutation ponctuelle des gènes codant les récepteurs nicotiniques, mutation qui permet de rendre le récepteur photo-contrôlable, mais qui ne modifie pas son fonctionnement normal. Ces souris n'ont pas encore été phénotypées, mais nous n'anticipons pas de phénotype dommageable. La nécessité de travailler sur animaux vivants s'explique par le fait que la nicotine agit de concert sur un ensemble de circuits neuronaux distincts, mais néanmoins connectés. De plus, les comportements addictifs tels le renforcement, la consommation ou l'aversion ne peuvent s'étudier que chez l'animal vivant.

Nous nous focaliserons principalement sur les voies neuronales impliquées dans le renforcement et l'aversion. Pour l'ensemble des conditions, nous estimons que nous utiliserons 1120 animaux pour ce projet qui s'étend sur 5 ans. La nécessité de travailler sur animaux vivants s'explique par le fait que la nicotine agit de concert sur un ensemble de circuits neuronaux distincts, mais néanmoins connectés. De plus, les comportements addictifs tels le renforcement, la consommation ou l'aversion ne peuvent s'étudier que chez l'animal vivant. Le choix des animaux se justifie par la présence d'un circuit de l'addiction très similaire à celui de l'Homme, ce qui n'est pas le cas chez les invertébrés, les poissons ou les oiseaux. Enfin, la génétique de la souris offre des outils de modulation du réseau neuronal, ce qui est difficilement accessible chez d'autres animaux. Les groupes d'animaux testés seront définis de manière à réduire le nombre d'animaux au minimum nécessaire pour obtenir des résultats robustes, dans les différentes conditions.

Les animaux sont hébergés en groupe dans des cages standard contenant de la litière et des matériaux de construction de nids, permettant aux animaux d'avoir des comportements normaux. Tous les actes chirurgicaux sont effectués sous anesthésie générale, et des antalgiques sont utilisés en pré- et post-opératoire, afin de minimiser la douleur chez l'animal. Dès la phase post opératoire, jusqu'à la fin des expériences, chaque animal est examiné quotidiennement. Des critères d'arrêt des expériences seront mis en place en cas de signes de douleur avancée chez les animaux.

L'ensemble de ces propositions vise donc à respecter le principe des 3Rs.

18539 L'infection avec le parasite *Toxoplasma gondii* constitue un facteur de risque majeur pendant la grossesse. (1) Lors de l'apparition d'anticorps spécifiques chez une femme enceinte, indicative d'une infection, une amniocentèse doit confirmer ou infirmer l'infection du fœtus. L'utilisation des techniques génétiques d'amplification de l'ADN (PCR) est aujourd'hui la technique principale pour détecter une infection du fœtus par *Toxoplasma gondii*, grâce à sa spécificité et rapidité. Néanmoins, en cas de positivité, une inoculation chez la souris est effectuée, pour confirmer la transmission de parasites vivants, car la PCR pourrait amplifier aussi du matériel génétique dégradé de parasites. L'apparition chez la souris d'anticorps anti-*T. gondii* confirme alors l'infection foetale. Un tel diagnostic n'est possible que dans un modèle animal.

(2) Pour la détection des cas difficiles d'autres laboratoires, les échantillons seront traités par une technique in vitro très sensible, qui requiert de parasites vivants. Les protocoles cliniques exigent l'utilisation de toxoplasmes isolés de souris.

L'ensemble du projet requiert l'utilisation de 1380 souris pour les 5 ans du projet.

Remplacement : Les expérimentations animales restent nécessaires pour assurer un diagnostic de bonne qualité pour les patients, conformément aux protocoles de référence en vigueur. Néanmoins, une grande partie de ce diagnostic a été déjà remplacée par des techniques in vitro, et nous évaluerons régulièrement les possibilités de remplacement additionnelles.

Réduction : Par l'optimisation des protocoles de ces expériences et l'adaptation au besoin réel du diagnostic, le nombre de souris utilisées a pu être baissé au strict minimum.

Raffinement : Afin d'améliorer le confort des souris, un analgésique est ajouté à l'eau de boisson des souris infectées et elles sont observées quotidiennement afin d'arrêter l'expérience le plus tôt possible. Les souris sont maintenues en groupes sociaux dans des cages enrichies avec du matériel de nidification.

18540 Les infections des voies urinaires (IVU) sont parmi les infections les plus courantes dans le monde, touchant une femme sur deux au cours de sa vie. En plus de l'inconfort qu'elles provoquent chez les femmes qui présentent des épisodes récurrents, ces infections ont un coût économique important lié aux traitements et aux arrêts de travail. De plus, une vaste étude de cas-témoins de cancer de la vessie dans le monde a récemment montré que les infections urinaires fréquentes sont associées à une augmentation du risque de cancer de la vessie. Les *Escherichia coli* uropathogènes (UPEC) sont les bactéries responsables de 50 à 90% des IVU. Les UPEC produisent un répertoire varié de facteurs de virulence comme des toxines ou des métabolites secondaires avec de multiples activités biologiques. Cependant, le rôle et l'impact à long terme (y compris sur le cancer de la vessie) de ces toxines et métabolites secondaires produits au cours d'une ou de plusieurs IVU sont inconnus. L'ambition du projet est donc de déterminer leur rôle et comprendre la régulation de facteurs de virulence codant des toxines lors d'une IVU. De plus, nous évaluerons l'effet de certains contaminants des aliments qui sont excrétés dans l'urine sur la régulation de la production des toxines et métabolites des UPEC. Cela nous aidera à mieux comprendre le processus de développement des IVU avec des souches UPEC produisant des toxines, et l'impact à long terme sur le processus de cancérisation de la vessie. Ces travaux nous apporteront de nouveaux indices pour développer de nouveaux traitements contre les IVU, atténuer l'impact à long terme de ces infections et développer une nouvelle stratégie anti-toxine. Les modèles utilisés et développés pour le projet sont des modèles d'IVU et de cancer de la vessie chez la souris. Une attention toute particulière est portée sur le nombre d'animaux strictement nécessaire pour chaque expérience. Le nombre maximum calculé de souris nécessaire sera de 1320.

La règle des 3R sera respectée :

Remplacer : des études ont été préalablement conduites sur des cellules en culture permettant d'élucider comment agissent les métabolites et toxines produites par les UPEC sur les cellules eucaryotes. Le recours à l'animal est cependant irremplaçable car aucun autre modèle ou tube à essai ne permet d'évaluer les répercussions à long terme de cette bactérie et ses toxines sur la vessie. Une veille scientifique sera mise en œuvre pour identifier toute méthode scientifique alternative à l'expérimentation animale dans le domaine.

Réduire : le nombre de souris utilisées est de 1320 animaux. Plusieurs paramètres seront analysés chez chaque animal (poids, nombre de bactéries, prélèvements d'urine, de tissus et de sang lors du sacrifice) pour réduire le nombre d'animaux nécessaires.

Raffiner : Le protocole d'expérimentation sera adapté afin de minimiser la morbidité et la douleur. Une perte de poids (non attendue) supérieure à 20 % du poids initial nous conduira à sortir l'animal du protocole expérimental et à l'euthanasier. Pour les protocoles où la douleur ne peut pas être prise en charge par des analgésiques, une observation accrue et des critères d'arrêt plus stricts seront mis en place.

18541 L'immunothérapie et la modulation des cellules immunitaires est mise en place comme un traitement standard contre plusieurs cancers avec la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. En particulier, l'activation des cellules T permet de combattre les cancers mais cette réponse protectrice dépend d'une régulation hautement dynamique des programmes génétiques pour la production de

molécules effectrices qui éliminera les cellules tumorales. Nos données préliminaires montrent que la régulation de ces molécules est modulée par les protéines de liaison à l'ARN (RBPs). Nous émettons l'hypothèse que les protéines RBPs contrôlent certains programmes génétiques qui sont essentielles pour le développement et l'activation des cellules T contre les tumeurs. Dans ce projet, nous utiliserons des modèles murins knock-out conditionnels pour supprimer les RBPs et l'activation de la fonction anti-tumorale des cellules T dans la tumeur.

Pour l'ensemble du projet, nous avons prévu d'utiliser un maximum de 504 animaux sur 3 ans. Le projet incluant deux procédures modérées, une étude rétrospective sera effectuée à la fin du projet pour un reclassement si nécessaire. Dans ce projet, nous nous limiterons aux seules expériences considérées comme absolument indispensables, et ce dans le respect de la règle des 3Rs

1- Remplacement : Cette étude se fait après de nombreuses études in vitro dans des modèles cellulaires. Malheureusement le principe de remplacement n'est pas applicable à ce projet car les études in vitro ne reproduiraient pas l'ensemble des voies impliquées dans des modèles physiologiques intégrés et par conséquent ne permettent pas l'obtention de résultats scientifiques exploitables et pertinents de la pathologie humaine

2- Réduction : les expériences sont organisées de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux. Les résultats actuels ont permis de valider que des lots de 6-8 souris selon les paramètres à évaluer permettent d'acquérir des données fiables.

3- Raffinement : les souris sont hébergées dans des cages à 20-24°C et 30-50% d'hygrométrie, en portoirs ventilés (dans des cages d'une superficie de 500cm²), avec une alternance jour/nuit de 12h/12h. La nourriture et l'eau de boisson sont fournies ad libitum. Le change de la litière est réalisé 1 fois par semaine. Du coton ou de l'essuie-tout sont ajoutés pour leur permettre de faire un nid. Les animaux ont une semaine d'acclimatation avant que le protocole ne débute.

Les conditions d'expérimentation font l'objet d'une procédure de suivi du bien-être animal. Les animaux seront suivis quotidiennement à l'initiation du modèle. Un animal sera euthanasié s'il présente un des points limites d'arrêt de la procédure, que nous aurons définis pour limiter la douleur, la souffrance ou l'angoisse de l'animal. Par exemple, amaigrissement, déshydratation, posture prostrée et/ou la génération de lésions cutanées grevées associées à la tumeur. Egalement, perte de poids supérieure à 20% du poids initial ou une croissance tumorale supérieure à 1500 mm².

18542 La transplantation pulmonaire permet de prolonger la vie et d'améliorer la qualité de vie des patients souffrant de maladies pulmonaires graves. Cependant, la survie à long terme reste médiocre principalement à cause de la survenue quasi inéluctable du rejet chronique ou dysfonction chronique du greffon pulmonaire (chronic lung allograft dysfunction ou CLAD) qui, dans toutes les situations, se présente sous la forme d'une fibrose pulmonaire. La transglutaminase 2 (TG2) est une enzyme impliquée dans la fibrose mais elle n'a jamais été étudiée dans le rejet chronique pulmonaire. Notre projet est d'étudier le rôle de cette enzyme dans la formation du CLAD afin d'améliorer les connaissances sur la physiopathologie du rejet et d'étudier l'efficacité de potentiels thérapies ciblant la TG2. Le contexte de la greffe est d'une complexité extrême intégrant comme variables l'organisme du receveur, le poumon du donneur, un acte chirurgical hautement invasif, la réaction du système immunitaire du receveur et les effets des médicaments immunosuppresseurs. Dans ce cadre, l'étude des mécanismes de rejet et des potentiels molécules pouvant le traiter ne peut se passer du modèle animal. Nous avons choisi le modèle de souris car c'est actuellement celui qui est considéré comme le plus pertinent par la communauté scientifique. Par ailleurs, les invalidations des gènes que nous étudions sont déjà disponibles sur les souches de souris que nous souhaitons utiliser. Cette étude respecte la règle des 3R pour réduire, remplacer et raffiner l'utilisation de l'expérimentation animale. Afin de réduire le nombre d'animaux, nous utiliserons un seul contrôle groupe de greffe auquel nous comparerons tous les autres groupes. Des gens compétents et formés pour réaliser les greffes nous permettront d'éviter les pertes lors de la chirurgie. L'étude du rôle de la TG2 dans un modèle in vitro (cellules épithéliales pulmonaires de patients mis en contact de lymphocytes T allogéniques) a permis de démontrer la présence anormale de la TG2. Nous étudions aussi la présence et les conséquences de la TG2 sur des

échantillons de patients greffés (prélèvements sanguins et pulmonaires réalisées lors du suivi habituel des patients. Enfin, le protocole de chirurgie, de limitation de la douleur, de bien-être animal d'élevage permet de raffiner ce projet. Le nombre maximum d'animaux sera de 644.

18543 Les maladies inflammatoires cutanées (p. ex. , la dermatite atopique, le psoriasis ou l'hypersensibilité de contact), sont en plein essor dans les pays développés. L'origine des diverses maladies chez l'homme est extrêmement complexe et plusieurs facteurs (p. ex. , immunologique, génétique, environnemental, neuronal etc) pourraient être impliqués dans leur développement. Ce programme de recherche a pour but d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dans le traitement et la prévention des maladies allergiques en bloquant les interactions entre le système nerveux et le système immunitaire. Devant la complexité de ces maladies, due notamment à l'implication de différents organes et types cellulaires, le recours aux modèles animaux est indispensable. De ce fait, les modèles de souris sont des éléments clés et incontournables pour étudier le développement des maladies inflammatoires cutanées mimant les maladies humaines. Les expériences qui seront réalisées in vivo ont été conçues de façon à n'utiliser que le nombre strictement minimum de souris nécessaire à l'obtention de données validées statistiquement. Pour répondre aux questions scientifiques posées, ce projet utilisera 8 procédures différentes dont 4 seront intermédiaires et les 4 autres conduiront à l'euthanasie des animaux (3 modèles de maladie, et 1 expérience de microscopie intravitale). L'étude de l'implication de la proenkephaline dans les 3 modèles de maladies requerra 60 souris par modèle de maladie (180 en tout) L'étude de l'implication des nocicepteurs dans les 3 modèles de maladies requerra 420 souris par modèle de maladie (1260 en tout), et les expériences de microscopie intravitale requerront 108 souris. D'autre part, toutes les précautions seront prises pour éviter la sensation de douleur ou d'angoisse chez les animaux manipulés. Pour cela, l'ensemble du personnel manipulant les animaux sera formé de manière rigoureuse et dans le respect de la règle des 3R. Les animaux seront hébergés à la zootechnie de Purpan, dans des cages placées sur des portoirs ventilés et dans des conditions de température et d'humidité constante. Elles auront accès à la nourriture et à l'eau ad libitum. Des éléments tels que des bâtonnets en bois, ou des rouleaux de cotons seront placés dans les cages de manière à améliorer l'enrichissement. De plus, les procédures seront effectuées sous anesthésie sauf contraintes expérimentales justifiées. Nous étudions l'activité des nerfs périphériques qui transmettent la douleur, nous ne pouvons donc pas utiliser d'antalgiques.

Dans les modèles de maladies présentés, le point limite sera la fin du protocole expérimental. Cependant, les souris seront euthanasiées dès lors qu'elles présenteront une perte de poids de plus de 20%, ou une altération de l'état général (baisse d'activité, d'appétit, score de pathologie maximal), sans attendre la fin du protocole. Le maximum de tissus d'intérêt sera récupéré sur chaque souris et stocké en vue de répondre à d'éventuelles questions scientifiques ultérieures, sans avoir à utiliser de nouvelles souris. Les résultats attendus des expériences que nous projetons de réaliser (utilisant 1548 animaux pour la totalité des projets) contribueront à mieux comprendre le développement des maladies inflammatoires cutanées et potentiellement à identifier de nouvelles stratégies pour prévenir et soigner ces maladies. Une banque de tissus prélevés sur les différents modèles de souris utilisés au laboratoire sera constituée et mise à disposition de la communauté scientifique, dans le but d'éviter un emploi d'animaux redondant.

18544 Les gangliosides sont des composants majeurs des membranes plasmiques, notamment des cellules intestinales. Ils régulent leurs propriétés et divers événements de signalisation. En particulier, ils servent de récepteurs aux virus, bactéries et toxines et sont ainsi impliqués dans la mise en place de l'immunité intestinale chez le jeune. Les gangliosides sont naturellement présents dans l'alimentation, en particulier le lait maternel. Le lait et ses composants bioactifs sont connus pour influencer la maturation intestinale, dont la mise en place de la fonction absorbative. Parmi les nutriments dont l'absorption intestinale est particulièrement critique en période post-natale figurent les acides gras polyinsaturés oméga-3. La rétine est un tissu particulièrement sensible aux apports alimentaires en période périnatale, notamment en oméga-3 qui sont fondamentaux pour le bon développement des fonctions visuelles. Chez l'enfant, des études cliniques ont montré que la

consommation de formulations infantiles pauvres en acide linoléique et dépourvues en acide docosahexanoïque (DHA) du fait de l'origine végétale des lipides, conduisait à une baisse d'environ 40% des taux de DHA dans le système nerveux et les globules rouges associée à une baisse significative de l'acuité visuelle et un retard de maturation des photorécepteurs (cellules rétiniennes en charge de la conversion du signal lumineux en signal nerveux) et une baisse significative de l'acuité visuelle ont été montrés, en comparaison des nouveau-nés allaités. L'objectif de ce projet est de déterminer l'impact des apports postnataux en gangliosides sur les capacités d'absorption intestinale et d'incorporation dans la rétine des oméga-3. Une supplémentation en gangliosides et/ou oméga-3 sera pour cela apportée à des rats en période de lactation (J1 à J21). Ces travaux pourraient ainsi permettre de favoriser la prise en compte des gangliosides dans les problématiques de nutrition périnatale, en particulier dans les formulations infantiles et les recommandations nutritionnelles destinées aux femmes enceintes et allaitantes.

L'expérimentation sera menée sur des rats de souche Sprague Dawley, mâles et femelles, de façon à documenter un éventuel effet sexe, qui seront quotidiennement « biberonnés ». Elle comprendra 4 groupes de 10 rats pour chaque sexe :

- Un groupe témoin/contrôle « CTL » recevra la solution utilisée pour extraire et/ou diluer les acides gras polyinsaturés oméga-3 (AGPI n-3) et les gangliosides. Les solutions commerciales de AGPI n-3 et de gangliosides ne sont pas pures et il est nécessaire de prendre en compte la présence de molécules (excipients, résidus d'extraction...) même minoritaires quantitativement.
- Un groupe « AGPI n-3 » recevra une suspension d'un mix d'acides gras oméga-3 DHA (acide docosahexanoïque) et EPA (acide éicosapentaénoïque)
- Un groupe « GANG » recevra une solution de ganglioside commerciale
- Un groupe « AGPI n-3 GANG » recevra le mélange AGPI n-3 + GANG.

Le total s'élève donc à 80 petits auxquels s'ajoutent les 12 mères nécessaires à leur production et allaitement, soit 92 animaux.

La règle des 3R sera appliquée

Réduction

Le nombre d'animaux a été estimé à 10 par groupe sur la base d'un calcul d'effectif à partir de données bibliographiques permettant d'estimer l'effet attendu (sur l'accrétion en oméga-3 dans la rétine mais également sur les voies mécanistiques explorées telles que la perméabilité intestinale et la mesure d'expression de transporteurs lipidiques), pour une puissance de test statistique de 90% et un risque d'erreur de 5%. Toutes les analyses seront réalisées à partir d'un seul animal. L'utilisation des mâles et des femelles dans les groupes expérimentaux valorise au maximum les animaux obtenus à la mise bas.

Raffinement

L'environnement des mères gestantes et allaitantes sera enrichi (matériau cellulosique pour le nid, tunnel, bâton à ronger). Les procédures prévues relèvent toutes de la classe de sévérité « légère » : biberonnage selon réflexe de tétée des nouveau-nés, administration orale de marqueurs de perméabilité intestinale. Les animaux seront suivis par un personnel compétent dans le respect de la charte nationale sur l'éthique de l'expérimentation animale. Les protocoles ne devraient pas entraîner de souffrance pour les animaux, cependant ils feront l'objet d'une visite quotidienne, y compris le week-end. Les points limites clairement définis conduiront à la mise à mort des animaux le cas échéant.

Remplacement

La réalisation de l'objectif de ce projet requiert un modèle d'étude de supplémentation nutritionnelle post-natale incluant la complexité des mécanismes d'absorption lipidique ainsi que leur accrétion rétinienne. L'expérimentation animale ne peut donc pas être remplacée.

18545 L'aorte est la plus volumineuse artère de l'organisme, naissant du ventricule gauche du cœur, cheminant dans le thorax, puis l'abdomen et se divisant en deux artères iliaques à la racine des

membres. L'aorte donne naissance aux artères à destinée cérébrale, rénale et digestive et est ainsi à l'origine de la distribution de sang oxygéné à la quasi-totalité des organes.

La dissection aortique est une affection grave, caractérisée par l'irruption de sang à l'intérieur de la paroi de l'aorte. Elle constitue une déchirure par laquelle le sang sous haute pression s'infiltré au sein de la paroi et décolle les uns des autres les trois feuillets, habituellement solidaires, constituant la paroi élastique de l'aorte que sont: l'intima, la media et l'adventice. La dissection peut ensuite se propager sur une plus ou moins longue portion du vaisseau ainsi que s'étendre aux différentes branches naissant de l'aorte.

Son évolution spontanée est rapidement fatale, dans 80% des cas s'il s'agit d'une dissection aortique de type A, c'est-à-dire touchant les portions de l'aorte les plus proches du cœur que sont l'aorte thoracique ascendante et la crosse aortique donnant naissance aux vaisseaux cérébraux. Les principales complications surviennent soit par rupture directe du vaisseau (menant à une hémorragie cataclysmique) soit par malperfusion responsable de souffrance ischémique d'organe. La propagation de la dissection peut se faire de proche en proche jusqu'aux artères coronaires, alors responsable d'infarctus du myocarde, aux vaisseaux à destinée du cerveau, pouvant conduire à un accident vasculaire cérébral ou bien aux artères périphériques (ischémie rénale, hépatique, digestive ou des membres inférieurs).

La physiopathologie de la dissection aortique est mal connue. Quelques affections génétiques rares du tissu conjonctif telles que la maladie de Marfan ou Elher Danlos exposent les patients porteurs à un risque accru de dissection aortique mais le principal facteur de risque dans la population générale est l'hypertension artérielle. Si la genèse de cette pathologie était jusqu'alors attribuée à une déchirure initiale de l'intima (feuillelet le plus interne), celle-ci n'est pas systématiquement retrouvée dans les études histologiques et aucune étude n'a à ce jour permis de démontrer le mécanisme par lequel surviendrait cette brèche intimale. Un nombre non négligeable d'études dans la littérature ces dernières décennies, a suggéré que la dissection aortique ne serait pas une pathologie de l'intima, mais probablement des feuillets plus externes.

Nous émettons l'hypothèse, dans notre étude, que la dissection aortique serait initialement due à une altération de la perfusion des vasa vasorum, réseau de capillaires nourriciers de la paroi aortique, cheminant au sein de l'adventice (couche la plus externe), pénétrant la média et assurant l'oxygénation des deux tiers externes de la paroi artérielle.

Observable à l'échelle du micromètre, aucune technique d'imagerie n'a à ce jour permis d'accéder à une étude hémodynamique in vivo des vasa vasorum. Une technique d'échographie ultrarapide a récemment démontré sa capacité à obtenir une analyse quantitative des flux au sein du réseau neuro-vasculaire de rat à l'échelle micrométrique.

L'objectif de notre étude est de proposer une approche innovante permettant, à l'aide d'un échographe ultrarapide, de construire in vivo et en temps réel la cartographie quantitative des flux au sein des vasa vasorum aortiques ainsi que de l'élasticité et de la viscosité locale de la paroi aortique. Nous testerons l'effet de l'altération hémodynamique des vasa vasorum dans le but de tenter de reproduire les stigmates précoces de la maladie, mieux comprendre sa genèse et de dépister d'éventuelles nouvelles cibles thérapeutiques.

Notre protocole expérimental prévoit d'utiliser un modèle porcin. Il n'existe actuellement pas de méthode alternative (ni bancs d'essai, ni cultures cellulaires, ni simulation numérique) permettant de modéliser les effets d'une modification des flux au sein des vasa vasorum sur la paroi aortique. Vingt six animaux au maximum seront nécessaires à notre étude. A aucun moment l'animal ne sera ni conscient ni susceptible de ressentir la douleur. Pour améliorer leur confort et leur bien-être, les animaux seront hébergés dans l'animalerie une semaine avant l'intervention afin de respecter une période d'acclimatation. Ils seront gardés parmi leurs congénères pour réduire leur stress, à raison de deux par enclos maximum. Du personnel animalier professionnel s'occupera quotidiennement des animaux et mettra à leur disposition un environnement stimulant (activité de fouissage, distributeur d'aliments, planche à gratter).

18546 Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) regroupent la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique et se caractérisent par une inflammation chronique du tube digestif. La MC peut affecter l'ensemble du tube digestif, de la bouche à l'anus, et les lésions sont discontinues et profondes. En revanche, l'inflammation est limitée au côlon dans la RCH, et les lésions sont continues et superficielles. Ces pathologies impliquent des facteurs génétiques et environnementaux. Parmi les facteurs génétiques, les mutations du gène NOD2 (Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein 2) furent les premières caractérisées et ont été associées à un risque élevé de développer une MC. Ce gène code pour la protéine NOD2 décrite pour réguler l'homéostasie de la muqueuse digestive. Concernant les facteurs environnementaux impliqués dans les MICI, seuls le tabac, les antibiotiques et la consommation de viande ont été démontrés comme étant associés au développement des MICI.

D'une manière générale, la physiopathologie des MICI est décrite pour être le résultat d'une réponse anormale du système immunitaire, stimulée par des modifications du microbiote. Bien qu'on ne connaisse pas à l'heure actuelle le(s) lien(s) de causalité entre les altérations du microbiote et du système immunitaire, un défaut de barrière de l'épithélium digestif est impliqué dans la genèse et l'entretien de cette communication anormale aboutissant au processus inflammatoire et à la destruction de l'épithélium. En effet, la perméabilité intestinale (PI) est augmentée, en rapport notamment avec une altération des jonctions serrées. Ainsi, dans les MICI, les quatre compartiments de la fonction de barrière de la muqueuse intestinale que sont le microbiote, la couche de mucus contenant des peptides antimicrobiens, l'épithélium intestinal et le tissu lymphoïde intestinal sont altérés.

L'intégrité de l'épithélium intestinal est cruciale et est assurée par les cellules souches intestinales qui permettent le renouvellement de l'épithélium intestinal en 3 à 5 jours. Les CSI sont dotées de capacités d'auto-renouvellement, et de multipotence en générant des progéniteurs qui se différencieront en cellules matures et fonctionnelles. Il existe 6 types de cellules intestinales : les entérocytes responsables de l'absorption, les cellules caliciformes sécrétrices de mucus, les cellules de Paneth productrices de peptides antimicrobiens, les cellules entéroendocrines productrices d'hormones, les cellules Tuft ayant la propriété de chémosenseurs et les cellules M impliquées dans l'immunité. Les fonctions des CSI sont nécessaires à la cicatrisation de la muqueuse, phénomène absent ou incomplet chez les patients atteints de MICI, malgré les traitements qui ciblent plutôt l'inflammation et le système immunitaire.

Le renouvellement de la muqueuse est régulé par un grand nombre de médiateurs, parmi lesquels le Transforming growth factor β (TGF- β). Le TGF- β est une cytokine produite par les cellules immunitaires, épithéliales intestinales et les fibroblastes. Il est impliqué dans la première phase de cicatrisation de la muqueuse. Il faut préciser que l'objectif thérapeutique est la cicatrisation de la muqueuse (Anglais : Mucosal healing), définie comme étant l'absence d'ulcérations et de lésions observée par endoscopie, synonyme de régénération de la muqueuse intestinale. En plus de son rôle dans la cicatrisation épithéliale, le TGF- β est également décrit pour maintenir l'intégrité des jonctions serrées, prévenir la déplétion des cellules caliciformes et est engagé dans le système immunitaire. La production et la signalisation de cette cytokine sont dérégulées dans les MICI, ce qui altère les effets du TGF- β . Cela laisse penser qu'une supplémentation en TGF- β pourrait être bénéfique dans les MICI.

La nutrition entérale exclusive avec un lait naturellement enrichi en TGF- β a démontré, dans plusieurs études, une atténuation de l'inflammation et une cicatrisation et régénération de la muqueuse. Néanmoins, son ou ses mécanisme(s) d'action reste(nt) mal connu(s). Bien que ses composants puissent jouer un rôle essentiel pour la rémission, son mode d'administration peu commun suscite débat.

L'objectif de ce projet est d'étudier, dans différents modèles animaux de MICI caractérisés par une inflammation du gros intestin, les effets ainsi que les mécanismes cellulaires et moléculaires par lesquels la nutrition entérale exclusive induit une cicatrisation de la muqueuse. Pour atteindre cet objectif, 1120 animaux seront inclus dans l'expérimentation, à raison de 10 par groupe afin d'atteindre une étude statistique significative. Ainsi, 4 modèles de MICI seront développés chez des souris sauvages ou présentant une susceptibilité génétique aux MICI : - le modèle induit par

administration intra-colique d'acide trinitrobenzène sulfonique - les modèles induit oralement par le sulfate de sodium dextran (aiguë et chronique) - le modèle induit par administration intra-colique d'oxazolone. Dans chaque modèle, nous étudierons implication de la recirculation des lymphocytes inflammatoires, la perméabilité intestinale, le microbiote intestinal et le processus de régénération cellulaire.

Dès l'induction de la pathologie, les animaux seront suivis régulièrement au cours du temps par des techniques non-invasives : suivi du poids, consistance et présence de sang dans les fèces. L'enrichissement de l'environnement des souris sera rajouté (coton pour nidation) et l'état des souris sera observé tous les jours. Donc, ce projet sera réalisé selon la règle des 3-R (réduire, raffiner, remplacer).

18547 Les dysferlinopathies sont des maladies neuromusculaires dues à des mutations dans le gène codant pour la dysferline, protéine impliquée dans la réparation de la membrane des cellules musculaires.

Le but de notre projet de recherche est de suivre l'évolution du phénotype d'un modèle de souris reproduisant une dystrophie musculaire de type dysferlinopathie pour mieux comprendre les altérations que nous observons chez les patients au fur et à mesure du développement de la maladie et ainsi envisager diverses approches thérapeutiques. Nous allons donc effectuer des prélèvements de muscle pour analyser l'évolution des lésions musculaires et de l'inflammation chez notre modèle de souris. De plus, nous aurons recours à des tests fonctionnels pour suivre la force musculaire des souris et déceler la présence d'anomalies de la marche. Pour cela, nous utiliserons 110 souris qui seront hébergées collectivement, dans un milieu enrichi et dans une pièce thermorégulée avec un cycle 12h lumière/12h obscurité. Tous les jours, la nourriture, la boisson et l'état clinique des souris seront vérifiés, avec un changement de litière hebdomadaire. Notre projet est en cohérence avec le concept des 3R :

- Remplacer : afin de pouvoir observer l'impact de l'absence de dysferline au cours de l'évolution de la pathologie (diminution de la force musculaire, augmentation de l'inflammation, apparition de tissus adipeux), il nous est indispensable d'avoir recours à un modèle animal.

- Réduire : nous avons réalisé une étude statistique pour déterminer le nombre minimum d'animaux nécessaires à l'obtention de résultats fiables et statistiquement significatif.

- Raffiner : dans l'objectif de respecter le bien-être de l'animal, nous procéderons à un suivi hebdomadaire du développement de la maladie chez les animaux et nous avons déterminé des points limites à ne pas franchir. De plus, les souris auront à leur disposition de la nourriture et de l'eau à volonté, ainsi que de l'enrichissement leur permettant de conserver leur comportement naturel. Chaque cage de 500 cm² contiendra entre 2 et 5 souris.

18548 Bien que l'iléus post-opératoire (IPO) puisse survenir à la suite d'opérations extra-abdominales, elle est plus prononcée et inévitable après chaque intervention chirurgicale abdominale. Elle se présente cliniquement comme l'incapacité à tolérer la nourriture, avec une distension abdominale, l'absence de bruits intestinaux et l'absence de gaz et de défécation. Les nausées et vomissements, les douleurs et la fatigue post-opératoires contribuent également à la morbidité et à l'hospitalisation prolongée des patients. En moyenne, cette période dure de 2 à 4 jours pour les procédures abdominales conventionnelles.

Au-delà de cette période on parle d'ileus prolongé ou compliqué. L'ileus prolongé se développe dans 10% des chirurgies abdominales, mais peut augmenter jusqu'à 25% selon les séries.

L'inhibition transitoire de la motilité gastro-intestinale est bien documentée en tant que mécanisme sous-jacent et concerne l'ensemble du tractus gastro-intestinal. Nous savons aujourd'hui que tous les segments ne sont pas affectés de la même manière ; la motilité de l'intestin grêle est en moyenne perturbée pendant environ 24 heures, la motilité gastrique entre 24 et 48 heures, tandis que la motilité du côlon est altérée pendant 48 à 72 heures. Néanmoins, ces études soulignent que la motilité du côlon est le principal déterminant de la guérison clinique. Cela explique pourquoi la première défécation et les gaz sont souvent utilisés comme principaux paramètres de résultat dans

les essais cliniques. Le passage des gaz dépend fortement de la déclaration du patient, tandis que le passage des selles peut simplement refléter la vidange rectale et ne pas nécessairement informer de la récupération d'une activité contractile intestinale. Avec la possibilité que de nouveaux traitements pour les IPO apparaissent dans un avenir proche, il y aura un besoin certain de meilleures variables de résultats ou d'autres marqueurs biologiques afin d'évaluer les nouveaux traitements de manière meilleure et objective.

Bien qu'il soit désormais clair que l'ouverture de la cavité péritonéale et la manipulation de l'intestin sont les principaux mécanismes qui sous-tendent l'IPO, en revanche, l'utilisation d'opioïdes pour contrôler la douleur post-opératoire a un impact beaucoup plus important sur la motilité post-opératoire.

Le but de l'étude est d'analyser l'expression de molécules, de leurs inhibiteurs et des récepteurs qu'elles activent sur des prélèvements de tissu intestinal et colique humain en parallèle d'un modèle murin reproduisant l'ileus post-opératoire.

Les modèles animaux sont devenus essentiels pour déterminer les mécanismes physiopathologiques et les processus immunologiques à l'origine de l'inflammation chronique des muqueuses. L'objectif de ce projet est d'évaluer l'efficacité de nouvelles molécules thérapeutiques et d'identifier de nouvelles cibles pour l'ileus post-opératoire chez le rat ou la souris. Le modèle utilisé sera adapté aux cibles thérapeutiques à évaluer.

Afin de répondre à cet objectif le nombre d'animaux utilisés sera de 420 rats et 1020 souris sur 5 ans en raison de 10 animaux par groupe (minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs), le nombre de groupe étant fonction du nombre de molécules et/ou doses à tester. Suite à la chirurgie, les animaux seront surveillés jusqu'à leur réveil puis quotidiennement (suivi du poids) jusqu'au sacrifice (au plus tard 48h).

Pour optimiser l'utilisation et la protection des animaux au cours de l'expérimentation dans notre laboratoire, nous répondons à la règle des 3R dans ses différents aspects :

-Réduction : Le nombre d'animaux est calculé a priori en respectant les critères pour une analyse statistique appropriée. Les rongeurs utilisés sont consanguins, de mêmes âge et sexe, réduisant la variabilité entre les animaux et donc le nombre nécessaire pour obtenir des résultats fiables. Lors du sacrifice, les organes ou parties d'organes non requis pour l'expérience en cours, ainsi que le matériel traité non consommé, sont conservés pour d'autres utilisations éventuelles, constituant une bio-banque accessible à l'équipe ou aux collaborateurs, prévenant l'utilisation d'autres animaux.

-Remplacement : Le recours à l'expérimentation animale est indispensable pour ce projet essentiellement basé sur des expériences de physiologie intestinale (motricité, vidange gastrique) qui nécessitent obligatoirement le recours à l'animal. Toutefois en parallèle une étude sur des prélèvements humains est réalisée.

-Raffinement : Les méthodes d'analyses utilisées, les plus avancées, permettent d'obtenir une précision dans les mesures conduisant à réduire la variabilité expérimentale et donc le nombre d'animaux utilisés. Le bien-être de l'animal, outre les considérations éthiques, est aussi un facteur de variabilité expérimentale, qui est pris en compte et réduit grâce au suivi rapproché quotidien des animaux, l'aide à l'alimentation en cas de besoin, l'enrichissement de leur environnement et le respect de l'aspect social du groupe (pas d'isolement ni de changement de cage). La responsabilisation du manipulateur et le respect de l'animal nous conduisent à prendre en charge la prévention de la souffrance, notamment par l'application stricte de points-limites préalablement définis. En cas de signes externes de souffrance (cachexie, prostration, hypothermie, poils hérissés) persistant pendant plus de 24h, les animaux seront euthanasiés. Une pesée quotidienne sera réalisée et une perte de poids de 20% constituera un point limite. Au moment de l'anesthésie les animaux recevront 0,1 mg/kg de buprenorphine (un analgésique) en sous-cutanée (aiguille 27G, volume 100 µL) puis une autre dose 4h et 8h après la chirurgie.

18549 Depuis une dizaine d'années, l'immunothérapie par inhibition des points de contrôle immunitaires (anti PD-L1, anti PD1, anti CTLA-4) a permis d'obtenir une rémission complète pour des cancers au pronostic très défavorable. Toutefois, les effets bénéfiques ne concernent qu'une minorité des

patients (20 % à 30 %), tandis que pour de nombreux patients on observe une résistance à ce type de traitement. Il est maintenant admis que la composition du microenvironnement de la tumeur est un, voire le, facteur déterminant dans la mise en place d'une réponse immunitaire efficace. Dans ce contexte, cibler le microenvironnement pour diminuer son effet immunosuppresseur est un axe de recherche majeur dans la lutte antitumorale.

De nombreuses voies d'immunothérapie ont été explorées mais, dans bien des cas, celles-ci se sont heurtées au fait que l'environnement immunologique des tumeurs est très mal connu. Nous avons identifié une molécule, présente dans la majorité des tumeurs, qui est impliquée dans le maintien dans un état protumoral des macrophages. Aussi nous proposons de tester plusieurs traitements capables d'empêcher l'action de cette molécule. Cette stratégie, basée sur la restimulation localement du système immunitaire, permet d'envisager une réponse immunitaire capable d'induire le rejet de la tumeur, tout en préservant le tissu sain, et de doter les patients d'une mémoire immunitaire anti-tumorale, prévenant ainsi des récurrences. Aussi, dans ce projet nous nous proposons de caractériser l'impact de ces traitements sur l'environnement immunologique de plusieurs types de tumeurs (ovariennes, intestinale et sein) d'un point de vue moléculaire et cellulaire ainsi que d'évaluer dans ces modèles le bénéfice du traitement que nous proposons.

Pour répondre à l'objectif du projet, il est prévu d'utiliser un maximum de 870 animaux sur 5 ans, en raison de 10 à 20 animaux par lot, minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs. La règle des 3R sera appliquée dans le cadre de ce projet.

1-Remplacement :

Le recours à l'expérimentation animale dans le cadre de cette étude se fait après de nombreuses expériences *in vitro* dans des modèles cellulaires. Nous ne pouvons pas remplacer ce protocole *in vivo* par des expériences *in vitro* car les études *in vitro* ne reproduisent pas l'ensemble des interactions et les réponses biologiques d'un organisme entier, et par conséquent ne permettraient pas l'obtention de résultats scientifiques exploitables et pertinents de la pathologie humaine.

2-Réduction :

Le modèle utilisé dans ce protocole, nous permettra d'obtenir le maximum d'information à partir de chaque animal utilisé. Nous combinerons le suivi clinique, l'analyse des populations cellulaires présentes dans les lésions et l'analyse fonctionnelle *ex vivo* des cellules, sur un même animal.

Nous avons réduit au maximum le nombre de souris par lot pour obtenir des résultats statistiquement valables avec le moins d'animaux possible. Toutes les expériences seront réalisées en deux fois ce qui permettra le cas échéant de diminuer le nombre d'animaux en fonction des résultats obtenus.

3-Raffinement :

Les conditions d'expérimentations font l'objet d'une procédure de suivi du bien-être animal. Afin de suivre la directive européenne 2010/63/UE, un enrichissement sera rajouté dans les cages boules de coton, papiers absorbants, tubes en carton). De plus, les animaux seront suivis quotidiennement. Pour chaque procédure des points limites ont été définis pour limiter la douleur, la souffrance ou l'anxiété de l'animal et l'animal sera euthanasié s'il présente un de ces points.

18550 Le développement et la progression du cancer sont profondément influencés par des facteurs extérieurs aux cellules tumorales. Parmi ceux-ci, le système immunitaire joue un rôle prépondérant en encourageant ou en inhibant la progression tumorale. Les Lymphocytes T sont de parfaits exemples de cette dualité. Ainsi, les Lymphocytes T effecteurs sont de puissants acteurs anti-tumoraux alors que les lymphocytes T CD4 régulateurs (Tregs) sont des acteurs cruciaux de l'inhibition des réponses immunitaires anti-tumorales. Les stratégies thérapeutiques ciblant ces derniers sont donc prometteuses. A l'état basal, 2 sous-populations de Tregs coexistent dans l'organisme. Les Tregs sont dits thymiques (tTregs) quand ils sont produits dans le thymus et sont spécifiques du "Soi". Les Tregs sont périphériques (pTregs) quand ils sont générés en périphérie lors de l'activation de cellules T CD4 naïves. Au contraire des tTregs, les pTregs dépendent de l'élément CNS1 du gène Foxp3 pour leur génération.

Il a été récemment montré que le niveau de fer dans l'organisme affectait l'activation, le profil de différenciation ou la prolifération des Lymphocytes T. Leur différenciation en Lymphocytes T effecteurs CD4 Th1 et Tc1 d'une part et en Tregs d'autre part pouvant être modulée in vitro par les niveaux de fer environnementaux.

Alors que les Tregs ont fait l'objet de nombreux travaux dans le contexte tumoral, il est étonnant de noter que la contribution plus spécifique des pTregs à la progression tumorale n'a pas été établie. Ce projet vise à déterminer à la fois (1) la contribution spécifique des tTregs et pTregs à la progression tumorale et (2) l'effet de la modulation de l'activité des populations de lymphocytes T anti-tumoraux par les variations de fer environnementales. Il implique deux procédures s'appuyant sur un modèle de cancer colorectal induit par injection d'un produit tumorigène chez la souris. Ce modèle sera appliqué à (1) des animaux déficients pour diverses fonctions et populations de cellules T dont les pTregs et à (2) des animaux des mêmes lignées génétiquement modifiées qui auront été préalablement nourris avec une alimentation riche en fer pour évaluer le potentiel thérapeutique d'un tel régime sur le développement tumoral.

L'utilisation de l'expérimentation animale pour ce projet est justifiée par la complexité inhérente à la biologie des tumeurs qui ne peut pas être récapitulée par des expériences in vitro.

En conformité avec les exigences 3R :

- Des expériences préliminaires ont été réalisées in vitro pour évaluer nos hypothèses (remplacement). Ces expériences nous ont permis, par exemple, de confirmer l'influence du fer et de l'élément régulateur CNS1 sur la différenciation des cellules T en effecteurs.
- Des lots d'un nombre réduit d'animaux seront utilisés en anticipant la validité statistique des données obtenues (réduction). L'utilisation de techniques d'imagerie par échographie pour le suivi longitudinal du développement de la tumorigenèse colique nous permettra de limiter au strict nécessaire le nombre d'animaux inclus dans cette étude. Ce suivi longitudinal réduira en effet le nombre d'expériences en nous permettant d'analyser des animaux dont nous connaissons a priori le nombre et la taille des tumeurs coliques induites.
- Des expériences préliminaires réalisées sur des nombres réduits d'animaux seront mises en œuvre de façon à affiner les protocoles utilisés par la suite.
- Des mesures visant à réduire la douleur des animaux seront prises. Toutes les injections se feront ainsi sous anesthésie générale et un suivi attentif des animaux est prévu pour chaque procédure. Pour réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux, nous utiliserons des techniques non invasives comme l'imagerie par échographie et la coloscopie qui permettent un suivi longitudinal du développement de la tumorigenèse colique. Cette approche méthodologique nous permet de faire des études sur des tumeurs de petites tailles, à des stades précoces, ce qui évite la souffrance engendrée par un développement tumoral important.
- Des points-limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire. Le nombre total d'animaux est estimé à 1584 souris pour l'ensemble du projet durant 5 ans. Les résultats obtenus dans le modèle animal devraient apporter une meilleure compréhension de la contribution des lymphocytes T CD4 régulateurs et effecteurs à l'inhibition de la réponse anti-tumorale et nous permettre d'envisager le développement de stratégies les ciblant.

18551 L'industrialisation et les changements importants des habitudes alimentaires des dernières décennies ont engendré une augmentation de la prévalence de l'obésité et des désordres métaboliques associés, incluant un état proinflammatoire chronique. Chez l'individu en surpoids ou obèse, le métabolisme lipidique est dérégulé et particulièrement pendant les heures suivant un repas (phase postprandiale). Cela induit des concentrations excessives de lipides circulants, ce qui est considéré comme un facteur de risque cardiovasculaire majeur. Dans ce contexte, il a également été démontré que la composition et la fonction du microbiote intestinal étaient altérées, et associées à des changements délétères au niveau du tractus gastro-intestinal, avec une augmentation de la perméabilité de l'intestin, ce qui accentue l'état proinflammatoire global de l'organisme. Compte tenu de l'augmentation exponentielle de la prévalence de l'obésité et des désordres métaboliques à l'échelle mondiale, le développement de nouveaux traitements préventifs est devenu un enjeu sociétal majeur.

Parmi les différentes stratégies de prévention des désordres métaboliques liés à l'obésité, l'utilisation de probiotiques est une piste très prometteuse qui engendre des effets bénéfiques au niveau du métabolisme énergétique de l'organisme dans son ensemble ainsi que des effets importants sur la composition et la fonction du microbiote intestinal. Plusieurs études ont rapporté des effets significatifs, principalement dans les modèles animaux et quelques études cliniques ont permis de valider l'efficacité de ces traitements dans différents contextes physiopathologiques. Il paraît donc important de tester les effets de 2 nouveaux mixes de probiotiques, scrupuleusement sélectionnés pour leur potentiel anti-obésité et anti-inflammatoire, sur la prévention des désordres cardio-métaboliques.

Pour répondre à cet objectif, des souris mâles recevront une alimentation standard (groupe de référence de l'étude) ou obésogène (60% des apports caloriques sous forme lipidique) pendant 12 semaines afin d'instaurer les perturbations métaboliques d'intérêt : prise de poids, augmentation des lipides en circulation, inflammation chronique et dérèglements intestinaux. Les souris nourries sous régime riche en gras seront traitées avec l'un des 2 mixes de probiotiques ou placebo quotidiennement pendant toute la durée du protocole afin de déterminer les effets potentiels des mixes de probiotiques dans la prévention des désordres métaboliques liés à l'obésité induite par la diète riche en gras. Au cours du protocole, les souris seront soumises à 2 tests physiologiques indispensables à la mise en évidence des effets des traitements sur le métabolisme lipidique et la perméabilité intestinale. Le premier test réalisé à 10 semaines de traitement permettra d'évaluer la réponse de l'organisme à une charge orale en lipides en suivant la concentration sanguine des triglycérides. Le second test réalisé au début de la 12^{ème} semaine de traitement consistera à évaluer la différence de concentration en sucres particuliers que sont le mannitol et le lactulose, ce dernier étant non absorbable. Le rapport entre ces 2 sucres donne donc une mesure de la perméabilité intestinale. Au cours du protocole, des collectes de fèces seront réalisés en 3 points afin de démontrer l'impact de la supplémentation en probiotiques sur la composition du microbiote intestinal, qui est depuis de nombreuses années considéré comme un « organe » clé dans le métabolisme énergétique et les processus inflammatoires de l'organisme. A la fin du protocole, les animaux seront placés sous anesthésie générale et antalgique afin de réaliser des prélèvements finaux de sang et de tissus, qui permettront ensuite l'analyse de multiples paramètres physiologiques et métaboliques afin de répondre à l'objectif de départ et d'identifier les mécanismes sous-jacents des traitements.

Les questions inhérentes à ce projet ne permettent pas la substitution du modèle animal à un autre modèle. En effet, le protocole vise à étudier des réponses physiologiques complexes et intégrées faisant intervenir une collaboration entre plusieurs tissus métaboliques que seul le modèle animal permet d'investiguer. Cependant, en accord avec la règle des 3R, des engagements pour réduire et raffiner au mieux le modèle animal dans ce projet seront suivis. En effet, nous proposons de réaliser le protocole en 2 séries et de stopper après la première série si les résultats sont statistiquement probants. De plus, le fait de combiner plusieurs souches bactériennes d'intérêt permet de maximiser leurs effets, d'obtenir un potentiel effet synergique, et également de diminuer le nombre de traitements à tester (ici : uniquement 2 traitements, contre 6 ou 8 dans les protocoles de screening prenant en compte les effets des souches individuellement). De plus, les souris seront surveillées tous les jours afin d'identifier et de limiter tout risque de souffrance ou de mal-être. Des points limites ont été notifiés et, s'ils sont atteints, permettront de mettre fin à la procédure pour l'animal. Ce protocole expérimental ne constitue pas de double emploi, puisque la question scientifique posée ici n'a encore jamais été adressée. Il s'agit d'un projet original et l'élaboration de ce protocole évite toute redondance avec des expérimentations ultérieures. Un total de 128 souris est prévu (2 séries de 64 animaux) dans ce projet sur une période de 3 ans. Ce nombre maximum d'animaux a été estimé nécessaire pour réaliser l'ensemble des analyses, satisfaire les études statistiques et tirer des conclusions permettant de répondre à la question scientifique.

18552 Parmi les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), la colite ulcéreuse et la maladie de Crohn sont les formes les plus courantes. Les MICI sont des troubles multifactoriels, chroniques et récidivants complexes dus à une réponse immunitaire aberrante induite à la fois par le système

immunitaire inné et adaptatif, qui provoque une inflammation sévère de l'intestin grêle et/ou du côlon. Des études menées dans divers pays ont montré que l'incidence des MICI augmente, touchant environ 1 personne sur 200 dans les pays les plus développés. En Europe, l'incidence annuelle de MICI la plus élevée est de 24,3/100 000 par an pour la colite ulcéreuse et de 12,7/100 000 pour la maladie de Crohn.

La stratégie thérapeutique dépend de la gravité du retentissement de la pathologie et de la réponse clinique du patient. Les thérapies conventionnelles sont basées sur l'utilisation d'anti-inflammatoires et/ou d'immunosuppresseurs, sous formes de molécules simples ou de biomédicaments. Toutefois, malgré des avancées considérables dans le traitement des MICI, jusqu'à 20% des patients restent non-répondants aux traitements et nécessiteront, un jour, une colectomie.

De plus, 50% des patients atteints de MICI nécessitent, à terme, une intervention chirurgicale dans les 10 ans suivant le diagnostic de la pathologie. De surcroît, la sécurité et l'efficacité des thérapies conventionnelles restent limitées et elles sont associées à de nombreux effets secondaires. Ainsi, 15% des patients sont considérés comme non-répondants aux biomédicaments, tandis qu'un tiers des patients subiront une perte de réponse thérapeutique du fait de la mise en place d'une réponse immunitaire aux anticorps monoclonaux, les rendant ainsi inefficaces. De fait, il est donc urgent de trouver des approches thérapeutiques plus appropriées et plus sûres pour améliorer le traitement des MICI.

Ce projet vise à développer des thérapies plus efficaces pour le traitement des MICI. Dans ce but, un modèle murin de colite ulcéreuse sera mis en place par l'administration dans l'eau de boisson de Dextran Sulfate Sodium (DSS) 2% à des souris durant les 3 jours précédant le début des essais. La maladie apparaît 3 jours après le début de l'exposition au DSS et les sacrifices sont réalisés, au plus tard, 10 jours après. Les animaux sont malades, en moyenne, pendant 7 jours. Le modèle est, ainsi, mis en place par l'induction d'une inflammation du tractus intestinal. Une fois le modèle mis en place, l'approche thérapeutique testée repose sur trois systèmes nanoparticulaires innovants qui seront administrés par voie intraveineuse (IV), orale et/ou rectale. La validation de ces nouvelles thérapies potentielles sera faite de manière séquentielle. Dans un premier temps des études de biodistribution à la fois qualitatives et quantitatives par imagerie (nucléaire et fluorescence) seront effectuées sur des souris saines et sur des souris atteintes de colite. Ensuite, une étude pharmacocinétique sur des rats permettra d'évaluer le devenir de ces nanoparticules après administration. Les rats ont été choisis comme modèle pour cette étape dans le cadre d'une démarche 3R, car les volumes prélevés peuvent être plus importants permettant une quantification plus précise que sur un modèle murin. Cela permet de réduire le nombre d'animaux utilisés. Dans un second temps, des études d'efficacité visant à évaluer la réponse thérapeutique de la pathologie seront prévues, si les résultats des études de biodistribution et pharmacocinétique justifient la poursuite du projet. Cette stratégie séquentielle a été choisie pour mettre en place une logique de réduction et de raffinement des expérimentations (stratégie GO/NO GO). Dans le but d'obtenir un raffinement le plus important l'utilisation d'antalgiques et d'anesthésiques permettra de réduire la douleur et le stress des animaux lors de toutes procédures.

Préalablement aux expériences in vivo, des expériences in vitro ont été réalisées, afin d'étudier les effets et toxicités potentielles des nanosystèmes étudiés. Afin de permettre une potentielle translation vers des applications cliniques, l'évaluation des différentes formes nanoparticulaires développées sur des modèles murins est la dernière étape essentielle de validation de ces nouvelles approches thérapeutiques.

Un total de 1388 (1293 souris et 95 rats) animaux seront utilisés, au maximum, dans le cadre de ce projet. Pour chaque procédure décrite dans la saisine, nous avons identifié le nombre minimum d'animaux permettant d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. Les animaux atteints de la pathologie seront observés et surveillés quotidiennement, afin de détecter rapidement tout signe de souffrance. Les animaux seront hébergés dans un milieu protégé afin de limiter le risque d'infection.

18553 La myopathie que nous étudions est une maladie musculaire génétique. Elle est caractérisée par une faiblesse des muscles du tronc et du cou, conduisant au développement d'une scoliose et d'une insuffisance respiratoire sévères. Ces altérations musculaires apparaissent dès l'enfance et s'aggravent avec l'âge, entraînant une morbidité précoce. Par ailleurs nombreux patients présentent aussi un diabète associé à un poids faible dû à la perte musculaire, et à une augmentation des tissus adipeux. Enfin, les patients souffrent d'un vieillissement prématuré avec une détérioration rapide de leurs capacités physiques.

Les mutations responsables de cette myopathie ont donc des effets multiples et néfastes qui ont des conséquences délétères chez les patients, en particulier sur l'activité musculaire et sur le métabolisme énergétique, c'est à dire sur la dépense et le stockage d'énergie dans l'organisme.

Nous voulons comprendre les mécanismes responsables de ces dysfonctions musculaires et métaboliques pour mettre au point des outils permettant de caractériser la pathologie et trouver des traitements adaptés, car à ce jour, aucun traitement efficace n'existe.

Grâce à nos modèles de cellules inactivées pour le gène d'intérêt et aux cellules issues de biopsies de patients, nous venons d'identifier des mécanismes pathologiques et dix molécules thérapeutiques candidats, utilisées en médecine. Mais l'étude des fonctions du muscle et du métabolisme, ainsi que la validation de l'efficacité d'un traitement nécessitent une analyse in vivo et donc l'utilisation de modèles animaux. Les tests cellulaires nous ont permis de sélectionner et de réduire le nombre de molécules à tester sur les animaux et par conséquent de limiter leur utilisation au strict minimum (remplacement/réduction). Nous disposons d'un modèle de souris transgéniques qui reproduit les différentes altérations décrites chez les patients atteints de cette myopathie.

Nous proposons de développer nos recherches selon les axes exposés ci-dessous et suivant les principes des 3R, en utilisant des cellules musculaires en culture tant que les expériences le permettent et le modèle de souris transgéniques pour les expériences nécessairement in vivo. Nous avons choisi une chronologie de procédures qui permet d'utiliser les animaux dans plusieurs procédures tout en respectant leur bien-être, et donc de minimiser le nombre d'animaux pour ce projet. Nous comptabilisons un total de 640 animaux pour l'ensemble du projet décrit ci-dessous :

1) Compréhension des mécanismes qui conduisent des mutations à la myopathie:

- Caractérisation moléculaire des mécanismes responsables de la myopathie et recherche de marqueurs permettant d'établir le diagnostic et de suivre les effets des traitements, tout d'abord dans des cellules musculaires en culture, puis validation dans les muscles (Remplacement-Réduction-Raffinement).
- Analyse de l'état physiopathologique (paramètres physiologiques) à partir de prélèvements sanguins et musculaires sur animaux traités/non traités.

2) Conséquences de la fonction mutée sur le métabolisme énergétique et sur la fonction musculaire, effets des traitements:

- L'évaluation de l'état métabolique global et musculaire des animaux traités/non traités nécessite une étude in vivo (sans alternative) par méthodes non invasives et par prélèvements sanguins : mesure de composition corporelle (masse grasse/masse maigre), bilan énergétique, profil glycémique et insulémique.
- L'évaluation de la fonction musculaire des animaux traités/non traités nécessite d'être réalisées sur l'animal (sans alternative): tests d'effort sur tapis roulant, mesure de la force et de la résistance à la fatigue musculaire.

18554 La Directive Cadre Européenne sur l'eau fixe le bon état écologique des cours d'eau et la libre circulation des espèces piscicoles. Les propriétaires d'ouvrages transversaux doivent ainsi se mettre en conformité en équipant ou effaçant leur(s) ouvrage(s). Certains maîtres d'ouvrage sont ensuite tenus d'évaluer l'efficacité de ces actions en mettant en place des suivis des comportements des poissons aux abords des ouvrages, avant et/ou après restauration, a fortiori sur des ouvrages positionnés en entrée de bassin versant et sur des axes à migrateurs amphihalins. L'outil RFID est de plus en plus couramment utilisé pour quantifier ces comportements. En effet, il permet de

mesurer la proportion d'individus qui cherchent à migrer vers l'amont et ceux qui parviennent effectivement à franchir l'obstacle. Il faut pour cela procéder au marquage d'individus à l'aide de micro-puces RFID appelées PIT tags et équiper les ouvrages à l'aide d'antennes de détection reliées à un lecteur-enregistreur.

Cette étude a pour objectif l'évaluation de l'efficacité d'une passe à poissons par l'alose de Méditerranée, espèce de poisson migrateur endémique du bassin méditerranéen. Elle vise à mettre en lumière la « transparence » de l'ouvrage à la migration de cette espèce, c'est à dire l'absence de sélectivité et de retard à la migration.

Les poissons seront capturés par pêches à la ligne, méthode désormais couramment employée pour les échantillonnages d'aloses et réputée la moins impactante : 150 individus seront marqués à l'aide de PIT tags de 23 mm. Leurs déplacements dans la passe à poissons seront suivis uniquement à l'aide d'antennes de détection fixes préalablement installées en aval et en amont de la passe.

Le modèle animal ne peut pas être remplacé pour répondre à la question posée (règle des 3 R : Remplacement) ; en outre, il est indispensable d'avoir recourt à des poissons sauvages pour étudier leur comportement in natura. L'effectif d'individus marqués est le minimum pour obtenir un échantillon représentatif du comportement migratoire de l'espèce au niveau de l'aménagement hydroélectrique étudié, tout en limitant au maximum les atteintes sur la population (Règle des 3R : Réduction). Les marques PIT tags seront implantées chirurgicalement dans la cavité péritonéale des poissons. Les animaux seront anesthésiés avant les opérations de marquage, leurs constantes vitales seront surveillées et leur réveil post-marquage assuré avant de les relâcher dans le milieu naturel à proximité du lieu de capture (règle des 3R : Raffinement).

18555 Le système immunitaire a un rôle prépondérant dans l'élimination des cellules cancéreuses mais c'est aussi en partie lui le responsable de l'échappement tumoral. Ces dernières années, la compréhension des différents acteurs d'une réponse inflammatoire que ce soit dans le cas d'auto-immunité, de rejet d'organes, ou de réponse anti-tumorale a mis en évidence l'équilibre entre l'activation et l'inhibition de cette réponse. Cet équilibre est maintenu par des populations effectrices telles que les lymphocytes T, les lymphocytes B ou encore les NK et des populations régulatrices telles que les lymphocytes régulateurs ou les cellules myéloïdes suppressives, principaux médiateurs du développement tumoral et de la rechute dans le cas du cancer. Les traitements d'immunothérapie actuels visent à contrebalancer cet équilibre. Dans le cas du cancer, les thérapies cherchent à améliorer l'action des cellules T effectrices tout en inhibant la fonction des cellules régulatrices. La voie PD-1/PD-L1 joue un rôle majeur dans l'inhibition de la réponse des lymphocytes T. Des anticorps ciblant cette voie PD1/PD-L1 (Nivolumab, Pembrolizumab, Avelumab) ont été générés pour réactiver la réponse T antitumorale et ont démontré des effets bénéfiques considérables dans le traitement de divers cancers. Ces essais cliniques ont été rendus possibles grâce à la preuve de concept sur des modèles précliniques murins. Aujourd'hui, ces anticorps anti-PD-1/PD-L1 sont approuvés comme agents thérapeutiques de première ligne pour certains cancers du poumon et de la peau. Cependant il est estimé que seulement une partie des patients (15-60% selon le cancer) répond à la thérapie et que plusieurs rechutes sont observées après traitement. Il est donc essentiel de chercher d'autres molécules et combinaisons thérapeutiques. Dans ce projet, nous proposons de tester in vivo de nouvelles thérapies combinatoires ciblant le récepteur inhibiteur PD-1 et de nouvelles molécules du système immunitaire dans le but d'induire une réponse T anti-tumorale efficace et durable. Nous avons généré de nouveaux formats d'anticorps dit « bi-spécifiques » capables d'interagir avec 2 molécules en même temps, nous supposons que ce format améliorera l'effet de la monothérapie anti-PD-1. Des tests in vitro sur cellules humaines apportent déjà des résultats encourageants, et avant le lancement en essai clinique, il est nécessaire d'avoir recours aux expérimentations chez la souris. En premier lieu, nous devons étudier la pharmacocinétique (PK) de ces nouveaux anticorps afin d'évaluer leurs paramètres de biodistribution et d'élimination in vivo. De plus, cette étude permettra d'établir la relation dose/temps de demi-vie, le profil linéaire, la dose efficace ainsi que le mode d'administration (intraveineux, sous cutané ou intrapéritonéal) de la molécule chez la souris. Ces

résultats pourront entrer dans la justification des premières doses pharmacologiquement actives chez l'homme. L'efficacité thérapeutique de ces anticorps pourra dans un autre temps être évaluée dans des modèles de cancer chez la souris ainsi que des études de pharmacocinétique chez le singe avant le lancement en essai clinique chez l'homme.

Le nombre maximum d'animaux utilisé au cours de cette étude complémentaire sera de 342. Dans un souci de respect de la règle des 3R, le suivi des animaux sera respecté en fonction de la sévérité du protocole, ici ne nécessitant pas une fréquence quotidienne, et la gestion de la douleur maîtrisée le plus adéquatement possible afin d'apporter les soins nécessaires le plus rapidement aux animaux. Dans le but de respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux par groupe a été calculé pour limiter la quantité d'animaux utilisés tout en conservant un nombre suffisant pour une évaluation statistique fiable. De plus, le nombre d'animaux demandé étant une estimation haute, ce nombre pourra être réduit dans les phases 2 et 3 si certaines molécules ne montrent pas d'intérêts *in vitro*. Les animaux sont maintenus dans un cycle jour/nuit de 12h/12h avec un accès à l'eau et à la nourriture à volonté. Le nombre d'animaux par cage est de 5 pour limiter le stress de la surpopulation. Des brindilles de papier sont placées dans la cage pour permettre aux souris de s'enfouir et se cacher. Si un mâle se retrouve dominant et attaque ses congénères, il sera isolé dans une cage individuelle. Après prélèvement et injection, les animaux sont surveillés jusqu'à leur réveil complet. L'étude statistique choisie sera le test de Mann-Whitney ou celui de Kruskal-Wallis, respectivement si le nombre de groupes à comparer est de deux ou plus de deux. Ces tests reposent sur l'analyse de données non paramétriques déterminée quand le nombre de sujet est inférieur à 30. Ces tests nous permettent d'analyser nos données en combinant un test statistique fiable et un nombre d'animaux très réduit (de plus, de part des études antérieures, nous savons que les données obtenues chez la souris dans ce type d'expérience sont très reproductibles). Ayant des animaux dans deux animaleries différentes, nous devons demander une autorisation pour chaque animalerie. Les expériences seront réalisées dans l'une ou l'autre en fonction de nos expériences déjà en cours au moment afin de ne pas faire d'allers-retours entre les deux animaleries.

18556 La thérapie génique est une approche thérapeutique majeure pour les maladies génétiques rares touchant les muscles, le foie, les yeux et le système nerveux. Elle consiste à apporter via des vecteurs viraux un gène normal médicament dans les cellules malades afin de remplir la fonction déficiente. Cependant, l'utilisation de vecteurs viraux présente des limitations qu'il est indispensable de résoudre. 1) Il est nécessaire d'administrer en une seule fois de très grandes quantités de vecteur pour cibler efficacement les tissus/organes, ce qui pose des problèmes de production et peut engendrer des effets secondaires en raison de la quantité administrée; 2) la réadministration des vecteurs n'est pas possible à cause de la mise en place de réactions de défenses de l'organisme que les vecteurs engendrent lors de la première administration, réduisant ainsi la possibilité de pallier un éventuel échec thérapeutique ou d'étaler les injections dans le temps.

Pour répondre à cette problématique, des stratégies utilisant des immunosuppresseurs sous forme libre, seuls ou combinés ont été proposées pour limiter ou contrôler la réponse immunitaire dirigée contre le vecteur. Cependant, la majorité d'entre elles s'avèrent inefficaces ou risquées. Parmi la minorité potentiellement intéressante, aucune n'a encore été validée en clinique et toutes présentent des limitations qui rendent essentiels le développement de nouveaux outils et formulations avec un potentiel d'application rapide en clinique. Ici, notre but est de faire la preuve de principe de l'efficacité de drogues connues délivrées par des nanoparticules de façon à optimiser leur efficacité sur le système immunitaire afin de permettre la réinjection du vecteur médicament. Nous allons tester l'efficacité de ces composés sur le contrôle de la réponse immunitaire suite à l'administration d'un vecteur en faisant varier la dose de composé et de vecteur, leur cinétique d'administration, et en testant la possibilité de réadministrer le vecteur pour améliorer l'expression du gène médicament.

L'utilisation d'animaux est indispensable pour ce type d'étude. En effet, l'émergence d'une réponse immunitaire est à la base une réaction physiologique de l'organisme entier à l'introduction d'un composé étranger dans le but de garantir une défense. Elle résulte de la circulation des composés dans de nombreux organes et d'interactions cellulaires complexes qui ne peuvent être remplacés par un modèle cellulaire (pas de remplacement). Même si certaines expériences *in vitro* permettent

d'analyser des paramètres de ces réponses immunes, seul le modèle animal est à même de mimer la complexité de la réponse immunitaire résultante de l'injection d'un produit. La souris est choisie comme espèce car elle développe une réponse immunitaire contre les vecteurs, ce qui permet de tester les stratégies thérapeutiques, et cette espèce est aussi celle où a été faite la preuve de principe de la thérapie génique par vecteur rAAV.

Dans le respect de la règle des 3R, nous allons réduire le nombre d'animaux à son minimum en : 1) réalisant une approche statistique prédictive de façon à utiliser le nombre d'animaux adéquats pour avoir des résultats statistiquement interprétables, 2) réalisant une analyse longitudinale sur les mêmes animaux, 3) réalisant des analyses complémentaires de différente nature sur les mêmes animaux. Afin de raffiner nos expériences, 1) nous utilisons des formulations injectables chez la souris, dont l'efficacité a déjà été démontrée dans d'autres contextes 2) les prélèvements de sang seront réalisés en alternance au niveau de plusieurs sites pour éviter les lésions favorisées par la répétition. Nous nous attacherons également à faire en sorte de limiter le stress des souris lors des différents prélèvements par utilisation d'anesthésiques. De par nos connaissances, nous ne nous attendons pas à d'effets dommageables des produits injectés, toutefois, des observations quotidiennes des animaux seront réalisées et une conduite à tenir est définie en cas d'anomalie.

Le nombre de souris nécessaire a été estimé à 12 souris par groupe par une étude statistique prédictive. Notre projet durera 4 ans et nécessitera l'utilisation totale de 900 souris.

18557 Le projet a pour objectif d'assurer en station expérimentale la fourniture de matériels biologiques d'intérêt (sang, sérum, sécrétions ou tissus d'animaux) nécessaires à la réalisation des projets de Recherche et Développement (R&D) et/ou de services à façon. Ces matériels biologiques ne peuvent pas être produits sans le recours à l'animal de laboratoire.

Le projet peut consister à procéder en amont à l'immunisation des animaux vis-à-vis d'un immunogène spécifique d'origine microbienne (tout ou partie de virus, bactérie, champignons, etc.) pouvant déclencher chez l'animal hôte une réponse immunitaire. Celle-ci est spécifique et peut être amplifiée par des injections de rappel de l'immunogène (ou antigène, avec ou sans adjuvant). Un prélèvement sanguin permet d'évaluer la production et la qualité des anticorps par le laboratoire utilisateur. Lorsque le titre est jugé suffisant, un prélèvement plus conséquent est réalisé afin d'obtenir du matériel biologique hyper-immun, à savoir très concentré en anticorps. Dans certains cas, les animaux peuvent être euthanasiés afin de récupérer la quasi-totalité du volume sanguin circulant, ainsi que des organes et tissus.

L'espèce et le nombre d'animaux utilisés se base sur l'historique du produit testé et du projet de Recherche et Développement, et sur les exigences réglementaires. Considérant que le nombre d'études envisagées par an est de 4 avec un effectif de 30 animaux par étude, le nombre d'animaux utilisés dans le projet est estimé à 600 sur une période de 5 ans.

Les procédures d'immunisation ne doivent en principe pas entraîner de réactions générales et ne présentent donc a priori pas de risque pour les animaux. Les dommages engendrés par les procédures peuvent être le stress et la gêne liés aux contentions, aux administrations de produits, aux prélèvements, et aux éventuelles mises à jeun. Si cela s'avère adéquat, une anesthésie et une analgésie peuvent être réalisées pour garantir le bien-être de l'animal. Le personnel vérifie quotidiennement l'état général des animaux, il est compétent pour identifier si des points limites spécifiques préalablement établis sont atteints. Dans le cas où les animaux présentent une dégradation de leur état général ou des signes cliniques d'une maladie, ils sont pris en charge par un vétérinaire. Les euthanasies, si elles sont pratiquées, le sont selon les méthodes recommandées par la réglementation et approuvées par notre comité d'éthique et la cellule bien-être animal.

Toutes les procédures de ce projet ont été conçues pour respecter le principe des 3 R conformément à la Directive Européenne 2010/63/UE.

Remplacement: Les matériels biologiques d'origine animale ne sont fournis qu'en cas de stricte nécessité (i. e. s'il n'existe pas d'alternative in vitro).

Réduction: Pour des études réglementaires, le nombre d'animaux est fixé par les textes. En amont, lors des phases de recherche, l'espèce et le nombre d'animaux utilisés sont choisis afin d'optimiser

la quantité de matière active par animal. Lorsqu'il s'agit de récolte de sérum, le nombre d'animaux est dépendant du volume de sérum nécessaire. Le but in fine est d'améliorer sans cesse les protocoles, réduire le nombre d'animaux utilisés dans des procédures sévères et d'éviter toute souffrance inutile.

Raffinement: Les conditions d'hébergement seront adaptées à l'espèce et à l'âge des animaux pour maximiser leur confort et leur bien-être. Sauf cas particuliers, les animaux auront un accès direct et illimité à l'eau de boisson et à la nourriture. Si possible, les animaux sont hébergés avec au minimum un autre de ses congénères de manière à ne pas induire un stress d'isolement. Leur environnement est enrichi. Les procédures sont approuvées par notre comité d'éthique qui garantit l'amélioration constante des techniques de soins et des conditions de vie pour les animaux au regard de l'avancée des connaissances vétérinaires.

18558 Afin d'optimiser l'efficacité alimentaire et la santé digestive des volailles et limiter les rejets dans l'environnement, des enzymes peuvent être incorporées dans les aliments. De façon courante, des xylanases, des β -glucanases et des phytases sont utilisées. Le tube digestif des animaux contient de nombreuses bactéries dont la paroi cellulaire est régulièrement renouvelée, libérant dans la lumière intestinale des peptidoglycanes qui peuvent avoir une action pro-inflammatoire. La muramidase ou lysozyme peut permettre le catabolisme de ces peptidoglycanes. Des études récentes ont montré que l'incorporation de cette enzyme dans l'aliment permettait d'améliorer les performances de croissance des poulets et des dindes. L'EFSA(European Food Safety Authority) a donc autorisé l'utilisation de cette enzyme dans l'alimentation de ces espèces. L'objectif de la présente étude est d'analyser les effets d'une supplémentation en muramidase de l'aliment distribué à des poules pondeuses sur les performances de ponte et la qualité des œufs. L'état des animaux (propreté des plumes, picage éventuel, coussinets plantaires) et de la litière sera également évalué. Au total, 300 poules seront mises en place à l'âge de 17 semaines. Puis, à l'âge de 22 semaines, 288 poules seront réparties en 3 lots (témoin non supplémenté, lots supplémentés en muramidase à 2 doses différentes). A l'âge de 42 semaines, 64 poules par lot seront mises à mort pour évaluer la digestibilité de l'aliment sur des pools de contenu iléal (8 pools de 8 poules). Sur 12 poules par lot, l'impact de l'enzyme sera évalué sur le développement de la muqueuse intestinale au niveau du jéjunum, sur la composition du microbiote des caeca et sur l'expression de gènes impliqués dans l'absorption de nutriments dans l'iléon. Des prélèvements de sang seront réalisés juste avant la mise à mort de ces poules afin de mesurer différents métabolites.

Réduction : Afin de limiter le nombre d'animaux mis en élevage, le nombre de poules par parquet a été limité à 8 afin de privilégier le nombre de parquets et donc de répétitions par lot soit 12 pour analyser les performances de ponte et la qualité des œufs.

Remplacement : Compte tenu de l'objectif appliqué du projet en nutrition, digestion et zootechnie, le modèle animal ne peut être substitué par un modèle d'étude in vitro ou in silico.

Raffinement : Les poules seront élevées au sol sur litière et en groupes ce qui permet les interactions sociales. La densité en expérimentation sera bien en dessous de la limite maximale autorisée en élevage commercial (0,6/m² vs. 9/m²). Les poules feront l'objet d'une surveillance quotidienne par les animaliers qui ont l'expérience de l'élevage des volailles et de leur comportement. Le milieu sera enrichi avec des perchoirs. Toute manifestation de symptômes comportementaux persistants définis par un point limite qui entrainera le retrait de l'animal de l'expérimentation.

18559 Les lymphocytes T CD8 jouent un rôle important dans les réponses antivirales et anti tumorales. Lors d'une infection par un pathogène, les cellules CD8 vont se multiplier et se différencier passant d'un état dit naïf à un état effecteur. Les cellules CD8 dites effectrices ont la capacité d'éliminer les cellules infectées. Une fois le pathogène éliminé, seule une fraction des CD8 effectrices va survivre et former les CD8 dites mémoires. Ces cellules sont caractérisées par une meilleure survie et une capacité de réponse augmentée, assurant ainsi la protection de l'hôte lors d'une réexposition au pathogène.

A l'heure actuelle, la généalogie des cellules mémoires est encore sujet à controverse avec deux hypothèses principales défendues :

- 1) les cellules CD8 naïves se différencient en CD8 effectrices dont une fraction se différencie en CD8 mémoires une fois l'infection résolue
- 2) les cellules CD8 naïves se différencient en CD8 effectrices d'une part et en CD8 mémoires d'autre part.

Nous avons démontré par la mesure de l'expression de protéines à la surface des cellules au cours d'une réponse antivirale et l'utilisation de modèles mathématiques que les cellules CD8 mémoires sont générées en grande majorité à partir de CD8 effectrices, mais qu'une faible fraction dérive de CD8 naïves, réconciliant ainsi les deux hypothèses.

L'objectif de ce projet est de valider in vivo, chez la souris, notre modèle mathématique.

Pour cela, nous utiliserons le BrdU, un analogue de la thymidine qui s'incorpore dans l'ADN des cellules en cours de division. Cette molécule nous permettra de tracer, par cytométrie de flux, les cellules s'étant divisées à un temps donné avant de devenir CD8 mémoire. Pour cela, des souris seront infectées par le virus de la vaccine par voie intranasale afin d'induire une réponse immunitaire.

Les souris recevront ensuite une injection intrapéritonéale de BrdU à un temps X. Le BrdU sera incorporé dans l'ADN des cellules en prolifération durant les 12-24h suivants l'injection le BrdU non incorporé étant rapidement éliminé de l'organisme. Les animaux seront mis à mort à la résolution de l'infection (> 25 jours) pour mesurer la présence de cellules contenant du BrdU dans les organes. Ainsi, si l'on retrouve des cellules contenant du BrdU plus de 25 jours après infection, nous pourrions conclure que ces cellules se sont différenciées en cellules mémoire au temps X. Différents temps d'injection de BrdU seront testés afin de déterminer la cinétique de différenciation en CD8 mémoire d'une part et de déterminer par la mesure de divers paramètres si le temps auquel ces cellules sont générées influe sur leur capacité de protection.

Le projet nécessitera l'utilisation de 270 souris maximum.

Le choix du modèle souris est imposé par la nécessité de pouvoir utiliser des animaux génétiquement modifiés. De plus, la mise en place d'une mémoire immunitaire est un phénomène biologique complexe et dynamique, faisant intervenir de multiples types cellulaires dans divers tissus de l'organisme rendant impossible son étude dans des tests in vitro.

Le nombre d'animaux utilisés est réduit au minimum nécessaire à l'interprétation statistique des résultats des diverses expériences. L'infection par le virus de la vaccine étant asymptomatique chez la souris, aucune souffrance n'est attendue. De plus, l'injection de BrdU ne présente aucun effet secondaire. Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage que pourraient ressentir les animaux.

18560 « Le cancer hépatocellulaire (CHC) représente un problème de santé majeur en France et se situe 4ème en terme de mortalité par cancer dans le monde. Le CHC se développe dans 80% des cas sur une fibrose préexistante liée à la consommation chronique d'alcool, liée à des désordres métaboliques ou à une infection chronique virale. Son traitement repose sur la transplantation hépatique et la résection chirurgicale pour les cas précoces. Cependant, la majorité des CHC sont diagnostiqués à des formes avancées. L'arrivée sur le marché de l'immunothérapie (ICI), qui permet de lever certains mécanismes inhibiteurs du système immunitaire afin de lui permettre de s'activer plus efficacement pour qu'il s'attaque aux cellules tumorales, a révolutionné la prise en charge de nombreux cancers dont le CHC. Cependant, un nombre limité de patients y répond et les mécanismes de résistances sont peu documentés.

L'objectif principal de ce projet sera d'identifier les acteurs (cellules immunitaires) et voies de signalisation impliqués dans la résistance aux ICI. Le développement de la fibrose hépatique suivie du CHC sera modélisé dans un modèle murin après gavage d'un agent fibrosant suivi de la greffe dans le lobe hépatique de cellules tumorales mutées ou non pour la voie de signalisation d'intérêt.

L'effet du traitement ICI reçu en i. p. sera suivi longitudinalement par des techniques d'imagerie et l'implication des cellules immunitaires (déplétion par des anticorps neutralisants en i. v.) sera déterminée. Ainsi, afin de réaliser l'ensemble de ces expériences, 1760 souris sont demandées sur une période de 5 ans.

Dans le respect des règles des 3R, à savoir:

-REEMPLACER: des expériences réalisées en prospectif chez l'homme ont été mises en place afin de remplacer au possible l'utilisation d'animaux en orientant notamment l'étude de ce projet à certaines populations de cellules immunitaires d'intérêt. Cependant, seul un modèle murin qui modélise la physiopathologie du CHC et qui réunit tous les acteurs de l'immunité innée et adaptative permettra d'explorer notre hypothèse d'étude.

-REDUIRE: les expériences seront combinées dans la mesure du possible tout en gardant un nombre nécessaire et suffisant d'animaux pour obtenir une puissance statistique raisonnable dans l'analyse des résultats, et en travaillant à partir d'un nombre technicable d'animaux en même temps.

-RAFFINER: Les animaux seront suivis quotidiennement par le personnel zootechnique expérimenté et des mesures visant à stopper toute souffrance ou inconfort seront prises, allant de la prise d'analgésique au sacrifice de l'animal. Les points limites seront fixés notamment basés sur la perte du poids des animaux et des modifications de leur état global (prostration, isolement, pelage hirsute, etc.) afin de stopper l'expérimentation avant induction de douleur ou souffrance des animaux. Enfin, Les souris seront hébergées dans un milieu enrichi leur permettant de retrouver leur comportement primaire de nidification. »

18561 Les esturgeons sont des poissons très anciens (apparition à l'époque des dinosaures). Les activités humaines (surpêche, pollutions, dégradation des habitats) ont entraîné leur raréfaction en milieu naturel. 80 % des espèces d'esturgeon sont aujourd'hui menacées. Des recherches menées en France et à l'étranger ont permis la mise au point de méthodes d'élevage en piscicultures. Les élevages se sont fortement développés dans les années 80-90, en rapport avec l'interdiction des pêches. La reproduction assistée est bien maîtrisée. Elle permet la production de poissons pour les élevages commerciaux, la recherche et pour soutenir les stocks sauvages menacés, via des repeuplements.

Nous disposons depuis le début des années 80 d'un stock d'esturgeons sterlet (*Acipenser ruthenus*), issu d'un élevage hongrois. Cette espèce a été très étudiée (biologie, nutrition, comportements...) et présente de fortes similitudes avec les autres espèces d'esturgeons notamment pour le développement embryonnaire. Son élevage est bien maîtrisé. Sa croissance est rapide et son poids à l'âge adulte n'est pas très élevé (3 à 5 kg). Il est possible d'obtenir des reproductions « assez rapidement », car sa puberté est plus précoce (3 à 4 ans) que la plupart des autres espèces. Cela en fait un bon modèle pour les expérimentations à venir visant à préserver les espèces d'esturgeons menacées. Elles concernent notamment les effets des pollutions et du changement climatique, ainsi que la façon d'élever les poissons destinés au repeuplement. . Par conséquent, nous ne pouvons substituer d'autres modèles, à cette espèce (« R » de « Remplacement »).

Nos géniteurs captifs sont utilisés pour la production de gamètes, embryons, jeunes poissons, dédiés à ce type d'expérimentation. Ils sont obtenus grâce à la réalisation de reproductions assistées. Nous avons une expérience de plus de trente années concernant l'élevage des esturgeons. Nous disposons de structures agréées pour la pisciculture et l'expérimentation, ainsi que de personnels spécifiquement formés à ces métiers.

Il est préférable dans ces conditions d'assurer en interne cette production, plutôt que de se fournir dans des élevages commerciaux où les impératifs de volumes et de calendriers de production ne sont pas forcément concordants et les risques de transmission de pathologies liés à la circulation de produits biologiques sont réels. Assurer cette reproduction assistée nous permet donc de répondre aux impératifs de traçabilité et de qualité notamment sanitaire et génétique, nécessaires pour garantir la fiabilité des travaux de recherche.

Les géniteurs que nous hébergeons sont aujourd'hui âgés. Cela se traduit par une baisse de leur capacité à se reproduire et de leur fertilité. Nous souhaitons pouvoir réaliser des reproductions assistées pour le renouvellement de ce petit cheptel et permettre la production de cellules, embryons, larves et juvéniles pour des expérimentations. Les géniteurs parviennent à maturité tous les 2 à 4 ans. En l'absence de reproduction, leurs gamètes avortent. A ce stade, il y a un risque de perte des animaux, essentiellement les plus âgés qui sont les plus fragiles. Les méthodes que nous utilisons pour les pontes sont celles classiquement utilisées en élevage. Le choix des poissons pour les reproductions s'effectue par échographie pour les mâles et par analyse des ovocytes pour les femelles. Une biopsie réalisée sous anesthésie est nécessaire pour récupérer les ovocytes et estimer leur qualité (réalisation d'un bio test). Les poissons montrant des états favorables pour la reproduction sont transférés dans des bassins spécifiquement dédiés. Les conditions environnementales et les densités d'élevage restent pour eux équivalentes. Ces bassins sont de taille plus réduite que les bassins d'élevage, ce qui permet de faciliter la surveillance et d'accéder plus facilement aux animaux ("R" de "Raffinement"). Les reproductions pour les esturgeons en captivité ne s'effectuent pas directement dans les bassins. Les poissons sont stimulés (stimulation thermique et injection de substance) pour permettre la production de gamètes. Les œufs et semences sont prélevés séparément et les fécondations réalisées par mélange avec de l'eau. Pour limiter le stress durant la collecte des gamètes, les poissons sont endormis (utilisation d'un bain anesthésiant) et placés sur une table d'opération garnie d'une mousse pour éviter le contact des poissons avec la table ("Raffinement"). Les gamètes sont récupérés par massage de la partie ventrale des animaux. Après massage, si la récupération des œufs est difficile, une microchirurgie par voie interne, sous anesthésie, sera réalisée chez les femelles.

Autre application du « R » de « Raffinement », durant leur conservation en bassin de reproduction, les géniteurs sont observés 2 fois par jour pour évaluer leur état de santé. En cas de problèmes détectés, ils sont isolés, soignés et sortis du dispositif de reproduction. Les autres ne sont conservés qu'une à deux semaines dans ces bassins pour limiter les effets négatifs du confinement.

Nous n'avons pas à ce jour enregistré de pertes de géniteurs liées directement à l'activité de reproduction assistée. La reproduction sera réalisée en avril, au moment du pic de maturation, permettant ainsi de limiter les risques d'utilisation d'animaux qui n'auraient pas atteint leur pleine maturité.

Application du « R » de « Réduction » : nous comptons environ 200 poissons encore potentiellement en état de se reproduire et estimons avoir besoin pour les reproductions de 10 mâles et 10 femelles différents par an (soit 20 poissons par an et 10 % des effectifs) pendant 5 ans (100 au total), pour la reconstitution du cheptel. Cela devrait permettre de maintenir une variabilité génétique proche de celle présente dans le stock initial. Le nombre de poissons utilisé chaque année est limité volontairement pour le confort des animaux et pour disposer du temps nécessaire à la réalisation des croisements différents (fécondation des œufs avec la semence de plusieurs mâles).

18562 Une perturbation de la balance entre excitation (neurones glutamatergiques) et inhibition (neurones GABAergiques) dans le cerveau est à l'origine de maladies neuro-développementales associées à un retard mental, mais aussi à l'apparition de maladies neurologiques telles que la schizophrénie et l'épilepsie.

Le gène étudié est impliqué dans la neurogenèse ainsi que dans la régulation de la balance entre excitation et inhibition. La perte de fonction de ce gène entraîne un syndrome de retard mental sévère associé à une diminution de la taille du cerveau, de l'épilepsie, des comportements autistiques et un déficit moteur.

Nous avons inactivé une copie de ce gène dans les neurones GABAergiques de souris afin de d'analyser de manière spécifique le rôle de ce gène dans ces neurones. Nous avons analysé le comportement de souris adultes et retrouvé les phénotypes associés au syndrome humain : déficit de mémoire, d'interaction sociale et épilepsie. De plus, nous avons trouvé un impact sur le développement du striatum, structure neuronale impliquée dans le contrôle moteur et le comportement.

Pour ce projet, nous voulons analyser l'impact de l'inactivation du gène sur le développement post-natal des souriceaux et approfondir l'analyse comportementale de ces souris ainsi que de souris ayant trois copies de ce gène (souris trisomiques). Nous étudierons le développement moteur et sensoriel des souriceaux à partir de la naissance et pendant les 20 premiers jours. Arrivés à maturité (2 mois 1/2), une analyse comportementale sera réalisée par poursuite automatisée en vidéo de petits groupes de souris grâce à un implant d'une puce RFID permettant d'identifier chaque souris. Enfin, nous effectuerons un test pharmacologique afin de regarder la résistance à la catalepsie (arrêt de mouvement volontaire induite par une drogue), qui peut être modifiée chez nos souris mutantes. Ce test nous permettra de savoir le circuit neuronal des ganglions de la base dont le striatum fait partie est affecté chez nos souris mutantes.

Remplacement : le modèle animal est le seul qui nous permet d'étudier dans son ensemble les effets du gène d'intérêt sur les fonctions vitales ainsi que le développement moteur de l'animal. De plus, les anomalies à observer nécessitent un modèle vivant suffisamment proche de l'homme pour avoir des tests qui peuvent être transposés à celui-ci. Le modèle souris est donc la meilleure option ici.

Réduction : pour cette étude, nous utiliserons deux modèles : un modèle d'inactivation du gène dans les neurones GABAergiques et un modèle de surexpression du gène. 32 individus (16 mâles et 16 femelles) mutants et autant de contrôles sont requis pour obtenir une puissance statistique suffisante afin de conclure à un phénotype ou non. Cela nécessitera donc 32×2 génotypes $\times 2$ modèles = 128 souris. L'inactivation du gène dans les neurones GABAergiques entraîne de l'épilepsie et une mortalité d'une partie des individus, jusqu'à 30% avant 4 mois, malgré une surveillance renforcée. Ainsi, nous avons limité la durée de l'étude dans le temps et pris en compte cette létalité pour déterminer les effectifs nécessaires pour avoir une bonne étude statistique des résultats Il nous faudra donc produire 20 souris en plus, donc 148 souris. Nous prévoyons une deuxième cohorte d'animaux afin de valider les phénotypes observés si demandé pour une publication, ce qui doublera nos effectifs (total 296). Pour les analyses pharmacologiques, nous réaliserons tout d'abord les tests préliminaires avec différentes doses de produits sur 20 animaux afin de mettre au point le protocole de catalepsie, portant ainsi le nombre d'animaux à 316 au maximum.

Raffinement : Les souriceaux provenant d'une même portée seront gardés ensembles avec leur mère dans les cages de stabulation. Ils ne seront isolés durant de courtes durées, lors des tests. L'ensemble des tests sont peu voire non-invasifs et n'entraîne pas de stress ou souffrance sévère pour l'animal. Les souris feront l'objet d'un suivi permettant de s'assurer de leur bien-être et de leur santé. Les animaux présentant des signes de douleur seront euthanasiés car inaptes à une étude comportementale.

18563 La sénescence cellulaire est la réponse d'une cellule aux dommages qu'elle subit. La cellule cesse alors définitivement de croître pour éviter de devenir une cellule cancéreuse. De plus, les cellules sénescents sécrètent de nombreuses molécules de signalisation afin que les cellules voisines initient la réparation tissulaire. Ces molécules guident également le système immunitaire pour éliminer les cellules sénescents des tissus. Cependant, si les cellules sénescents ne sont pas supprimées à temps, les signaux puissants qu'elles libèrent peuvent avoir un impact négatif sur l'ensemble des tissus. L'accumulation de cellules sénescents est notamment le principal moteur du vieillissement et des maladies liées à l'âge, et une forte charge de cellules sénescents peut déclencher la formation de tumeurs et accélérer la croissance des tumeurs existantes.

Nous avons récemment découvert une nouvelle caractéristique des cellules sénescents, à savoir la fragmentation cellulaire, par laquelle les cellules sénescents cassent des fragments d'elles-mêmes. Nous avons observé ce phénomène lorsque la sénescence était causée par l'irradiation aux rayons X et aussi par l'activation oncogénique. De plus, nous l'avons détecté dans différents types de cellules humaines et de souris, ainsi que dans le foie de souris in vivo. Le rôle exact de ces fragments est inconnu, mais ils ont un potentiel certain pour transmettre des signaux importants aux cellules voisines.

Pour affiner notre protocole, nous avons d'abord étudié les effets directs des fragments sur les cellules en culture. En utilisant des cellules cancéreuses du foie, nous avons observé que le traitement répété avec des fragments fraîchement isolés induisait une croissance plus rapide des cellules. Cependant, pour comprendre complètement la fonction des fragments, nous devons étudier leurs effets sur les tissus d'un organisme vivant. Les tissus vivants sont complexes, composés de différents types de cellules et affectés par l'organisme entier, qu'il est impossible de modéliser en culture. De plus, les fragments sont susceptibles de stimuler le système immunitaire ; nous devons donc étudier les effets chez des souris immunocompétentes et immunodéficientes.

L'injection intrahépatique guidée par ultrasons est un modèle idéal à cet effet. Dans ce modèle, des cellules ou des fragments sont injectés à un site spécifique dans le foie d'une souris anesthésiée et grâce à l'imagerie ultrasonore, aucune chirurgie n'est nécessaire. Nous allons d'abord étudier les effets des fragments induits par l'irradiation aux rayons X. A l'avenir, si nécessaire, nous utiliserons également les fragments provoqués par l'activation oncogénique.

Le but de ce projet est de caractériser les effets des fragments cellulaires sur les tissus hépatiques et de mesurer l'effet des fragments sur la croissance tumorale. Il s'agira d'injections uniques ou répétées de fragments à un site spécifique du foie que nous caractériserons par des analyses histologiques et moléculaires des tissus à différents temps. De plus, nous injecterons des cellules de carcinome hépatique (Huh7) avec ou sans les fragments dans le foie. L'effet des fragments sur la croissance tumorale sera suivi de manière longitudinale par échographie. Cette approche nous aidera ainsi à réduire le nombre d'animaux nécessaires.

Nous prévoyons que les fragments auront un fort effet localisé dans les tissus et grâce à cela, nous ne nous attendons pas à des effets secondaires négatifs sur le bien-être de l'animal. Nous mesurerons la prolifération cellulaire, l'apoptose et la nécrose et nous évaluerons également l'activation des voies inflammatoires locales et l'infiltration des cellules immunitaires. À long terme, nous nous attendons à ce que les fragments affectent l'architecture des tissus et conduisent à la fibrose. De plus, nous prévoyons que les fragments accéléreront la croissance des cellules tumorales co-injectées et augmenteront potentiellement la probabilité de leurs métastases. Ces résultats seront d'une grande importance pour la compréhension d'un large éventail de maladies qui impliquent la sénescence cellulaire, comme l'athérosclérose, le diabète, le glaucome, la fibrose pulmonaire idiopathique, les maladies neurodégénératives et le cancer.

Remplacement : les effets directs des fragments ont été évalués au préalable in vitro, sur les cellules en culture. Cependant, pour comprendre complètement la fonction de ces fragments, nous devons étudier leurs effets sur les tissus d'un organisme vivant, composés de différents types de cellules, impossible de modéliser en culture.

Réduction : le suivi de la croissance tumorale après injection des fragments sera assuré par échographie, sur les mêmes animaux au cours du temps, réduisant ainsi l'effectif à utiliser. Un effectif de 8 souris par groupe sera utilisé pour évaluer l'effet de l'injection des fragments dans des souris immunocompétentes ou immunodéficientes. Un effectif de 12 souris par groupe sera utilisé dans les protocoles de co-injection avec des cellules tumorales. Ces effectifs, avec un total maximal de 360 souris au cours du projet, nous permettront d'obtenir des résultats statistiquement significatifs et robustes.

Raffinement : le suivi par échographie est une technique non-invasive, qui ne requiert pas de chirurgie. Elle est pratiquée sous anesthésie gazeuse (à l'isoflurane). Les souris sont maintenues sur une plate-forme chauffante et les yeux sont hydratés avec de l'ocrygel tout au long de l'expérience et jusqu'à leur réveil, en surveillant la fréquence cardiaque et la respiration. Lors des injections réalisées sous échographie, la bétadine sera appliquée sur la peau pour la désinfecter et ainsi éviter ou minimiser tout risque d'infection. Nous n'attendons pas d'effets indésirables majeurs dans ce projet. Néanmoins, les animaux seront surveillés tous les jours. Ils disposeront de conditions d'hébergement optimales, avec accès à l'eau, à la boisson et à un enrichissement du milieu. Ils seront maintenus en groupe afin de conserver les interactions sociales, importantes pour cette espèce. Les sites d'injection seront surveillés afin d'éviter toute infection, qui, si cela se produisait, serait traitée avec les conseils de notre vétérinaire.

18564 L'importance des communications entre le squelette et d'autres organes comme le cerveau, le rein ou les tissus adipeux en physiopathologie ne fait aujourd'hui aucun doute. Pour autant, les mécanismes d'interaction qui régissent ces interactions sont loin d'être complètement élucidés. Notre but est de mieux comprendre ces mécanismes en portant une attention particulière sur le rôle de la protéine Slc20a2/PiT2. PiT2 est un transporteur de phosphate (Pi) présent à la surface de la plupart des cellules de mammifères. Nos travaux montrent qu'elle joue un rôle important pour la qualité et la solidité osseuse sans pour autant agir directement sur les cellules minéralisantes du squelette. Nos résultats suggèrent que des défauts de communication entre le squelette et d'autres organes pourraient influencer sur l'intégrité du tissu squelettique.

Nous savons qu'il existe un lien étroit entre l'intégrité du tissu squelettique et celle du tissu adipeux présent dans la moelle osseuse (TAM, pour Tissu Adipeux Médullaire). On sait par exemple que l'ostéoporose est associée à une diminution du volume osseux et une augmentation du volume de TAM. Or, nous avons récemment identifié des anomalies de formation du TAM chez les jeunes souris invalidées totalement pour le gène Slc20a2 (Souris PiT2KO). Pour déterminer si PiT2 joue un rôle dans l'équilibre entre ces deux tissus, nous analyserons les effets de l'absence de PiT2 sur le TAM dans un modèle d'ostéoporose post-ménopausale. Ces analyses phénotypiques prennent en compte la règle des 3R et seront donc réalisées sur un nombre d'animaux par groupe correspondant au nombre minimal requis afin d'atteindre une significativité statistique (soit 12 animaux femelles adultes âgées de 12 semaines par groupe et 5 animaux pour adapter l'anesthésie et le geste chirurgical au modèle d'intérêt pour chaque procédure). Les animaux sont hébergés par 5, dans des cages enrichies, sur des portoirs ventilés. Ils seront anesthésiés (sous isoflurane pour la procédure 1 et par injection intra-péritonéale d'un mélange de Ketamine/Xylazine pour la procédure 2) et préalablement placés sur un tapis chauffant pour éviter les risques d'hypothermie. Une réhydratation post opératoire sera réalisée et une analgésie adéquate (injection de buprénorphine et metacam par voie sous-cutanée) sera réalisée pendant tout le temps du projet. Les animaux seront observés quotidiennement. Cinq semaines après l'ovariectomie, les animaux seront mis à mort par dislocation cervicale sous anesthésie. L'étude du phénotype des souris PiT2KO nécessitera 59 souris sur 3 ans. Cette étude vise à comprendre l'implication de la protéine PiT2 dans la physiopathologie du squelette et sa communication avec le tissu adipeux de la moelle. Il n'existe donc pas de méthode alternative à l'utilisation de l'animal pour ce projet.

18565 La leucémie aiguë myéloïde (LAM) est une forme de cancer qui touche les cellules de la moelle osseuse, qui produisent normalement les globules rouges, les plaquettes et les globules blancs. Dans la LAM, les cellules progénitrices d'une population de globules blancs prolifèrent de façon anarchique, sans « mûrir » (sans se différencier). L'accumulation de ces cellules « immatures » (cellules leucémiques) empêche la production normale de cellules sanguines, ce qui conduit notamment à une anémie (manque de globules rouges et baisse de l'hémoglobine) et une thrombocytopenie (baisse des plaquettes). En dépit de l'amélioration des connaissances sur les différentes mutations qui sont impliquées dans la genèse et la progression des LAM, l'arsenal thérapeutique dont dispose les cliniciens pour freiner le développement de cette pathologie reste encore à ce jour, limité à l'utilisation de molécules de chimiothérapie qui ne permettent pas d'éradiquer cette maladie. Ainsi, environ 60% des patients présentent des leucémies résistantes au traitement conventionnel ou rechutent après la première ligne de traitement. Il apparaît donc crucial d'identifier les mécanismes fonctionnels impliqués dans la résistance des cellules leucémiques aux chimiothérapies conventionnelles. Cette étude ne peut être menée qu'en utilisant les modèles de souris permettant de reproduire le développement de la LAM (prolifération anarchique des cellules leucémiques dans la moelle osseuse et dans la circulation sanguine) qui seront combinés à un crible massif par extinction de certains gènes et identification des acteurs fonctionnels clés qui sont responsables de la chimiorésistance. Au terme de notre projet, les résultats obtenus, entre autres avec l'utilisation de modèles de souris transplantées avec des cellules de patients atteints de LAM associées à des essais précliniques pour valider de nouvelles molécules thérapeutiques, devraient contribuer à l'amélioration des traitements proposés aux patients. Notre projet s'articule autour de 2 axes principaux :

Pour mener à bien notre projet, nous utiliserons plusieurs modèles de souris permettant de reproduire une LAM. Dans le premier objectif, nous utiliserons cinq modèles différents basés sur la modification de certains gènes qui sont fréquemment retrouvés dans la pathologie humaine pour identifier par extinction des gènes non mutés mais qui participent à la résistance à la chimiothérapie.

L'administration des cellules leucémiques se fera par voie intraveineuse (injection non douloureuse dans la veine de la queue de souris éveillée) à des souris mâles adultes de 8 semaines (afin de réduire la variabilité inter-expérience) qui auront été préalablement irradiées. L'étape d'irradiation est indispensable et permet de « faire de la place » dans la moelle osseuse afin que les cellules leucémiques puissent s'y développer. Durant les deux semaines qui suivent l'irradiation, les souris seront traitées avec des antibiotiques pour éviter qu'elles ne développent des infections. Les souris seront ensuite traitées avec des agents chimiothérapeutiques par voie intra-péritonéale en suivant des concentrations approuvées chez la souris (injection non douloureuse dans l'abdomen de la souris éveillée faite après confirmation de la prise de greffe par prise de sang). Nous suivrons le développement des cellules leucémiques et l'effet des traitements par des prélèvements de sang (prélèvement dans la veine de la joue, non douloureux sur souris éveillée) toutes les semaines : ces prélèvements semblables à des prises de sang, permettent de suivre l'avancée de la leucémie en fonction du taux de cellules leucémiques dans le sang. Dans certains cas, nous réaliserons également un suivi directement au niveau du site de prolifération, c'est-à-dire au niveau de la moelle osseuse, maximum 2 fois pour chaque animal. Ce type de prélèvement sera réalisé sous anesthésie générale et suivi d'un traitement analgésique.

Dans le deuxième objectif nous utiliserons des modèles de souris basés sur l'utilisation de cellules de patients atteints de LAM réfractaires à la chimiothérapie afin de tester de nouvelles molécules thérapeutiques ciblant les gènes identifiés dans l'objectif 1 et qui seront susceptibles d'améliorer les effets de la chimiothérapie en minimisant sa toxicité globale. Ces molécules seront administrées par voie intrapéritonéale (injection non douloureuse dans l'abdomen de la souris éveillée), par voie intra-veineuse ou par gavage en adaptant les concentrations et la fréquence déjà utilisées chez l'Homme. Au terme de notre projet, les résultats obtenus devraient contribuer à l'amélioration des traitements proposés aux patients.

Tout au long du projet, nous veillerons à appliquer la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner). L'usage des souris dans ce projet est essentiel car il n'existe actuellement aucun modèle *in vitro* (n'utilisant pas de modèle animal) pertinent pour l'étude des LAM. En effet, les rechutes post-chimiothérapie observées chez les patients impliquent de nombreuses interactions notamment l'environnement de la moelle osseuse et la cellule leucémique.

Nous nous attacherons à limiter au minimum le nombre de souris utilisées. Nous utiliserons 5 à 10 réplicats par condition, nombre nécessaire pour obtenir une puissance statistique suffisante permettant de conclure à partir des résultats obtenus. Nous ferons en sorte de regrouper au maximum les conditions à tester afin de réduire au minimum le nombre d'animaux. Dans un premier objectif d'identification des gènes possiblement impliqués dans la résistance à la chimiothérapie dans les cinq modèles de souris et leur validation individuelle, nous prévoyons d'utiliser 1260 souris. Dans un second objectif nous réaliserons une étude préclinique à l'aide de cellules de patients atteints de LAM afin de valider nos premiers résultats. Nous envisageons alors d'utiliser 1200 souris de plus permettant de mettre au point une nouvelle stratégie thérapeutique efficace. Au total, 2460 souris seront nécessaires sur les 5 ans que durera le projet.

Une attention toute particulière sera portée sur le bien-être des animaux par une surveillance journalière qui sera assurée par le personnel de l'animalerie, en complément à celle des expérimentateurs. Chaque semaine, une grille d'évaluation des signes cliniques sera renseignée (aspect des souris, comportement, blessures, poids) et les souris présentant une souffrance et/ou une douleur mise en évidence par une modification comportementale et/ou physique seront euthanasiées. Les souris seront placées dans des cages avec des enrichissements (rouleaux en carton, coton, buchettes de bois...) qui leur permettent d'exprimer leurs comportements naturels.

L'ensemble des animaux inclus dans ce projet sera euthanasié en fin de procédure (au plus tard 12 semaines après le début du protocole).

18566 Nous souhaitons étudier le rôle de deux protéines spécifiques dans la fonction cardiaque, et plus particulièrement dans le cadre d'une altération telle qu'une hypertension.

Ces protéines semblent liées notamment à certaines atteintes musculaires dystrophiques d'origine génétique.

Ce projet vise ainsi à comprendre comment la suppression de l'une ou de l'autre de ces protéines pourrait modifier les réponses du système cardiaque lors d'une hypertension.

Cette dernière sera mise en place par le biais d'une exposition prolongée à un mélange pharmacologique (l'angiotensine II + Phényléphrine) qui impacte le système cardiaque.

Ces travaux sont une étape nécessaire dans le développement de traitements potentiels de ce type de dystrophie ne disposant actuellement d'aucun traitement.

Le modèle Souris nous permet d'accéder à des animaux génétiquement modifiés, permettant d'étudier l'ensemble des fonctions d'une protéine au sein d'un organisme complet adulte.

Il s'agit d'une approche très utile pour déterminer la fonction d'une protéine dans un organisme vivant et ainsi orienter le développement de nouveaux médicaments.

Dans ce projet, nous prévoyons donc d'analyser des animaux génétiquement modifiés, ne disposant plus de l'une ou de l'autre des protéines.

Nous avons pu constater que ces animaux ne présentent aucun déficit majeur durant leur vie ni de phénotype dommageable.

Nous allons donc étudier pour chaque lignée quatre groupes d'animaux : un groupe d'animaux contrôles sans traitement, un groupe d'animaux mutés pour une protéine sans traitement, un groupe d'animaux contrôle recevant Angiotensine II et phényléphrine, et un groupe d'animaux mutés recevant aussi ce mélange hypertenseur.

Nous analyserons l'évolution de leur fonction cardiaque dans le temps à l'aide d'une mesure de la pression artérielle, de l'échographie et de l'électrocardiogramme. Les comparaisons entre les différents groupes expérimentaux permettront de mettre en évidence l'impact de la mutation de la protéine sur la réponse au traitement hypertenseur. Nous serons ainsi capables de comprendre si la fonction cardiaque est altérée par l'absence de protéine, et comment ce système évolue durant une hypertension.

Chaque groupe expérimental sera constitué de 8 (contrôle) à 12 (traités) animaux, cet effectif étant suffisant pour obtenir des résultats statistiquement interprétables dans les protocoles d'analyse prévus (suivi de la pression artérielle, échographie cardiaque et électrocardiogramme). De plus, ces animaux subiront un prélèvement sanguin en début et en fin de protocole pour mettre en évidence les effets de la mutation et du mélange hypertenseur sur les paramètres biochimiques.

Ces analyses représenteront donc 40 animaux par protéine analysée, soit 80 animaux au total

En plus de ces protocoles fonctionnels, des dosages sanguins seront effectués sur des lots d'animaux différents, étant donné que ces dosages ne sont pas réalisables sur les mêmes échantillons sanguins. 3 animaux contrôles et 3 animaux mutants seront nécessaires, uniquement recevant le mélange hypertenseur. Ils seront prélevés en début, milieu et fin de protocole mais ne suivront pas le protocole d'analyse fonctionnelle. Cela représente 6 animaux par protéine étudiée, soit 12 animaux au total.

Nous souhaitons donc employer un total de 92 souris pour ce protocole, comparant des animaux exprimant ou non un récepteur d'intérêt, dans des conditions physiologiques ou avec une hypertension (4 conditions au total pour chaque protéine étudiée).

REPLACEMENT : nous ne disposons pas d'une autre possibilité d'étudier la fonction d'une protéine dans un organisme vivant et dans le cadre d'atteintes de la fonction cardiaque, le modèle Souris constitue la meilleure approche disponible à ce jour pour cela.

RAFFINEMENT : l'ensemble des procédures expérimentales implique un soin et une surveillance constants des animaux, afin de s'assurer que le protocole pharmacologique n'entraîne pas de souffrance chez les souris. Des points limites spécifiques à chaque procédure expérimentale sont décrits, et suivis avec la structure du bien-être animal de notre institut. Ainsi, le suivi post-

implantatoire des pompes osmotiques délivrant l'angiotensine II comprendra une surveillance de l'incision, du poids de l'animal, de son état général. Un tapis chauffant permettra aux animaux de maintenir leur température corporelle durant l'anesthésie. Du gel ophtalmique sera appliqué pour éviter le dessèchement de la cornée. Par ailleurs, la douleur sera prise en charge au moment de l'incision puis dans les jours qui suivent.

REDUCTION : des analyses de puissance ont permis de définir les effectifs utilisés dans ce projet, afin d'obtenir des conclusions scientifiquement exploitables pour les procédures expérimentales retenues. Par ailleurs, nous avons déjà utilisé cette approche avec d'autres lignées génétiquement modifiées et avons pu constater que ces effectifs étaient nécessaires et suffisants pour conclure sur les résultats observés.

18567 L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre du développement d'un composé d'intérêt thérapeutique, destinés à l'amélioration des troubles métaboliques, notamment l'obésité. L'objectif de la présente étude sera d'évaluer l'impact de ce composé sur la prise alimentaire, le poids corporel, les dépenses énergétiques, la composition corporelle et la régulation glycémique chez des souris préalablement rendues en surpoids par un régime hyperlipidique (60% de l'énergie issue des graisses) pendant 6 semaines. Le traitement sera administré par voie orale pendant les 14 derniers jours de régime.

Au cours du traitement, les paramètres suivants seront mesurés: poids corporel et prise alimentaire, composition corporelle, activité locomotrice, dépenses énergétiques et tolérance au glucose.

La présente étude nécessitera l'emploi de 50 souris C57Bl/6 réparties en 5 groupes expérimentaux de 10 animaux (Groupe contrôle négatif traité au véhicule, Groupe contrôle positif traité avec un composé de référence et groupe traités avec le composé testé à 3 doses).

La règle des 3Rs a été prise en compte dans l'élaboration du présent protocole:

- Raffinement: Le modèle animal qui sera utilisé est un modèle parfaitement caractérisé dans la littérature et couramment utilisé dans les études précliniques cherchant à mettre en évidence les effets bénéfiques de composés sur la prise alimentaire, le poids corporel et les troubles métaboliques. Le protocole a été planifié de façon à limiter au maximum tout stress et tout inconfort pour les animaux. Les animaux seront hébergés en cages individuelles du fait de la nécessité de mesurer précisément l'impact du composé sur la prise alimentaire individuelle des animaux. Néanmoins, les animaux conserveront des contacts visuels avec leurs congénères et un enrichissement des cages sera assuré par l'ajout d'igloos, de matériels de nidification et de briquettes en bois spécialement conçues pour le rongeur). Enfin, un suivi journalier des animaux à l'aide d'une grille de score permettra une action rapide en cas d'atteinte des points limites établis. Ces actions incluent une surveillance renforcée et l'emploi d'analgésiques.

- Réduction: Le nombre d'animaux utilisés a été rationalisé à partir de l'expérience acquise par notre laboratoire sur l'analyse des paramètres d'intérêt. Ainsi, le nombre d'animaux par groupe a été adapté en fonction des paramètres d'intérêt de façon à être en mesure de mettre en évidence une différence statistiquement significative sur les paramètres étudiés.

- Remplacement: L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe aucune méthode de substitution n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude de l'impact d'un composé sur le poids corporel, la prise alimentaire et les autres paramètres altérés dans le cadre des troubles métaboliques.

18568 La sclérose en plaque (SEP) et le syndrome de Guillain barré (GBS) sont deux maladies auto-immunes assez rares touchant respectivement le système nerveux central et le système nerveux périphérique. Dans les deux cas, les cellules immunitaires s'attaquent à la couche de protection des cellules nerveuses ce qui induit de fortes lésions nerveuses avec des séquelles parfois irréversibles. Faiblesse et fatigabilité musculaire, troubles cognitifs, de la motricité, de la vision, de la sensibilité et parfois décès font partie du diagnostic clinique. En France, la sclérose en plaque touche chaque année environ 60 000 personnes et le syndrome de Guillain barré environ 8000.

Les causes de ces maladies ne sont pas toujours bien identifiées. Les traitements ont un coût élevé, une efficacité limitée et font appel à des « bio-médicaments » sur du court terme (GBS) ou du long terme (SEP). Il est donc important de continuer les recherches afin de mieux en comprendre les mécanismes et de proposer de nouvelles pistes thérapeutiques pour améliorer le pronostic et la qualité de vie des patients.

Ce projet a pour but d'identifier des voies de signalisation (gènes, cellules, médiateurs...) qui participent au développement de ces pathologies. Nous nous intéressons en particulier au rôle des senseurs de l'immunité innée et des voies de signalisations qu'ils engagent (cellules affectées, médiateurs produits...).

Pour cela nous utiliserons d'une part des modèles souris fréquemment cités dans la littérature pour mimer ces pathologies. Le modèle EAE (Experimental auto-immune encephalomyelitis ou Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale) pour la SEP et le modèle EAN (Experimental auto-immune neuritis ou Neurite Auto-immune Expérimentale) pour GBS. L'auto-immunité est induite chez la souris par injection sous-cutanée d'un cocktail immunogénique (immunisation) conduisant à des symptômes neuroinflammatoires et cliniques similaires à ceux de l'homme (troubles cognitifs, trouble de la motricité etc).

Ces modèles se caractérisent par l'apparition, une semaine après l'immunisation, d'une perte de tonus musculaire qui commence par la queue et qui se prolonge les jours suivants par une paralysie progressive des pattes arrières. Une fois ce pic inflammatoire passé, les animaux retrouvent progressivement leur mobilité au bout de quelques semaines. Une deuxième approche pour initier ces modèles sera d'utiliser les cellules immunitaires des souris malades EAE ou EAN pour déclencher la même maladie chez des souris saines hôtes. Ce « transfert adoptif » d'une souris malade à une souris saine de lymphocytes T « éduqués » permet de déclencher le modèle adéquate sans avoir besoin de les immuniser et permet d'adresser des questions sur le rôle de certaines de ces populations cellulaires.

Les avantages de ces modèles EAE et EAN sont nombreux, notamment la rapidité d'apparition des symptômes, la robustesse des lésions, la facilité d'établir le score clinique, la reproductibilité du modèle et l'accès à un grand nombre de lignées transgéniques.

D'autre part nous disposons de souris KnockOut (KO), dont un gène a été rendu non fonctionnel pour examiner précisément son rôle dans l'établissement et la sévérité de la maladie. En comparant le résultat obtenu par rapport à des souris contrôles non mutées, il est possible de dire si ce gène intervient dans la maladie. Si la maladie est plus forte dans le KO, le gène contrôlait l'inflammation. Si au contraire la maladie est moins forte, le gène participait à l'exacerbation de l'inflammation. Si la réponse est identique chez le groupe témoin et KO, alors le gène n'intervient pas dans la réponse. Les gènes, ou plus exactement les produits de ces gènes, deviennent alors potentiellement des cibles pharmacologiques. Une administration de composés (« biomédicaments » ou molécules interférant avec les voies de signalisations étudiée) sera également réalisée dans le but de développer de nouvelles pistes thérapeutiques.

Ce type d'expérience nécessite un nombre important d'animaux mais permet de faire avancer nos connaissances sur les maladies de manière très significative, avec un objectif de traitement pour les patients. Ce projet s'inscrit dans une collaboration avec un service hospitalier en neurologie.

Positionnement du projet et règle des 3R :

A ce jour, l'animal de laboratoire reste le seul moyen permettant d'étudier les mécanismes d'inflammation et de régulation à l'échelle de l'organisme. Ce projet sera réalisé en respectant la règle des 3R:

Remplacement : le modèle animal est fondamental afin d'étudier l'inflammation et la pathologie nerveuse (destruction des gaines de myéline, paralysies) au niveau de l'organisme entier. Plusieurs niveaux de complexité sont nécessaires, impliquant des interactions entre différents types cellulaires et organes, qui ne peuvent être développés in vitro ou in silico.

Raffinement : Une surveillance quotidienne des animaux est réalisée. Elle consiste en l'observation de l'aspect général de l'animal, de son comportement et de sa mobilité (en dehors du pic de la

maladie) et une grille de score clinique est renseignée. Si des animaux présentent des signes de souffrance, ils seront mis à mort.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement pertinents et reproductibles. Chaque expérience comprend un maximum de 60 souris.

Uniquement les expériences pertinentes seront répétées avec des animaux de groupes équivalents. Nous utiliserons un maximum de 2860 animaux.

18569 **OBJECTIFS ET BENEFICES** : Les circuits neuronaux impliquant des interactions mutuelles entre le cortex cérébral et les noyaux gris centraux, dont le thalamus, jouent un rôle majeur dans la cognition et le comportement. Ils sont affectés dans de nombreuses maladies neurologiques et psychiatriques. Notre recherche sur des modèles animaux est dédiée à la compréhension des mécanismes physiopathologiques, cellulaires et synaptiques, de troubles cognitifs similaires à ceux observés chez des patients atteints de maladies psychiatriques comme la schizophrénie. Notre but ultime est de développer, chez le rat, une preuve de concept thérapeutique utilisant la modulation électrique non-invasive de circuits neuronaux en vue de corriger de tels troubles. Les résultats apporteront des éléments essentiels pour le développement thérapeutique sur d'autres types de modèles animaux et offre de réelles perspectives d'applications cliniques.

PROCEDURES : Les animaux sont placés sous narco-analgésie pour des enregistrements intracérébraux combinés avec une neuromodulation électrique transcrânienne dans des conditions physiopathologiques. La procédure étant sans réveil, les rats sont mis à mort alors qu'ils sont toujours sous narcose.

DOMMAGES PREVISIBLES : C'est une préparation sans gêne, sans douleur et sans réveil.

APPLICATION DES 3 R :

Remplacement : Les explorations électrophysiologiques intracérébrales ne sont pas remplaçables ni par des approches in vitro qui utilisent des systèmes neuronaux déafférentés, ni par des approches théoriques et mathématiques qui restent insuffisantes pour tester l'impact de la neuromodulation électrique sur des variables neurophysiologiques, cognitives et comportementales.

Réduction : Au fil du temps, nous avons optimisé nos approches expérimentales nous permettant d'augmenter leur taux de succès (>80%) et donc de réduire significativement le nombre d'animaux requis pour nos études. Nous n'utilisons que le nombre d'animaux nécessaires à la validation des résultats scientifiques. De plus, nos approches multi-échelles (globales et cellulaires) et multisites (enregistrements simultanés corticaux et sous-corticaux) permettent de collecter une giga-quantité de données et offrent des éléments de réponses à plusieurs questions à la fois, nous permettant de réduire considérablement le nombre d'animaux.

Raffinement : Toutes les précautions sont prises pour respecter l'animal (bien-être physique et psychologique) : maintien en groupes sociaux, cages enrichies avec barreaux à ronger et tunnels, actes invasifs réalisés sous narcose combinée avec des analgésie générale et locales, maintien automatisé de la température corporelle, suivi électro-cardiologique et -encéphalographique de la qualité de la narco-analgésie. Et des points limites ont été établis, nous permettant de soustraire l'animal à toute souffrance potentielle. Un « handling » de quelques minutes par jour est pratiqué 2 à 3 jours avant le jour de l'expérience pour habituer les animaux au manipulateur. Aussi, nous ne pratiquons pas de sédation ni de narcose chez des animaux hyper-stressés (comportement très agité, peur manifeste, vocalisations...).

Un nombre maximal de 152 rats est prévu pour ce projet.

18570 L'objet de la demande d'autorisation de projet est de produire des souris déficientes pour gène dans les neurones GABAergiques, entraînant un phénotype dommageable (épilepsie spontanée ou induite par une stimulation externe).

Une perturbation de la balance entre excitation (neurones glutamatergiques) et inhibition (neurones GABAergiques) dans le cerveau est à l'origine de maladies neuro-développementales associées à un retard mental, mais aussi à l'apparition de maladies neurologiques telles que la schizophrénie et l'épilepsie. Le gène étudié est impliqué dans la neurogenèse ainsi que dans la régulation de la balance entre excitation et inhibition. La mutation de ce gène chez l'homme entraîne un syndrome de retard mental associé à une diminution de la taille du cerveau, de l'épilepsie, des comportements autistiques et un déficit moteur.

Nous avons trouvé que l'inactivation d'une copie de ce gène dans les neurones GABAergiques entraîne de l'épilepsie chez ces souris. De plus, nous avons trouvé qu'une inactivation des deux copies de ce gène perturbait le développement du striatum, structure neuronale impliquée dans le contrôle moteur, entraînant la mort des souriceaux à la naissance.

Nous voulons étudier l'origine de la perte de striatum chez les embryons, et, pour cela, nous avons besoin de produire des mâles géniteurs avec une copie en moins de ce gène dans les neurones GABAergiques. Ces mâles présentent des épilepsies spontanées et font l'objet de la PE présentée ici dans le cadre de la production d'animaux avec phénotype dommageable.

Remplacement : le modèle animal est le seul qui nous permet d'étudier dans son ensemble les effets du gène d'intérêt sur les fonctions vitales ainsi que le développement moteur de l'animal. De plus, les anomalies à observer nécessitent un modèle vivant suffisamment proche de l'homme pour avoir des tests qui peuvent être transposés à celui-ci. Le modèle souris est donc la meilleure option ici.

Réduction : pour cette étude, seuls les mâles avec phénotype dommageable seront utilisés pour accoupler avec des femelles qui ne présentent pas de phénotype dommageable. Ceci permet de limiter la production d'animaux au phénotype dommageable, les mâles pouvant être utilisés plusieurs fois pour la production des embryons. Nous produirons un maximum de 240 mâles sur 5 ans.

Raffinement : pour éviter la souffrance des animaux, les souris présentant des convulsions durant plus de 3 minutes lors d'une manipulation (temps au-delà duquel les convulsions peuvent entraîner des dommages sur le cerveau) seront euthanasiées.

18571 La leptospirose est une zoonose ré-émergente causée par des bactéries du genre *Leptospira*. Ces bactéries sont transmises, notamment par les rongeurs qui les hébergent dans leurs reins, sans symptômes, et les excrètent via leurs urines dans l'environnement. Les leptospires infectent l'Homme en pénétrant la peau et les muqueuses et occasionnent une infection qui se manifeste diversement, allant de symptômes pseudo-grippaux à des formes sévères, le plus souvent fatales. Il n'existe pas de vaccin universel, capable de conférer une protection durable et croisée pour les 400 types de leptospires identifiés. Les antibiotiques ne sont efficaces que si administrés en début de l'infection, sinon le risque de chronicité rénale est majeur. La meilleure stratégie pour éradiquer l'infection consiste à empêcher les leptospires d'atteindre les reins de l'hôte et/ou d'y persister.

Basé sur l'utilisation d'un modèle murin de leptospirose, reproduisant la maladie humaine ou la leptospirose rénale chronique, les objectifs de ce projet sont d'évaluer différentes stratégies de lutte contre l'infection et visant à optimiser la réponse immunitaire de l'hôte face au pathogène. L'évolution du cours de l'infection expérimentale est suivie notamment par une technique d'imagerie non invasive et indolore, réalisée de façon séquentielle sur les animaux vivants et anesthésiés ; nous pouvons ainsi évaluer et suivre en temps réel, l'impact des différents moyens thérapeutiques testés, tant sur la phase précoce que sur la colonisation rénale. Ensuite les mécanismes cellulaires impliqués dans une lutte efficace contre l'infection seront caractérisés. Des moyens, tant prophylactiques que curatifs seront testés, ciblant chacun une phase déterminée de la maladie. Les bénéfices attendus sont de déterminer différentes approches thérapeutiques efficaces contre l'infection quel que soit son stade d'évolution chez l'hôte.

Ce projet nécessite un total de 4452 souris, indifféremment femelles ou mâles, âgés de 6 semaines ou plus au moment de l'infection. Conçu pour une durée de 5 ans, il comporte 5 procédures, classées de sévérité modérée, car nous utiliserons le plus souvent une dose infectieuse résultant

en une infection asymptomatique, non douloureuse. En cas d'infection expérimentale susceptible de provoquer une infection disséminée, un suivi quotidien des animaux et le degré de lumière mesurée chez chaque souris renseigneront une grille graduée des signes cliniques observés, spécifiques de la leptospirose et permettront de définir un score échelonné de sévérité. Grâce à notre expérience du modèle, des points limites fiables ont été établis, à partir desquels l'animal est mis à mort pour éviter toute souffrance inutile.

Au terme de chaque expérience, les souris seront mises à mort selon les règles établies et leurs organes prélevés pour rationaliser au mieux chaque individu.

Ce projet est défini dans le respect des 3 valences de la démarche 3R. Remplacement : Les relations hôte -pathogène sont investiguées, au maximum possible, grâce à des expériences in vitro. Cependant, ces dernières n'intègrent ni dans leur totalité, ni dans leur complexité les mécanismes qui régissent la relation hôte-pathogène. Réduction : L'imagerie in vivo sur petit animal permet de réduire considérablement le nombre de souris utilisées. Seules les expériences donnant des résultats encourageants seront répétées ; le minimum d'animaux nécessaire à l'obtention de données statistiquement robustes sera utilisé. Ce nombre a été défini d'après notre expérience, et avec l'aide d'un biostatisticien. Des tests statistiques de type Mann-Whitney et ANOVA, seront appliqués pour déterminer la significativité des données. Raffinement : Répartis généralement par groupes de 5 souris, la plupart du temps jamais séparés au cours de la procédure et manipulés par le même expérimentateur, les animaux sont hébergés et manipulés selon les règles et protocoles établis, avec un suivi strictement défini et régulier. Tout changement physique ou comportemental fera l'objet d'une attention et d'une décision rapide (en particulier, mise en place des actions définies a priori lors d'atteinte des points limites).

18572 Partie I

Les atlas haute résolution du cerveau actuellement disponibles, basés sur la microscopie optique à partir de coupes histologiques, et ceux à venir, basés sur la tomographie à rayons X, dépendent généralement de tissus inclus en paraffine.

La quantification détaillée des changements morphologiques entre l'état in vivo et l'état post-mortem est une condition préalable à l'élaboration d'un atlas cérébral physiologiquement pertinent.

Des études d'imagerie par résonance magnétique (IRM) du cerveau humain post-mortem ont montré que l'imagerie 3D combinée à un enregistrement non rigide permet d'obtenir des déformations tissulaires locales induites par le formol bien au-delà de 10 %. Nous ne sommes pas en mesure de mesurer les changements morphologiques du cerveau humain au cours des processus qui accompagnent la mort. Pour obtenir une carte correcte du cerveau, nous devons cependant corriger les données post-mortem du cerveau humain. Dans ce cas, la souris est le meilleur modèle en raison de sa petite taille, de sa faible épaisseur osseuse et de son utilisation répandue dans la recherche biomédicale. Des outils informatiques seront appliqués à une série d'ensembles de données de tomographie à rayons X du cerveau murin avec une résolution micrométrique, enregistrés depuis l'animal vivant et mort jusqu'à l'organe extrait, fixé et inclus en paraffine. Notre objectif est de fournir des données structurelles de l'anatomie cérébrale excédant nettement l'état de l'art, et par conséquent de donner les moyens d'accroître la qualité et l'acceptation des modèles informatiques.

Partie II

Dans les maladies auto-immunes telles que la sclérose en plaques (SEP), l'entrée des cellules immunitaires dans le système nerveux central (SNC) peut se faire par le liquide céphalo-rachidien (LCR). Cependant, on ne sait pas comment les cellules immunitaires sont distribuées dans le LCR hautement dynamique. Cette partie du projet vise à acquérir une tomographie informatisée in vivo des espaces de LCR de la souris sous déclenchement cardiaque avec une résolution micrométrique. Ceci est fondamentalement nécessaire pour effectuer les calculs in silico de la dynamique du LCR afin de déterminer la distribution des cellules T dans le SNC dans les maladies auto-immunes. Les facteurs de correction rassemblés dans la partie I permettent d'intégrer au

modèle des données supplémentaires essentielles, qui ne sont disponibles qu'à partir d'expériences post-mortem.

Distribution des animaux

Dans ce projet en deux parties, 102 souris saines d'une souche de type sauvage seront utilisées pour déterminer l'anatomie exacte du cerveau et des espaces liquidiens environnants. Dans la première partie du projet, 28 animaux seront examinés sous anesthésie profonde afin de déterminer quantitativement les changements physiologiques qui se produisent dans le cerveau et les espaces liquidiens qui l'entourent lors de la mort en utilisant une source de rayons X.

Dans la seconde partie du projet, 74 animaux seront utilisés pour déterminer la structure exacte des espaces liquidiens du LCR entourant le cerveau, y compris les espaces ventriculaires et sous-arachnoïdiens du cerveau et de la moelle épinière. À cette fin, ces animaux recevront un seul agent de contraste approprié et des images des microstructures des espaces liquidiens entourant le cerveau et la moelle épinière seront prises pendant que les animaux seront anesthésiés.

Notre projet a donc été évalué comme répondant aux exigences du principe des 3R (Remplacer, Réduire et Raffiner) :

Remplacer : L'objectif de la recherche ne peut pas être atteint en utilisant des méthodes alternatives (non animales) telles que la simulation cellulaire ou *in silico*, car les données obtenues sont nécessaires pour construire la base représentative des calculs *in silico*. Comme l'étude vise à étudier les structures anatomiques et les processus physiologiques qui se produisent dans les organismes des mammifères, l'utilisation d'une espèce inférieure sur le plan phylogénétique ne serait pas appropriée ou ne servirait pas pour l'objectif de l'étude.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisés a été déterminé statistiquement afin d'obtenir des résultats significatifs et de réduire ainsi au minimum le nombre total d'animaux sacrifiés.

Raffiner : La santé des animaux sera surveillée pendant toute la durée de l'expérience. Cela permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée au moindre signe de souffrance. Afin de réduire la douleur, la souffrance et l'anxiété, toutes les expériences seront réalisées sous anesthésie profonde. Les animaux ne doivent donc pas ressentir de stress, d'anxiété ou de douleur pendant les procédures. Toutes les expériences sont conçues comme des procédures sans réveil. Les animaux seront hébergés en groupe et les conditions d'hébergement standard ne seront pas modifiées. Les animaux recevront du matériel de nidification leur permettant de construire un nid isolé sur le plan thermique ainsi qu'une cabane. Ils seront manipulés à l'aide d'un tunnel ou en à main. La nourriture et l'eau seront fournies à volonté. Dans une expérience préliminaire, nous avons utilisé des souris mortes, en veillant à ce que la charge cumulée de chaque animal soit réduite au strict minimum. L'expérience préliminaire n'a pas nécessité d'autorisation proprement dite.

Nous mettrons les ensembles de données à la disposition du public pour permettre aux chercheurs intéressés de les appliquer à de futures initiatives liées au cerveau. Les résultats envisagés faciliteront l'application à l'humain des connaissances acquises à partir de modèles de souris sur les troubles du SNC. En utilisant la modalité la plus appropriée pour l'imagerie à haute résolution de tout le système organique, en garantissant des conditions physiologiques *in vivo* et en recourant à une analyse 3D à grande échelle, nous fournirons le meilleur ensemble de données de référence possible sur l'anatomie du cerveau et les espaces liquidiens du SNC. Comme ces données seront accessibles au public sous forme brute et traitée, les chercheurs seront peu enclins à effectuer leur propre imagerie. Le projet permettra non seulement de réduire l'expérimentation animale, mais aussi d'améliorer la qualité scientifique de la recherche sur les troubles liés aux fluides du SNC. Les modèles informatiques sont devenus des outils alternatifs importants, leur valeur scientifique dépend de la qualité des données de référence utilisées pour les élaborer. Notre objectif est de fournir des données structurelles des espaces liquidiens du SNC excédant nettement l'état de l'art, et par conséquent de donner les moyens d'accroître la qualité et l'acceptation des modèles informatiques.

18573 Les canaux ioniques et les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) sont des protéines membranaires essentielles à la communication de nos cellules. Ces protéines sont impliquées dans

de nombreuses pathologies telles que le diabète de type 2, l'épilepsie, les maladies cardiovasculaires, les désordres comportementaux. Elles sont également une cible majeure de médicaments agissant par exemple sur la douleur, le travail prématuré à l'accouchement, le rythme cardiaque. Les canaux ioniques génèrent de très petits courants électriques que nous savons mesurer. Ces mesures nous permettent de mieux comprendre leur fonctionnement et leur dysfonctionnement, et ainsi, mieux caractériser des pathologies et de trouver des solutions médicales rationnelles. Nous utilisons également le signal généré par les canaux ioniques pour étudier les RCPGs qui ont la capacité d'activer certains de ces canaux. En parallèle, nous nous intéressons au développement d'applications biotechnologiques en associant RCPG et canaux ioniques afin de créer des biocapteurs innovants pour des applications notamment dans le diagnostic *in vitro*, le criblage primaire de candidats médicaments et la détection de perturbateurs endocriniens. L'ensemble de ces projets est basé sur des mesures de faibles courants de part et d'autre de membranes, grâce à des techniques dites "électrophysiologiques" réalisées sur des "œufs" (ovocytes) de Xénopes (*Xenopus laevis*), gros batraciens sud-africains. Ces ovocytes sont des usines naturelles et très efficaces de production de protéines. Ces cellules représentent un modèle d'étude unique de par leur taille gigantesque pour des cellules (~1mm de diamètre, 100 000 fois plus de cytoplasme qu'une cellule humaine), ce qui permet de les manipuler individuellement et de leur faire produire plusieurs protéines simultanément par micro-injection d'ARNm (copie de gène codant pour les protéines). Le prélèvement d'ovocyte est par conséquent une première étape qui servira à de nombreux projets tel que le développement de systèmes de diagnostic *in vitro* rapides, non invasifs et miniaturisés, la recherche de répulsifs contre le moustique tigre ou encore la caractérisation de perturbateurs endocriniens.

Pour que nos mesures puissent être réalisées, une même cellule doit souvent exprimer, de façon efficace, plusieurs protéines. Or l'efficacité de transfection de plusieurs ADN et donc la production des protéines qui en découle dans les cellules de mammifères en culture habituellement utilisées pour étudier les protéines membranaires est trop faible pour pouvoir utiliser notre méthode de mesure. De même, nous ne disposons pas à ce jour de modèle moléculaire fiable des protéines sur lesquelles nous travaillons pour envisager d'utiliser la modélisation par ordinateur. En conséquence, il n'existe pas de solution de remplacement des ovocytes de Xénopes, essentiels pour l'ensemble de nos études et développements technologiques à fort enjeux en santé.

Sur le plan technique, des ovocytes de Xénope seront prélevés par opération chirurgicale standard (laparotomie) de quelques minutes et maîtrisée depuis plus de 20 ans. L'opération se déroule sous anesthésie générale. L'anesthésie est réalisée sans douleur par immersion dans un anesthésiant passant par la peau et couramment utilisé sur les animaux aquatiques. L'opération consiste en une petite incision à la base de l'abdomen qui est ensuite suturée avant un réveil dans une position permettant à l'animal de respirer en surface sans effort si besoin. L'état de santé des animaux est surveillé pour intervenir dès le moindre signe de souffrance. Des critères d'arrêt sont prévus afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus.

Les animaux sont nés et élevés à des fins scientifiques dans des établissements agréés. Le nombre d'animaux a été réduit à un minimum nécessaire pour permettre une exploitation statistique des résultats et atteindre les objectifs de l'étude. Un total de 60 animaux sera utilisé sur 5 ans soit environ 12 par an. Ce nombre permet à chaque animal de disposer d'un temps de récupération de plusieurs mois après l'opération. Pour améliorer le bien-être des animaux, les conditions d'hébergement sont enrichies de zones d'ombre et de tubes permettant aux animaux de se cacher et de s'isoler selon leur volonté.

18574 Le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA), est une pathologie qui affecte environ 100.000 personnes en Europe chaque année. A titre d'exemple, le syndrome respiratoire aiguë sévère due au coronavirus-19 (SARS-Cov-2) provoque un SDRA chez certains patients. Cette pathologie est caractérisée par une insuffisance respiratoire aiguë nécessitant une ventilation mécanique, en réanimation. Or, la ventilation mécanique aggrave la lésion pulmonaire sous-jacente et contribue à la mortalité élevée des patients atteints de ce syndrome, une complication appelée Ventilator Induced Lung Injury (Lésion provoquée par le ventilateur ; VILI). Il est généralement admis que le

VILI est dû aux contraintes mécaniques importantes que subit le tissu pulmonaire sous ventilation mécanique. Les études cliniques ont montré que la réduction du volume d'air administré au patient à chaque respiration, ou volume courant (VT) diminue le risque de VILI. Les protocoles de ventilation dites « protectrices » sont basés sur une réduction du VT tout en maintenant une ventilation suffisante. Un des modes ventilatoires proposés pour les patients atteints d'SDRA, la ventilation oscillatoire à haute fréquence (HFOV) consiste à utiliser de très faibles VT avec une fréquence respiratoire élevée, afin d'assurer l'apport d'oxygène et l'évacuation du CO₂. La réduction du VT dans ce mode ventilatoire permet en théorie de diminuer le stress mécanique que subit le tissu pulmonaire. Cependant, ce mode ventilatoire n'a pas diminué la mortalité due au VILI chez les patients atteints de SDRA. Nous proposons d'étudier un nouveau mode ventilatoire : "wide-frequency oscillatory ventilation" (WFOV). Ce mode ventilatoire combine une ventilation à faible VT avec des oscillations surimposées à plusieurs fréquences en même temps. Il permet d'améliorer les échanges gazeux ainsi que les propriétés mécaniques du poumon, d'après nos données préliminaires. Cependant les effets de ce mode ventilatoire sur le transport de gaz dans les alvéoles pulmonaires ne sont pas connus. L'intérêt scientifique de ce projet est de mieux comprendre comment les modes de ventilation mécanique, notamment oscillatoires, affectent la ventilation et la perfusion pulmonaires, dans un modèle expérimental de SDRA que nous avons mis au point chez le lapin. Afin d'explorer les effets de la ventilation mécanique dans ce modèle expérimental, nous allons appliquer une technique d'imagerie qui utilise des rayons X produits par un accélérateur de particules, et qui permet une mesure quantitative de la ventilation et la perfusion sanguine dans le poumon. Le but du présent projet est d'étudier et comparer différents modes de ventilation mécanique en ce qui concerne leurs effets sur la fonction pulmonaire régionale chez 40 lapins anesthésiés et sous ventilation mécanique, et de trouver les réglages de ventilation mécanique qui permettent d'améliorer le rapport entre la ventilation et la perfusion dans cette maladie, tout en réduisant le stress mécanique imposé au tissu pulmonaire au minimum. Les connaissances issues de cette expérience ont une importance pour le patient car elles permettront de mieux régler la ventilation mécanique des patients en anesthésie générale ou en réanimation.

Le choix du modèle animalier est basé sur le fait que le lapin est un des modèles de référence en pathologie respiratoire et notre groupe de recherche maîtrise la physiopathologie respiratoire du lapin. Par conséquent, les expériences précédentes et les nombreuses publications dans la littérature utilisant ce modèle expérimental peuvent servir de référence. Par ailleurs, les dimensions thoraciques du lapin sont parfaitement adaptées à la technique d'imagerie utilisée dans cette étude et la question de recherche pourra être adressée avec fiabilité et consistance.

Cette demande est conforme à la réglementation sur la protection des animaux et les 3R pour les raisons suivantes :

- Chaque animal servant de son propre contrôle, ce qui permet de diminuer le nombre d'animaux pour répondre à la question de recherche (Réduction).
- Le but de cette expérience est de valider un mode ventilatoire qui ne peut pas être effectué directement ou remplacer un modèle in vivo car il faut pouvoir objectiver au niveau structurel l'amélioration de la fonction pulmonaire et surtout les échanges gazeux (Remplacement)

Toutes les mesures seront prises afin de réduire la souffrance, la douleur et l'angoisse des animaux, notamment en maintenant des conditions de stabulation (température, lumière, densité de population, alimentation) optimales ; en instaurant une sédation avant l'induction de l'anesthésie générale ainsi qu'une antalgie efficace (Affinage). Tous les animaux seront euthanasiés par surdose d'anesthésique à la fin de l'expérience.

Par ailleurs, le milieu des animaux sera enrichi par la présence d'une boîte où les lapins se cachent et aussi de 'bunny blocks', friandises à ronger au goût de fruit

18575 La restauration de la continuité écologique est une condition indispensable à l'atteinte d'un bon état écologique des cours d'eau. Cet objectif passe par l'aménagement des obstacles à l'écoulement (seuils, barrages...). Cette pratique de restauration est parfois très coûteuse et les gestionnaires doivent hiérarchiser leurs actions. Pour mieux orienter ces choix vers celles qui seraient les plus

efficaces, un outil de diagnostic, fiable et opérationnel, permettant une hiérarchisation objective est nécessaire.

Le protocole ICE (Informations sur la Continuité Ecologique), permet un diagnostic de franchissabilité piscicole d'un obstacle mais il reste théorique. D'autres méthodes plus directes, comme la télémétrie des poissons, impliquent la mobilisation de moyens humains et financiers conséquents, et parfois, l'usage important d'animaux. Les méthodes de suivi indirectes, basées sur l'outil génétique, pourraient être une alternative pertinente pour quantifier la connectivité fonctionnelle en rivière. Cette méthodologie est basée sur la différenciation génétique entre deux populations séparées par un obstacle. Cette dernière est d'autant plus élevée que les échanges d'individus entre amont et aval, et leur reproduction, sont faibles. Cet outil prometteur nécessite encore des développements pour être pleinement opérationnel. Il est notamment indispensable de le tester sur de nombreux ouvrages présentant des degrés de perméabilité différents, ce qui représente l'objectif de ce projet.

Pour pouvoir étudier la différenciation génétique des poissons entre l'amont et l'aval d'un obstacle, l'usage d'animaux est incontournable (R-remplacement) mais l'atteinte physique aux animaux est très faible. Les échantillons génétiques seront effectués sur 18 sites de prélèvements qui permettront d'étudier au moins 6 obstacles différents. Sur chaque site de prélèvements, 2 espèces, parmi chevaie, goujon, vairon, loche, vandoise ou spirin seront ciblées. 24 individus (adultes ou sub-adultes), échantillonnés par espèce sur chaque site de prélèvements, est un minimum nécessaire, résultant des études précédentes (R-réduction), pour pouvoir effectuer le traitement des analyses génétiques. Au total 864 d'individus seront manipulés (18 sites * 2 espèces * 24 individus). Les poissons seront pêchés à l'électricité (technique la plus efficace réduisant le risque des dommages sur les individus). Les espèces non concernées par l'étude seront relâchées immédiatement et les espèces envahissantes détruites selon les indications de l'arrêté préfectoral. Les habitats les plus propices aux espèces ciblées seront prospectés afin de limiter la perturbation du milieu. La stabulation post-pêche se fera dans des bacs couverts perforés positionnés en rivière ou bacs de grand volume avec aérateur positionnés en berge (R-raffinement). Les poissons et la température de l'eau seront surveillés régulièrement. Tous les poissons seront anesthésiés à l'aide de benzocaïne avant leur biométrie et le prélèvement d'un petit bout d'une des nageoires pelviennes (3*3mm). Ce prélèvement, effectué sur la partie la plus apicale de la nageoire, est sans danger pour l'individu (régénération en 2 mois). Après la récupération complète de l'anesthésie, tous les poissons seront libérés sur leur site d'origine. Le temps en captivité sera réduit pour limiter le stress. Les échantillons seront analysés (identification des marqueurs moléculaires pour mesurer la différenciation génétique) puis conservés durant plusieurs années afin de permettre une ré-analyse avec de nouvelles technologies sans besoin d'un nouvel échantillonnage.

18576 Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) regroupent la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique. Les MICI se caractérisent par une inflammation chronique du tube digestif conduisant à une destruction de la muqueuse intestinale. Plus précisément, la rectolite hémorragique est une maladie inflammatoire qui est caractérisée par une inflammation des muqueuses cycliques qui s'initie souvent dans le rectum et s'étend aux segments proximaux du côlon (partie intermédiaire du gros intestin).

Des études menées par notre équipe ont mis en évidence que l'interleukine 34 (IL-34) est une cytokine exprimée par les cellules T régulatrices CD4+ et CD8+ et permet d'induire une tolérance à l'allogreffe via la génération de macrophages régulateurs. Ainsi, l'objectif de ce projet est d'évaluer l'impact d'une déficience en IL-34 dans le développement de la colite induite par le 2,4,6 trinitrobenzène sulfonate (TNBS) chez la souris C57Bl/6 mimant certaines caractéristiques des MICI. Dans un premier temps, l'objectif est d'induire la maladie avec différentes doses de TNBS chez des souris C57Bl/6 WT afin d'identifier la dose optimale. Dans un second temps, grâce aux souris déficientes en IL-34, nous comparerons le développement de la colite chez ces animaux en comparant à des souris WT afin d'identifier la contribution de l'IL-34 dans cette pathologie.

Le nombre total d'animaux initialement présenté dans la saisine est de 78. Un amendement a été déposé en vue d'augmenter le nombre d'animaux par rapport au nombre initial de souris (78) de

façon à tester une dose de TNBS moins importante tout en induisant la colite chez l'animal. De plus, les expériences préliminaires ayant montrées une différence mâle/femelle, nous avons besoin d'augmenter le nombre d'animaux dans chaque groupe pour prendre en compte cette variable. Le nombre d'animaux ajouté est de 92.

La durée du projet indiqué initialement sur la saisine est de 5 ans et ces 92 souris supplémentaires demandées seront bien utilisées avant la fin du délai.

Dans cette saisine, la règle des 3R a été appliquée:

- Remplacer: A ce jour, aucune expérience in vitro ou in silico ne permet de rendre compte d'une maladie inflammatoire chronique telle que la rectocolite hémorragique.

- Réduire: le nombre d'animaux par groupe est réduit au nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs.

Le nombre d'animaux nécessaire sera de 78 souris dans la saisine initialement soumise + 92 (amendement).

- Raffiner: L'induction de la maladie par injection du TNBS en intra rectale se fera sur animaux anesthésiés. Un score clinique de suivi des animaux sera réalisé quotidiennement, les animaux dépassant un certain score seront mis à mort. De plus, des objets d'enrichissement seront placés dans les cages (paper whool, tunnel).

Tous les animaux seront analysés afin d'en obtenir un maximum d'information post-mortem, en analysant les organes, le sérum par cytométrie en flux entre autres.

18577 L'acquisition des compétences à la dissection et à la suture sous microscope est grandement facilitée et sécurisée en chirurgie humaine après une initiation puis un entraînement sur modèle vivant. Le rat OFA de par la taille de ses vaisseaux en particulier abdominaux et carotidiens représente une opportunité irremplaçable actuellement par des modèles inertes. Cet entraînement permet d'acquérir les compétences nécessaires pour ensuite réussir des anastomoses vasculaires et nerveuses, de taille identique ou plus importante, sur l'être humain, gestes qui sont réalisés de nos jours par plusieurs spécialités chirurgicales. Ainsi, les chirurgiens qui suivent cet enseignement ne débutent pas leur apprentissage sur des patients. Quatre chirurgiens par an peuvent acquérir ces compétences (4 microscopes opératoires disponibles dans le laboratoire de microchirurgie).

L'enseignement a lieu sous forme de séances de 5h :

-La première séance comprend un cours théorique sur les principes de la chirurgie et des sutures sous microscope ainsi qu'une première manipulation et suture de tubes creux de silicone de 1mm et de 0.5 mm de diamètre

-Les 14 séances suivantes sont dédiées à l'apprentissage sur rat vivant endormi,

-Une séance de révision et d'entraînement précède,

-Une séance d'examen final qui est une des procédures réalisées au cours de l'année, choisie après tirage au sort.

Au total 16 séances nécessitent des animaux vivants (soit l'utilisation de 64 rats au total pour l'acquisition d'une formation et de 320 rats pour 5 années).

Entre les diverses procédures, tous les animaux seront suivis régulièrement pour détecter tout comportement douloureux anormal. Un enrichissement de l'environnement des animaux est réalisé à l'aide de jouets spécifiques pour rongeurs (tubes en PVC de large diamètre).

Si un animal manifeste des troubles comportementaux, il sera alors euthanasié par inhalation de CO₂.

Les animaux sont hébergés dans des conditions standards de 4 animaux par cage (480 x 375 x 210 mm, 1500 cm²), avec une litière en sciure de bois, dans une salle climatisée (température 22°C +/-2°C et hygrométrie 50+/-10%) avec un cycle 12:12 et un libre accès à la boisson et à la nourriture.

Un contrôle sanitaire quotidien est assuré par le vétérinaire.

Les rats sont endormis puis opérés. La description des différentes manipulations effectuées est détaillée en infra Règle des 3 R

Remplacement : Pas de modèle industriel inerte acceptable sur le plan éducatif disponible. En particulier l'étanchéité et la perméabilité des sutures microvasculaires n'est actuellement appréciable que sur modèle animal.

Réduction : un nombre de 16 séances de sutures microvasculaires semble être nécessaire pour acquérir une expérience suffisante, avant d'envisager une application pratique en chirurgie humaine. Seuls les gestes techniquement les plus demandeurs sont répétés deux fois

Raffinement : les rats sont hébergés à l'animalerie agréée de la Faculté de Médecine et de Pharmacie, ils sont endormis et analgésiés avant toute procédure, maintenus endormis durant celle-ci et euthanasiés à la fin, sans être réveillés.

18578 Les microsporidies sont des parasites intracellulaires, essentiellement connus pour parasiter les poissons, insectes et crustacés, mais dont certaines espèces peuvent infecter l'homme. La réponse immunitaire induite par l'infection microsporidienne est un phénomène encore peu étudié et mal compris. Cependant, nous savons que le parasite est capable de moduler cette réponse. Dans le but de mieux comprendre les réponses immunitaires des vertébrés vis-à-vis de ces parasites, un modèle biologique permettant d'étudier in vivo les réponses immunitaires en temps réel. Une lignée de souris transgéniques qui possède des cellules immunitaires fluorescentes est utilisée. Des analyses en microscopie confocale (imagerie en temps réel) et en cytométrie en flux sont réalisées après inoculation de spores d'*Encephalitozoon cuniculi* dans le pavillon de l'oreille de la souris. L'objectif global du projet est ainsi d'observer, et donc de mieux comprendre la dynamique des réponses immunitaires mises en jeu lors d'une infection par microsporidie.

Nous étudierons la réponse inflammatoire précoce chez la souris inoculée avec des spores d'*E. cuniculi* dans le tissu de l'oreille et le ganglion lymphatique auriculaire. En particulier, les interactions entre le parasite et les composantes cellulaires de la réponse immunitaire innée (macrophages, polynucléaires neutrophiles, cellules dendritiques) seront étudiées. Pour cela, 6 animaux seront inoculés par semaine selon le type d'expérience réalisée, pour un total de 182 animaux par an, soit 728 animaux au total sur toute la durée du projet (4 ans).

Par ailleurs, ce projet est conforme aux exigences éthiques en matière d'expérimentation animale. En effet, les expérimentations sont organisées de façon à obtenir des résultats statistiquement exploitables avec le plus petit nombre d'animaux possible.

L'approche d'imagerie intravitale permet en effet de réduire le nombre d'animaux utilisés. Les expérimentations et la méthodologie sont optimisées afin de réduire l'inconfort, la douleur ou le stress subis par les animaux (soin porté à l'amélioration des conditions d'élevage et d'hébergement, au suivi des animaux pendant et après les expérimentations). De plus, le modèle animal est choisi avec pertinence afin de répondre à la problématique posée. Enfin, le recours à l'animal est indispensable afin de pouvoir évaluer la réponse immunitaire anti-microsporidie dans sa globalité (échelle tissulaire et cellulaire).

18579 Le présent projet s'intéresse aux réseaux neuronaux et aux mécanismes de la mémoire épisodique ou souvenir, c'est-à-dire la mémoire par laquelle on se souvient d'événements vécus avec leur contexte. Ces mécanismes sont encore largement méconnus et ce projet de recherche fondamentale a pour objectif de mieux les comprendre. La formation, le maintien dans le temps et le rappel de la mémoire font intervenir de nombreuses régions cérébrales. Certaines de ces régions sont spécialisées dans le traitement d'informations sensorielles, comme le bulbe olfactif pour les odeurs ou le cortex auditif pour les informations sonores alors que d'autres sont dites associatives ou intégratives puisqu'elles reçoivent des informations de multiples sources. C'est notamment le cas de l'hippocampe et du cortex préfrontal deux régions majeures impliquées dans la formation et le rappel de la mémoire. Pour qu'une mémoire se forme et puisse être rappelée, il est nécessaire que ces multiples régions dialoguent entre elles. Ce dialogue repose sur l'existence de connexions anatomiques mais aussi fonctionnelles qu'il est possible d'étudier au moyen de l'électrophysiologie.

Cette approche consiste à introduire des microélectrodes au sein des régions d'intérêt pour recueillir et analyser l'activité électrique de neurones individuels et de populations de neurones. En outre, la mémoire met en jeu des mécanismes de neurogénèse, c'est-à-dire la formation de nouveaux neurones, et des mécanismes de plasticité cellulaire permettant aux neurones déjà présents d'adapter leurs connexions et leur fonctionnement aux nouvelles informations qui leur parviennent.

Remplacement : le projet propose de réaliser des enregistrements électrophysiologiques chez le rat, un animal de choix pour les études de la mémoire et dont la taille de cerveau est compatible avec l'insertion intracérébrale de plusieurs électrodes. Inenvisageable chez l'Homme cette approche expérimentale requiert l'utilisation d'animaux vivants en comportement, notamment pour établir des liens entre des activités électriques cérébrales multiples et un comportement. Il propose en outre de réaliser de l'imagerie cellulaire pour détecter les régions cérébrales activées lors de la formation et du rappel de la mémoire. Ces travaux seront réalisés chez l'animal au cours d'une tâche comportementale de mémoire épisodique, à la fois sur des rats normaux et sur des rats dépourvus de neurogénèse par suite d'une irradiation sélective.

L'irradiation est réalisée dans des conditions comparables à celle des radiothérapies anticancéreuses mais avec des doses de radioactivité bien moindre pour éviter tout risque sur le bien-être général.

Réduction : Ce projet permet de compléter des données déjà en cours sur ce sujet et nécessite ainsi l'utilisation de 14 animaux. Ce nombre tient compte d'un effectif minimal pour obtenir des groupes d'animaux présentant des profils comportementaux comparables, et de pertes accidentelles liées à l'anesthésie.

Raffinement : Pour la réalisation de ce projet, le bien-être animal est une condition essentielle à laquelle on veille tout au long de l'expérience. Les rats seront hébergés dans un environnement contrôlé en continu, avec un enrichissement adapté à leur espèce. Une période minimale de 7 jours sera respectée entre l'arrivée des rats et l'application des procédures expérimentales pour leur permettre de s'acclimater à leur nouvel environnement et ainsi limiter leur stress. Dès leur arrivée au laboratoire une surveillance quotidienne des animaux est mise en place de façon à détecter au plus tôt la survenue éventuelle de signes de douleur ou de détresse et ceci à toutes les étapes des expériences. Une grille de score va nous permettre d'évaluer de façon objective l'état de l'animal et de prendre les mesures adéquates pour arrêter immédiatement sa souffrance. L'ensemble des gestes susceptibles de créer de la douleur ou des dommages seront réalisés sous anesthésie générale.

18580 La gamétogenèse est un processus complexe qui conduit à la production des cellules reproductrices ou gamètes, l'ovule et le spermatozoïde. Lors de la fécondation, l'ovule et le spermatozoïde mettent en commun leur ADN pour former un embryon. Les cellules germinales ont l'unique capacité de se différencier lors de la gamétogenèse. La gamétogenèse femelle, ou ovogenèse, a lieu dans les ovaires, tandis que la gamétogenèse mâle, ou spermatogenèse, a lieu dans les testicules. Notre équipe s'intéresse à la régulation de la gamétogenèse femelle et mâle, et en particulier à la mise en place d'informations non codées dans l'ADN, appelées informations épigénétiques, qui influencent l'expression des gènes. Les profils épigénétiques mis en place lors de la gamétogenèse influencent non seulement la qualité et le nombre des gamètes produits mais aussi, le développement de la descendance, lorsqu'ils sont transmis, en même temps que l'ADN, à l'embryon au moment de la fécondation. En utilisant le modèle souris, nous espérons découvrir de nouvelles causes d'infertilité chez la femme et l'homme, en raison de la conservation entre les deux espèces des mécanismes épigénétiques que nous étudions. Notre but est de fournir aux couples infertiles des réponses quant à l'origine de leur incapacité à concevoir un enfant, qui représente une situation de grande détresse psychologique et sociale.

Remplacement : Les cellules les plus immatures de la gamétogenèse, appelées cellules germinales primordiales et qui se forment très tôt dans l'embryon, peuvent être produites en culture, selon des protocoles que nous utilisons largement au laboratoire, et qui nous permettent d'étudier les toutes premières étapes de la gamétogenèse. Cependant, il n'existe pas à l'heure actuelle de protocoles efficaces permettant de récapituler en culture l'ensemble de la gamétogenèse, jusqu'à la production

d'ovules et de spermatozoïdes matures, et qui reproduisent les changements épigénétiques que nous étudions. Nous avons donc besoin de recourir à une approche *in vivo*, c'est-à-dire de collecter les gamètes sur animaux. En pratique, nous collectons des ovules et des spermatozoïdes matures, prêts à la fécondation, mais également des cellules germinales plus immatures, qui sont les précurseurs de ces produits finaux, présents en amont lors de la gamétogenèse.

Ces différents types cellulaires germinaux, matures ou immatures, sont présents en nombre limité, surtout les ovules. De plus, nous utilisons plusieurs modèles de souris pour des gènes impliqués dans la régulation épigénétique de la gamétogenèse. Ces souris présentent diverses formes d'infertilité ou de fertilité diminuée, un trait considéré comme non invalidant pour la survie et le bien-être des animaux, mais qui limite d'autant plus le nombre de cellules germinales que nous pouvons récupérer et étudier.

Réduction : Pour limiter le nombre d'animaux utilisés, il existe des protocoles qui permettent d'augmenter le rendement de production des gamètes et/ou de synchroniser leur production. Chez les femelles, l'injection d'hormones permet de synchroniser le cycle d'ovulation et d'augmenter le nombre d'ovules produits. Chez le mâle, l'ingestion d'inhibiteurs d'acide rétinoïque permet de synchroniser la spermatogenèse et de faciliter ainsi la récupération de types cellulaires souhaités et avec un rendement augmenté.

Notre projet a été élaboré en conformité avec le principe des 3R :

Réduction, en récupérant le plus de gamètes possibles par animal

Raffinement : une manipulation minimale des animaux vivants et l'application de procédures d'euthanasie en cas de signes de souffrance et de détresse de l'animal. Nous prévoyons d'utiliser 260 animaux pour ce projet.

18581 La leptospirose est une maladie bactérienne de répartition mondiale, à dominance tropicale. En France métropolitaine, elle touche environ 600 personnes chaque année. L'incidence est de 50 à 100 fois plus élevée dans les régions tropicales. On estime à plus d'un million le nombre de cas sévères de leptospirose par an dans le monde avec un taux de mortalité supérieur à 10 %. Les personnes particulièrement à risque sont celles ayant un contact rapproché avec les rongeurs sauvages ou l'eau contaminée par leurs urines. Elle touche ainsi, par exemple les égoutiers, les pêcheurs ou le personnel de laboratoire dans les pays développés, mais aussi les victimes d'inondations dans les pays plus pauvres.

L'incubation dure en moyenne 4 à 14 jours. La maladie se caractérise par une phase initiale souvent non spécifique de type syndrome pseudo-grippal. Après quelques jours d'évolution, une atteinte multi-viscérale est possible : atteinte hépatique avec ictère, insuffisance rénale (50 à 70 % des cas), hémorragies (20% des cas), méningite (50 % des cas), atteintes neurologiques, complications oculaires...La létalité atteint 5 à 20 % sans traitement.

Un vaccin contre *Leptospira interrogans* sérovar *icterohaemorrhagiae*, groupe le plus pathogène pour l'Homme, existe et est commercialisé en France. Il est nécessaire de s'assurer de son efficacité dans un modèle animal d'infection par cette bactérie, notamment dans les cas suivants :

- Libération des lots produits pour commercialisation ;
- Vérification de la stabilité tout au long de la période de validité ;
- Evaluation de la biocomparabilité dans le cadre de modifications du processus de production.

De plus, dans le cadre d'études de protection croisée, l'efficacité du vaccin pourra être testée sur des souches d'un serogroupe autre que le serogroupe *icterohaemorrhagiae*. En effet, il existe de nombreuses souches (formes) de *Leptospires* responsables de la Leptospirose et ces souches sont géographiquement très localisées. Afin d'étendre les indications du vaccin déjà commercialisé, il est donc indispensable de démontrer la protection croisée du vaccin pour d'autres serogroupes présents hors France métropolitaine et DOM-TOM.

La gerbille est un des modèles couramment utilisé d'infection par *Leptospira interrogans* et le vaccin est connu pour être efficace dans cette espèce. Le principe de ces tests d'efficacité est de vacciner des animaux avec le lot de vaccin à tester (deux injections à 7 jours d'intervalle). Deux semaines

après la deuxième injection, les animaux sont infectés expérimentalement par la bactérie. Leur taux de mortalité est alors comparé à celui d'animaux non vaccinés et infectés.

Durant les cinq années du projet, un total de 1000 gerbilles devrait participer à ces procédures. Cette estimation est basée sur l'effectif réellement utilisé dans les essais couverts par la précédente autorisation soumise pour le même projet et sur l'analyse rétrospective qui en a été faite sur les cinq dernières années (environ 200 gerbilles par an).

Dès leur arrivée, les animaux seront examinés pour s'assurer de leur bon état de santé. Ils seront suivis quotidiennement afin de détecter tout signe clinique de douleur et de détresse. Une attention particulière sera accordée à l'enrichissement du milieu de vie des animaux et à un hébergement en groupes sociaux pour respecter au mieux le bien être des animaux et les comportements naturels (nidification, matériel pour ronger...).

18582 L'infection à *M. ulcerans* est une maladie négligée émergente. Cette infection, qui touche principalement les enfants, est diagnostiquée principalement dans les zones humides de l'Afrique de l'Ouest et Centrale. Les lésions débutent généralement par un nodule qui évolue en une ulcération que s'étend dramatiquement. Malgré leur étendue, les lésions ne sont pas douloureuses. Chez l'Homme, lorsque les lésions ne sont pas traitées, elles peuvent évoluer vers un processus spontané de cicatrisation. Il y a quelques années, nous avons rapporté que des souris FVB/N, inoculées par *M. ulcerans* présentent des lésions identiques à celles observées dans les souches C57Bl/6 et BALB/c, mais évoluent vers une cicatrisation. Cette étude met en exergue l'existence de facteurs génétiques de susceptibilité à l'infection par *M. ulcerans*. Nous avons donc initié une étude de génomique comparative entre les souches C57Bl/6, BALB/c et FVB/N. Brièvement, il est apparu que les souris FVB/N contrairement aux autres souches murines, étaient déficientes pour un récepteur couplé aux protéines G. Nous avons montré que les souris KO pour ce récepteur étaient elles aussi capables de maîtriser l'infection. La compréhension en profondeur du rôle de ce récepteur dans la physiopathologie de l'ulcère de Buruli ouvrira donc de nouvelles perspectives thérapeutiques. Seule l'utilisation de modèles animaux développés spécifiquement pour notre étude pourra répondre à cette question. Dans ce but, nous avons obtenu des animaux transgéniques (souris C57Bl/6 déficientes pour ce récepteur couplé aux protéines G). L'utilisation de ces souris nous permettra de démontrer formellement le rôle de ce récepteur dans la physiopathologie de l'infection à *M. ulcerans* et d'identifier les acteurs cellulaires et moléculaires sous-jacents.

Un nombre total de 736 souris sera nécessaire à ce projet, soit entre 168 et 200 souris par souches : 168 pour C57Bl/6 et souris transgéniques pour le récepteur +/- ; 200 pour FVB/N et souris transgéniques pour le récepteur -/- (en raison de leur capacité à guérir ces souris sont gardées 15 jours de plus pour nos investigations). L'infection à *M. ulcerans* sera suivie macroscopiquement et à l'échelle tissulaire. Cette étude a été rédigée et pensée de manière à respecter la règle des 3 R (Remplacement, Réduction, Raffinement) qui consiste à n'utiliser que le nombre nécessaire d'animaux pour mener à bien cette étude, tous les résultats obtenus seront utilisés et exploités. Le bien-être animal a été une des priorités dans la conception de cette étude mais nous ne pouvons à ce stade nous passer d'utiliser des animaux. Afin de raffiner les conditions de vie des souris, un suivi adapté des animaux a été instauré afin de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, mais aussi la détresse ou l'angoisse qu'ils pourraient éprouver. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux et bénéficient d'un enrichissement adapté (cabanes, papier, tubes en carton). Un suivi régulier sera effectué sur l'ensemble des animaux et des indicateurs comportementaux et physiques sont prédéfinis et constituent les points limites. Pour éviter toute souffrance lors du protocole expérimental, un anesthésique volatil (isoflurane) sera utilisé lors de l'injection de *M. ulcerans* en sous cutané chez la souris. Ce projet s'inscrit ainsi dans une gestion éthique de l'expérimentation animale et est donc en accord avec les réglementations européennes et françaises de bonnes pratiques de laboratoire. Ce projet ne débutera que lorsque l'APAFIS ci présent aura été validé par le comité d'éthique et le ministère. Toutes les expérimentations seront réalisées dans un niveau de confinement 3* (notre LNSB3 vient d'être agréé par le ministère).

18583 Si l'ozone naturel (O₃), qui provient des couches supérieures de l'atmosphère, protège l'être humain du dangereux rayonnement ultraviolet, en revanche, l'ozone qui se trouve au niveau du sol est toxique. Dans la troposphère proche du sol, l'ozone est produit par l'action de la lumière du soleil sur les gaz précurseurs que sont les composés organiques volatils (COV, également appelés hydrocarbures volatils) et le dioxyde d'azote (NO₂). Plus le rayonnement solaire est intense et les concentrations de COV et de NO₂ élevées, plus la formation d'ozone est grande; une température de l'air élevée favorise également ces réactions chimiques.

L'ozone figure parmi les gaz irritants les plus puissants. Chez l'être humain, il attaque surtout les voies respiratoires et le tissu pulmonaire. Le risque pour la santé dépend de sa concentration dans l'air, de la durée de l'exposition et de l'effort physique fourni.

L'ozone représente un facteur dans le développement de la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO). Nous utiliserons donc l'exposition à l'ozone dans ce projet afin de tester de nouvelles cibles thérapeutiques inhibitrices de l'inflammation et du développement de l'emphysème dans un modèle in vivo de BPCO

La bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) est une maladie chronique respiratoire. Chez les personnes atteintes, une inflammation des voies aériennes, et notamment des bronches, provoque l'épaississement de leurs parois, ainsi qu'une hypersécrétion réactionnelle de mucus. Le tissu pulmonaire est également inflammé, ce qui entraîne des perturbations dans le fonctionnement des cellules qui le constituent. Les alvéoles pulmonaires qui permettent les échanges gazeux lors de la respiration sont progressivement détruites, conduisant à l'emphysème.

La bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) est une maladie encore relativement méconnue du grand public. Pourtant, elle n'est pas rare : en 2010, on estimait à 3,5 millions le nombre de personnes atteintes en France, soit 7,5% de la population. Les taux d'hospitalisation augmentent régulièrement depuis 2000. En 2017, entre 107 000 et 170 000 séjours hospitaliers en lien avec la BPCO ont été comptabilisés en France, et 17 000 décès étaient imputables à la maladie comme cause initiale ou associée. Selon les projections de l'OMS, la BPCO pourrait constituer la 3ème cause de mortalité dans le monde en 2030.

La BPCO est attribuable au tabagisme dans environ 80 % des cas. Les autres facteurs de risque comprennent :

- Les expositions professionnelles (environ 15 % des BPCO),
- La pollution atmosphérique (notamment l'ozone),
- L'exposition passive à la fumée de cigarette,
- Des facteurs génétiques.

La BPCO se manifeste par des signes cliniques non spécifiques : toux chronique, expectorations, essoufflement (dyspnée).

Les principaux traitements prescrits dans la BPCO sont utilisés pour dilater les bronches et faciliter le passage de l'air. Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de traitement spécifique et réellement efficace contre la BPCO. Le traitement repose sur des bronchodilatateurs à courte durée d'action (β 2-agonistes, les anticholinergiques et les méthylxanthines), des bronchodilatateurs à longue durée d'action (tiotropium, salmeterol, formoterol) et des corticostéroïdes inhalés. Cependant ces molécules sont peu efficaces et n'empêchent pas le développement de l'emphysème. C'est pourquoi l'étude de nouvelles molécules thérapeutiques est nécessaire.

La phase préclinique consiste en l'étude de l'action des agents pharmacologiques in vivo chez le rongeur. C'est une étape essentielle dans le développement de médicaments. Ce projet a pour but de tester de nouveaux médicaments contre le développement de l'emphysème et des anti-inflammatoires chez l'animal.

Les animaux utilisés seront des souris C57BL/6 ou BALB/c, qui vont recevoir de manière préventive (avant induction de la maladie) ou curative (après induction de la maladie) les molécules à tester par différentes voies d'administration : intra nasale, intratrachéale, intra-péritonéale, orale, sous-cutanée ou nébulisation. L'exposition à l'ozone consiste à placer les animaux dans une enceinte dans laquelle une quantité d'ozone va être délivrée et inhalée par les animaux.

L'exposition à l'ozone induit des douleurs inflammatoires aiguës à l'animal juste après l'exposition à l'ozone dans le cas d'un modèle aigu ou durant la première semaine d'exposition dans le cas d'un modèle chronique. Ces douleurs sont liées au développement de la maladie pulmonaire. La prostration des animaux, le poils hérissé et la difficulté respiratoire des animaux sont des signes cliniques visibles qui apparaissent suite à la douleur inflammatoire induite par l'exposition à l'ozone. Les jours d'exposition à l'ozone, les animaux sont surveillés le matin (1h après exposition), le midi et le soir (16h). Une surveillance quotidienne des animaux y compris les week-ends est effectuée pendant la période d'acclimatation et d'expérimentation. Pour chaque étude, les responsables de l'étude remplissent un registre de suivi journalier de poids individuel des animaux et attribuent un score qui est rattaché à chaque expérience et est expertisé tous les six mois par le responsable du suivi de projet de la SBEA. De plus, une procédure d'urgence est affichée en animalerie avec les personnes à contacter et la procédure à suivre dans le cas d'un animal en souffrance. L'animal sera mis à mort dans le cas d'un point limite atteint.

Le projet représente un ensemble d'études types. Le nombre d'études réalisées durant la période de validité de l'autorisation dépendra du nombre de molécules à tester. Le projet pourra comporter jusqu'à 20 études, incluant au maximum 90 animaux, soit 1800 animaux au total.

A ce jour, l'animal de laboratoire reste le seul recours fiable et pertinent permettant d'étudier l'efficacité de nouvelles molécules thérapeutiques. Ce projet sera réalisé en respectant les principes fondamentaux de l'expérimentation animale :

-Remplacement : le modèle animal est fondamental dans notre cas, puisque l'étude de l'inflammation et de la pathologie ne peut se faire que sur un organisme vivant entier.

-Raffinement : les animaux seront observés scrupuleusement quotidiennement, des points limites ont été définis afin de respecter leur bien-être et d'éviter au maximum la douleur au moment de l'expérimentation. Lors de certains traitements, selon la voie d'administration, les animaux sont anesthésiés à l'isoflurane. Si des animaux montrent des signes de souffrance (points limites détaillés dans la procédure), ils seront mis à mort. Enfin, les souris seront hébergées dans des cages en portoir ventilé enrichies avec du Celuron. Elles auront un accès à l'eau et la nourriture ad libitum et un cycle jour/nuit 12h/12h pendant toute la durée de l'expérimentation.

-Réduction : Le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats pertinents et reproductibles, évitant ainsi de refaire plusieurs fois les mêmes expérimentations.

18584 Les immunodéficiences primaires (dites PID "Primary ImmunoDeficiency") constituent un groupe hétérogène de maladies héréditaires qui touchent principalement les enfants. Les PID les plus graves sont des affections potentiellement mortelles, caractérisées par (i) une sensibilité aux infections et (ii) une tendance à développer des troubles auto-immuns et des cancers. L'utilisation de traitements telles que l'administration d'immunoglobulines, d'antibiotiques prophylactiques et immunosuppresseurs, ainsi que l'amélioration des soins cliniques, ont augmenté l'espérance de vie des patients atteints de PID, dont certains peuvent désormais espérer atteindre l'âge adulte.

A ce jour, la transplantation de cellules souches hématopoïétiques allogéniques, d'un donneur compatible, est le seul traitement curatif établi. Cependant, en l'absence d'un donneur compatible, la transplantation n'est pas pleinement efficace, en raison d'un risque plus élevé de mortalité précoce et de complications. C'est pourquoi la transplantation de cellules souches hématopoïétiques autologues, du patient lui-même, ou de cellules T matures, pourrait être une solution efficace pour réduire le risque de mortalité précoce et de complications à court et à long terme.

Les PID incluses dans ce projet sont justifiées pour l'utilisation de cellules autologues, en les modifiant pour ré-exprimer le gène déficient ou muté dans la maladie. En particulier, le syndrome IPEX, syndrome d'Immunodérégulation, de Polyendocrinopathie et d'Entéropathie lié au chromosome X, est une maladie rare associant un déficit immunitaire, des troubles endocriniens, avec une insuffisance des glandes surrénales, de la thyroïde, et/ou un diabète de type 1, ainsi qu'une atteinte intestinale, due par exemple à une intolérance telle que le gluten. C'est une affection

récessive liée à une mutation du gène FOXP3 situé sur le chromosome X. Cette mutation provoque un défaut de régulation de la réponse immunitaire induisant des atteintes auto-immunes et des réactions allergiques dues à l'absence d'une population de globules blancs, notamment les lymphocytes T régulateurs.

Afin de pouvoir restaurer la fonctionnalité du système immunitaire, la perspective de traitement envisagé dans le cadre de ce projet s'appuie sur la thérapie génique, qui vise à substituer le gène FOXP3 défectueux du patient par un gène FOXP3 fonctionnel au sein des lymphocytes prélevés chez le patient, afin de générer des lymphocytes T régulateurs fonctionnels.

Dans ce but, les lymphocytes T seront prélevés chez les patients, mis en culture in vitro, et le gène FOXP3 sera amené au sein des cellules à l'aide d'un vecteur viral permettant le transfert de gène et son intégration dans le génome cellulaire. Après caractérisation in vitro des cellules modifiées exprimant le gène FOXP3 normal, celles-ci seront injectées par voie intraveineuse à des souris immunodéficientes, qui permettent la prise de greffe de cellules humaines. La biodistribution et la génotoxicité seront évaluées dans ce modèle de souris sur une période de 2 mois, en effectuant des prélèvements sanguins toutes les 2 semaines afin de vérifier la présence des cellules humaines dans la circulation sanguine, de les caractériser et d'analyser le niveau d'expression du gène FOXP3, étape requise par l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament. Les animaux seront sacrifiés 2 mois après l'injection des cellules humaines pour prélever différents organes pour l'étude de biodistribution.

Une étude préalable sera réalisée selon la même méthodologie en utilisant des lymphocytes T de porteurs sains, afin de définir les conditions précises de manipulation de ces cellules in vitro et la quantité de cellules à injecter aux souris.

- Réduction: les analyses ex vivo sur les cellules sanguines humaines implantées dans la souris requièrent 9 animaux par condition expérimentale. Cet effectif est suffisant pour les analyses moléculaires et de caractérisation cellulaire prévues dans ce projet. Une différence de prise de greffe pouvant être observée entre les animaux, nous utiliserons un test statistique dit "non paramétrique", plus robuste, et en standardisant les protocoles. Au total, nous prévoyons d'utiliser 63 animaux pour l'étude avec les lymphocytes de donneurs sains et des patients.

- Raffinement: le modèle de souris qui sera utilisé pour la greffe des cellules humaines est adapté pour recevoir des cellules d'une autre espèce de par son immunodéficiência, en limitant ainsi les effets de réaction anti-greffe qui auraient lieu dans un modèle immunocompétent. L'injection des cellules se fera par voie intraveineuse, en surveillant le site d'injection. Par ailleurs, l'ensemble des manipulations seront réalisées sous hotte afin de protéger l'état de santé des animaux. D'une manière générale, toutes les dispositions seront prises pour conserver les animaux dans les meilleures conditions possibles, avec un enrichissement, des conditions d'hébergement optimales et une surveillance quotidienne de leur état de santé.

- Remplacement: toutes les étapes d'optimisation de l'expression du gène FOXP3 et de modification des lymphocytes seront réalisées au préalable dans un système de culture cellulaire in vitro. Seules les conditions optimales seront appliquées aux études utilisant les animaux, modèle nécessaire pour valider une approche de thérapie génique avec un suivi des cellules modifiées in vivo, quant à l'efficacité de l'expression du gène FOXP3, mais aussi pour vérifier l'absence d'effets secondaires.

18585 La recherche d'éventuels défauts anatomiques ou fonctionnels chez le modèle animal nécessite souvent des études histologiques lourdes. Les nouvelles techniques d'imagerie permettent de disposer d'un outil capable de caractériser et de suivre au cours du temps ces défauts, offrant ainsi la possibilité de s'affranchir de ces interventions. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est actuellement la seule technique d'imagerie permettant de réaliser une large gamme d'images et de récupérer le plus grand nombre d'informations à partir d'un seul examen. C'est une technique unique et non-invasive, qui permet d'explorer l'ensemble des tissus et des fluides du corps sans les exposer aux rayons X, ni procéder à l'utilisation d'un produit radioactif. Par ailleurs, elle est non douloureuse et sans effet secondaire connu. Le présent projet a pour objectif principal de valider de nouvelles techniques d'imagerie basées sur l'IRM à très haut champ magnétique (7 Tesla). Il nous

semble important d'acquérir des images sur un groupe d'animaux pour à la fois optimiser les paramètres et techniques d'acquisition sur un nouvel appareil d'imagerie du petit animal. Ainsi, il vise à valider les séquences d'imagerie qui seront utilisées dans des projets de recherche à venir. Le recueil de ces informations permettra, non seulement, l'optimisation future des protocoles de recherche, mais également un partage de ces données et ainsi éviter des duplications de données (un des aspects de la règle des 3R: Réduction). Cela nous permettra aussi d'intégrer ces données dans une base de données locale qui permettra de guider de nouvelles études en imagerie chez la souris et chez le rat. Cette banque de données sera ainsi un facteur de réduction du nombre d'animaux à inclure dans de futurs projets de recherche. Pour ce projet, la mise au point se fera sur souris et rats anesthésiés. Dans la mesure du possible, nous utiliserons des animaux surnuméraires ou engagés dans un précédent projet (procédure légère uniquement et en accord avec notre vétérinaire référent) -REPLACEMENT: Le modèle animal ne peut être substitué par un modèle in vitro ou ex vitro, puisque ces derniers ne permettent pas de reproduire la complexité des tissus et la physiologie des organes de souris ou de rats vivants. Nous disposerons aussi de paramètres d'acquisition de référence et validés qui seront utiles pour les autres demandeurs d'IRM sur cette nouvelle machine. -RAFFINEMENT: Tous les animaux inclus dans ce projet sont hébergés en groupe dans un environnement enrichi afin d'éviter toute souffrance (et/ou angoisse). Les animaux ne seront soumis qu'à une anesthésie (à l'isoflurane ou équivalent) par voie gazeuse, qui pourra être répétée jusqu'à 5 fois. Cinq rats seront soumis à une anesthésie avec injection d'un agent de contraste. -REDUCTION: Nous prévoyons d'utiliser un nombre minimal d'animaux pour réaliser ce projet. Nous estimons nécessiter de 10 souris et 10 rats pour compléter cette étude mais le nombre d'animaux impliqué dans la procédure sera réduit au maximum.

18586 Les maladies neurodéveloppementales (telles que les troubles du déficit intellectuel, les troubles de l'attention et de l'hyperactivité ou les troubles du spectre autistique) touchent environ 2 à 6 % des enfants. Une meilleure compréhension des bases neurobiologiques de ces troubles est cruciale pour la gestion de leurs symptômes et pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques. Il est intéressant de noter que ces troubles ont souvent une cause génétique connue, ce qui permet de les modéliser précisément dans des modèles précliniques tels que les rongeurs. L'objectif de notre étude est de développer de nouveaux biomarqueurs physiologiques liés aux problèmes cognitifs associés aux maladies neurodéveloppementales, en vue d'éventuellement proposer, de manière raisonnée, un traitement ciblant ces altérations. Pour réaliser nos études, nous utiliserons un modèle génétique (souris transgénique) reproduisant les symptômes cognitifs de cette pathologie, présents chez l'homme.

Pour mener nos études, nous effectuerons des tests "ex vivo" sur des populations de neurones sélectionnées. L'identification de ces neurones nécessitera une brève intervention chirurgicale. Certaines de nos études visent à comprendre les conséquences d'un changement dans l'activité des neurones présents dans cette zone cérébrale, et impliqueront l'expression d'un récepteur modifié.

Conformément à la directive européenne, et au principe des 3R, nous avons réfléchi à l'exécution de notre programme expérimental et nous avons mis en place de nombreuses mesures pour minimiser le nombre d'animaux utilisés et la souffrance imposée par les procédures détaillées dans ce document. Raffinement : Les animaux sont hébergés d'une manière adaptée à leurs besoins (hébergement en cage collective, fourniture de matériel pour la construction du nid) et font l'objet d'un suivi quotidien et des soins appropriés (par exemple, anesthésie, analgésie, stratégies pour éviter la souffrance, etc). Remplacement : notre projet se concentre sur l'étude des altérations neurobiologiques liées aux troubles cognitifs chez un modèle de maladie neurodéveloppementale. Conformément aux études menées chez l'homme, l'utilisation de systèmes complexes, entiers et intacts est nécessaire pour la réalisation des objectifs scientifiques de notre étude. Remplacement par des animaux de moindre sensibilité, par exemple la mouche du vinaigre, n'est pas possible parce qu'ils n'ont pas la structure cérébrale appropriée. Le remplacement de nos études par des essais cliniques réalisés sur des sujets humains n'est pas possible parce qu'il s'agit d'une population fragile et parce que la réalisation de nos objectifs scientifiques nécessite des approches invasives.

Réduction : nous avons réfléchi à nos expériences de façon à réduire au minimum le nombre d'animaux nécessaires à l'exploitation statistique des résultats. Nous avons estimé à le nombre total d'animaux requis pour ce projet crucial à 268 animaux. Le bénéfice attendu de notre projet est une meilleure compréhension des mécanismes biologiques qui sous-tendent ces maladies et, à long terme, la possibilité de proposer de nouveaux traitements pharmacologiques ciblant ces altérations.

18587 Mots clefs : Hémodynamique, récepteur au froid, anesthésie, hypothermie

Objectifs : Ce projet, s'inscrit dans le cadre d'une des thématiques de recherche du laboratoire, qui consiste à caractériser les effets du principal récepteur au froid de l'organisme (le récepteur TRPM8) et notamment son possible rôle cardioprotecteur lors de processus ischémiques (infarctus, arrêt cardiaque...).

Nous savons qu'une stabilité de la pression artérielle et un débit sanguin adapté aux besoins de l'organisme sont essentiels afin de ne pas aggraver les lésions cellulaires survenant lors d'une ischémie.

Or il semblerait que certaines formes du récepteur au froid de l'organisme (récepteur TRPM8) soient présentes au niveau des vaisseaux et pourraient avoir une influence sur la pression artérielle et le débit sanguin selon leur état activé ou inactivé.

De plus de nombreuses situations cliniques, conduisent à une modification de l'activité de ce récepteur au froid : anesthésie générale par gaz anesthésique ou chirurgie à basse température afin de préserver les organes (en chirurgie cardiaque par exemple). Dans ces conditions, nous savons que la pression artérielle et le débit sanguin du patient, peuvent varier de façon importante pour de multiples raisons.

La question sous-jacente à ce travail est : la modification de l'activité du récepteur au froid par les drogues anesthésiques et la baisse de la température est-elle impliquée dans ces variations de pression et de débit pouvant être néfaste pour le patient ?

Bénéfices attendus :

Cette étude nous permettra d'étoffer nos connaissances sur le fonctionnement du récepteur au froid et de ces différentes formes (in vitro). Mais également de préciser son rôle dans le domaine cardiovasculaire, en caractérisant l'impact de son activation sur le débit et la fonction cardiaque.

A l'échelle clinique, et à plus long terme, une meilleure compréhension des variations de pression et de débit sanguin, potentiellement néfaste pour le patient lors d'une anesthésie ou d'une baisse de température, pourrait nous permettre, dans le domaine de l'anesthésie ou même de la réanimation, de rationaliser l'utilisation de certains médicaments comme les gaz anesthésiques dans ces conditions particulières d'ischémie (infarctus, arrêt cardiaque, chirurgie cardiaque). Nous pourrions par ce biais améliorer les pratique cliniques et la prise en charge de nos patients.

Dommmages attendus :

Procédure 1 : Étude pilote anesthésie au propofol. Les animaux pour cette première procédure seront soumis uniquement à une anesthésie. L'objectif de cette étape, est de déterminer la faisabilité et les doses d'anesthésie au propofol chez la souris (anesthésique très utilisé chez l'homme). Nous étudierons donc deux voies d'administration : intra-rectale et intra-veineuse. Il s'agit d'une étape préalable à l'utilisation de cette molécule dans la procédure 2.

Procédure 2 : des animaux dépourvus du récepteur au froid et des animaux dit contrôles (présentant le récepteur au froid au sein de leur organisme) seront anesthésiés selon différents protocoles :

- Anesthésie par propofol (selon les données de la procédure 1)
- Anesthésie gazeuse (sevoflurane), dont les doses sont déjà connues chez l'animal et qui est également connu pour être un stimulant du récepteur au froid.
- Anesthésie de référence du laboratoire chez la souris (injection en sous-cutanée)

Une fois les animaux endormis, des mesures d'échographie cardiaque (non invasif) seront réalisées afin d'estimer le débit sanguin et la fonction cardiaque de chaque animal sous différentes conditions :

- Animal à température normale : 37°C
- Animal à température basse 33°C (connue pour stimuler également le récepteur au froid)
- Animal à température basse 33°C, avec adjonction d'un stimulant pharmacologique du récepteur au froid intraveineux.

En plus des mesures échographiques, trois prélèvements sanguins d'une goutte de sang prise au niveau de la queue par ponction de l'artère caudale seront réalisés. Via ces prélèvements, nous pourrions mesurer le lactate artériel à différents temps, très bon reflet d'un débit sanguin adapté aux besoins de l'organisme de l'animal.

Les procédures, prévues pour ce projet, ne sont ni invasives, ni ne laissent attendre une quelconque douleur, angoisse ou souffrance de l'animal.

Pour autant, les animaux seront surveillés pendant toute la procédure, dans les suites immédiates de l'anesthésie et également à distance selon un protocole d'observation prédéfinie afin de s'assurer de l'absence d'anomalie.

Le réveil des animaux dans les suites de l'anesthésie, se fera en couveuse et dans des conditions facilitant la reprise alimentaire et hydrique de l'animal.

Ce projet nécessite le recours à maximum 96 souris.

Règle des 3R :

Remplacement :

Un modèle *in vitro* (cellulaire) sur le récepteur au froid a validé auparavant, les drogues stimulant ou inhibant le récepteur au froid. Seuls les éléments retenus comme pertinents pour répondre à notre question ont été choisis pour être testés sur modèle animal.

A l'heure actuelle, il n'existe aucune méthode alternative (notamment *in vitro* ou *in silico*) permettant de mimer ou prédire correctement la réponse d'un organisme en termes de débit sanguin ou de fonction cardiaque lors de la modification de paramètres précis. Pour ceci, un modèle *in vivo* est alors nécessaire.

Un maximum de données ont donc été récoltées sur modèle *in vitro*, mais pour répondre à notre question concernant l'influence du récepteur au froid sur les modifications de débit sanguin et de fonction cardiaque, une étude sur modèle animal est nécessaire.

Réduction :

Le nombre d'animaux a été réduit au minimum nécessaire à l'obtention de résultats statistiquement exploitables, sur la base des résultats précédemment obtenus dans les mêmes conditions (tests de puissance).

Les molécules anesthésiques et autres stimulants du récepteur, ne seront testés *in vivo* qu'après avoir été validées *in vitro*, afin d'optimiser au mieux le nombre d'animaux utilisés.

Enfin, toujours dans un objectif de réduction, tous les animaux (la procédure étant classifiée comme légère) sont amenés à être réutilisés, après rémission complète validée, dans des projets ultérieurs ou pour le maintien de compétences techniques (qui, sinon, auraient nécessité l'utilisation d'autres animaux), conformément aux consignes réglementaires de réutilisation des animaux.

Raffinement :

La procédure est certes classifiée comme légère, sans acte invasif, mais des mesures de raffinement et points limites ont tout de même été déterminés au préalable.

Ce raffinement consiste en :

- Une surveillance de l'animal durant toute la procédure anesthésique (température, fréquence cardiaque, fréquence respiratoire), avec des mesures adéquates en cas d'anomalie.
- Un réveil en conditions adaptées : couveuse avec eau sous forme gélifiée et nourriture de consistance molle, directement dans la litière afin de faciliter la reprise alimentaire et hydrique.
- Une surveillance du réveil renforcée avec suivi clinique à 2h et 24h post-anesthésie selon les critères d'une grille d'observation validée dans le laboratoire.

18588 Les migraines constituent un problème de santé publique ayant un impact négatif majeur dans la vie quotidienne des patients. Les crises de migraine qui concernent 20% des femmes pour 6% d'hommes, sont caractérisées par des céphalées d'intensité modérée ou sévère, unilatérales, pulsatiles, pouvant durer entre 4 et 72 heures en l'absence de traitement. Par ailleurs, ces céphalées sont associées à des modifications de la perception sensorielle telles que l'allodynie (douleur provoquée par une stimulation non douloureuse), la phonophobie et/ou la photophobie. Ainsi la physiopathologie de la migraine implique des régions cérébrales multiples pour rendre compte à la fois de la douleur et des troubles sensoriels associés. L'étude des mécanismes physiopathologiques nécessitent donc d'avoir recours à l'animal afin de tenir compte de toutes les interactions cérébrales qui entrent en jeu lors d'une crise migraineuse.

L'objectif de ce projet est d'étudier la phonophobie dans un modèle de migraine chronique chez le rat en testant leur fonction auditive. Pour cela, nous allons utiliser le test du startle (sursaut du rat) lors de l'émission de sons d'intensité croissante (60 à 100 dB) dans un modèle de migraine qui consiste à injecter de manière répétée des substances inflammatoires à la surface des méninges. Ce modèle rend compte des différents symptômes observés lors des crises de migraine.

Pour respecter la règle des 3R, le nombre d'animaux utilisés sera réduit au maximum. Dans ce but, les animaux sont placés dans des cages enrichies (rouleaux permettant de se cacher) ce qui permet de réduire le stress des animaux. Les animaux auront accès à l'eau et à la nourriture ad libitum. D'après les études précédentes, la chirurgie nécessaire pour la mise en place d'une canule au niveau des méninges est bien supportée par les animaux. Les dommages attendus, mis en évidence précédemment, sont une douleur modérée. Par ailleurs, la chirurgie est effectuée sous anesthésie générale (soit le mélange ketamine/xylazine), les animaux sont placés sur une couverture chauffante pendant tout le temps de la chirurgie et leur cornée est protégée par une couche de vaseline. Le zone d'incision est désinfectée avec une solution antiseptique. Le temps de chirurgie est optimisé au maximum pour qu'il dure le moins longtemps possible. Les animaux sont gardés dans la pièce de chirurgie en observation jusqu'à leur réveil complet. Les animaux seront ensuite observés tous les jours par l'expérimentateur. Ils seront pesés tous les 2 jours, leur vitalité sera vérifiée (déplacement, alimentation, état général, comportement douloureux). Un traitement au ketoprofène pendant 3 jours (5mg/kg en intramusculaire). Le nombre d'animaux dans cette étude tient compte des animaux chez qui l'injection ne fonctionnerait pas (échec de la chirurgie, canule bouchée, non-répondeurs). Nous évaluons à 30 animaux, le nombre nécessaire pour réaliser cette étude.

18589 En élevage avicole, un des enjeux est d'améliorer l'intégrité intestinale des animaux. Celle-ci peut être altérée par la présence de micro-organismes pathogènes ou encore par des affections parasitaires comme la coccidiose, maladie causée par le développement de protozoaires intestinaux, du genre *Eimeria*. Ceux-ci affectent le bien-être des poulets, utilisent les nutriments apportés par l'aliment au détriment de l'animal et abîment la muqueuse intestinale. Ils entraînent une dégradation des conditions de vie et donc du bien être des poulets. Les animaux sont affaiblis, prostrés et peuvent souffrir de diarrhées qui génèrent une humidité de la litière et donc des brûlures des pattes (pododermatites). On observe des retards de croissance, une diminution de l'efficacité alimentaire (capacité du poulet à convertir les aliments en poids vif) et dans des cas extrêmes, de la mortalité.

Le poulet de chair est par définition un animal jeune. La mise en place de ses défenses immunitaires commence avant même l'éclosion grâce au transfert des anticorps maternels via l'œuf. A cette immunité temporaire succède l'immunité propre de l'animal, acquise lors de l'exposition aux microorganismes de l'environnement ou par la vaccination. Cette phase critique sera d'autant plus efficace que l'intégrité intestinale sera bonne. Certaines solutions actuellement utilisées sur le marché comme les vaccins ou encore les extraits végétaux, sont connues pour interagir très tôt avec le système immunitaire. La finalité de la présente étude est de tester l'efficacité d'une matière première (un extrait d'œufs) permettant d'améliorer l'immunité des animaux soumis à un challenge coccidien.

Dans le cadre de cette étude, nous évaluerons l'efficacité de 2 stratégies alimentaires à base d'extraits d'œufs (lots 3 et 4) en comparaison avec 2 solutions déjà utilisées sur le terrain.

Pour cela, 1440 poulets de chair JA 757, seront inclus. Certains d'entre eux seront soumis à une inoculation parasitaire expérimentale. Les résultats seront comparés à ceux des 480 poulets témoins (lots contrôles 1 et 2), inoculés ou non :

- lot 1 contrôle positif : 240 poulets inoculés, non traités
- lot 2 contrôle négatif : 240 poulets non inoculés, non traités
- lot 3 stratégie alimentaire n°1 : 240 poulets inoculés recevant, via l'alimentation, l'extrait d'œufs sur un programme court (27 jours)
- lot 4 stratégie alimentaire n°2 : 240 poulets inoculés recevant, via l'alimentation, l'extrait d'œufs sur toute la période d'élevage (49 jours)
- lot 5 stratégie alimentaire n°3 : 240 poulets inoculés recevant, via l'alimentation, un mélange de composés végétaux autorisés
- lot 6 stratégie vaccinale : 240 poulets inoculés soumis à une vaccination anticoccidienne au couvoir dès l'éclosion (pas de programme alimentaire préventif)

A 17 jours d'âge, chaque animal des lots 1, 3, 4, 5, 6 recevra oralement 1ml d'une solution contenant une dose connue de coccidies spécifiques du poulet. L'inoculation est réalisée via une canule souple introduite délicatement par le bec. Cette inoculation va entraîner des signes cliniques tels que la frilosité et la diarrhée qui doivent durer 3-4 jours avec guérison spontanée. Les animaux du lot 2 recevront 1 ml de la solution servant à diluer les coccidies pour les lots 1, 3, 4, 5, 6, pour attester de l'absence de signes cliniques dus au processus d'inoculation seul.

Dans le cas de cette étude la composition de l'inoculât est étudiée pour entraîner uniquement des signes cliniques de la maladie. Lors d'une étude préalable réalisée dans les mêmes conditions nous n'avons observé que des signes cliniques et aucune mortalité.

Les critères sanitaires et de bien-être des poulets (morbidité = nombre d'animaux présentant les signes cliniques de la maladie, mortalité, qualité de la litière) ainsi que les paramètres zootechniques (croissance, consommation d'aliment) seront suivis pendant toute l'expérimentation. Les lésions intestinales seront déterminées au bout de 23 jours, après euthanasie d'une partie des animaux selon les normes en vigueur (24 poulets/lot). Le reste des animaux sera abattu au terme des 49 jours de l'essai (216 animaux/lot) pour être commercialisés.

Remplacement : étant donné l'objectif du projet, l'espèce aviaire ne peut être substituée par un modèle d'étude in vitro ou in silico. L'utilisation d'animaux expérimentaux est nécessaire, puisque cette étude ne pourrait pas être effectuée sur le terrain dans un élevage classique. Pour que les données soient valides, et permettent des comparaisons, il est nécessaire d'avoir 6 répétitions par lot et nous ne disposons pas de producteurs équipés pour respecter un tel dispositif.

Réduction : Le projet a pour objectif d'évaluer les effets sur le bien-être, l'état sanitaire et les paramètres zootechniques de différentes stratégies de prévention anticoccidienne chez le poulet de chair soumis à une infestation coccidienne expérimentale. Des expériences précédentes ont montré que pour mettre en évidence des effets significatifs, 6 répétitions de chaque condition sont nécessaires.

Raffinement : les poulets seront élevés au sol sur une litière de paille, avec ajout de litière au cours de l'essai si nécessaire. La densité sera de 16,3 poulets/m² soit une densité classiquement observée sur le terrain, ce qui évitera de biaiser les résultats du projet et de pouvoir les appliquer par la suite dans les élevages des agriculteurs. Chaque groupe de 40 poulets aura accès à l'aliment et à l'eau à volonté. Les animaux auront également à disposition des cordelettes à picorer, une marche pour se percher et de la musique relaxante. Ils seront visités deux fois par jour afin de détecter précocement tout problème. Toute manifestation de symptômes comportementaux persistants définis par un point limite (animal prostré plus de 24 heures, couché au sol, ayant cessé de s'alimenter et/ou de s'abreuver et/ou qui ne répond à des stimulus visuels et tactiles) entraînera le retrait de l'animal de l'expérimentation et la mise en place de soins appropriés. Les animaliers ont une formation à l'expérimentation animale et disposent d'une longue pratique de la manipulation

des volailles. La méthode d'inoculation et la dose d'inoculat ont été définies avec un expert d'une agence gouvernementale, ce qui garantit la validité de ce protocole d'inoculation.

Les animaux seront abattus à 49 jours d'âge et puis commercialisés puisque les matières premières et les additifs utilisés sont autorisés en alimentation animale.

18590 Le diabète de type 2 et la dépression constituent des problèmes de santé publique majeurs. Ces 2 pathologies présentent une forte co-morbidité. Cependant les processus physiopathologiques sous-tendant le lien diabète-dépression restent mal connus et sont difficilement étudiables chez l'homme. Le but de ce projet est de déterminer les mécanismes qui expliquent le lien entre le diabète de type 2 et la dépression. Outre les altérations métaboliques, sur le plan physiopathologique, le diabète est associé à des altérations de la sphère gastro-intestinale, ainsi on observe des altérations de la composition du microbiote intestinal (dysbiose) et une augmentation de la perméabilité intestinale chez les sujets diabétiques.

La littérature ainsi que nos données récentes indiquent que le diabète de type 2 est associé à des perturbations de la composition du microbiote intestinal (dysbiose), or une dysbiose intestinale a récemment été associée à des désordres émotionnels en particulier des symptômes dépressifs. Cependant on ne sait pas si la dysbiose intestinale joue un rôle causal dans l'émergence de troubles émotionnels. Une hypothèse récente impliquant le dysfonctionnement de l'axe intestin-cerveau dans l'émergence des troubles émotionnels chez les diabétiques a été proposée. L'objectif de notre étude est d'explorer le rôle du microbiote intestinal dans les altérations émotionnelles (troubles dépressifs et anxieux) associées au diabète de type 2. Nous proposons de travailler sur un modèle de rats diabétiques de type 2 les rats Goto-Kakizaki (GK). Ce modèle offre l'avantage de ne pas être associé à l'obésité ou induit par un régime. Nous avons récemment mis en évidence dans ce modèle des altérations comportementales émotionnelles et des données préliminaires obtenues par nos collaborateurs indiquent que le microbiote intestinal de ces animaux est affecté. Afin de déterminer le rôle causal de la perturbation du microbiote intestinal dans l'émergence d'altérations émotionnelles dans le cadre du diabète de type 2, nous envisageons de tester l'impact de greffes de microbiote intestinal par transfert fécal sur les comportements émotionnels des animaux. Notre hypothèse est que le transfert du microbiote intestinal de rats Goto-Kakizaki à des rats Wistar témoins, devrait induire chez ces derniers des altérations émotionnelles ; en revanche le transfert d'un microbiote de rats Wistar à des rats Goto-Kakizaki devrait réduire leurs altérations émotionnelles. Cette étude pilote permettra de valider le protocole de transfert fécal dans nos conditions expérimentales.

Ce projet utilisera 192 animaux sur 3 ans.

La règle des 3rs sera respectée dans ce projet. L'étude de comportements anxieux-dépressifs ne peut être réalisée que sur animaux vivants ce qui rend impossible le remplacement de ceux-ci par des modèles in vitro. Le modèle animal de diabète de type 2 utilisé est décrit comme l'un des plus pertinents dans la littérature. Toutes les précautions possibles (manipulation régulière des animaux pour habituation;) seront prises afin de raffiner nos procédures et réduire au mieux le stress des animaux. Les animaux sont manipulés très régulièrement et examinés avec soin, nous notons dès qu'un animal a un comportement anormal (agitation lors de la manipulation, cri lors de la manipulation). Si un animal semble stressé (cris ou agitation lors de 2 pesées successives) ; il est manipulé un peu plus longtemps pour aboutir à un comportement apaisé, et une habituation permettant de bonnes conditions à la réalisation d'études comportementales. Nos procédures ne sont pas invasives : principalement des tests comportementaux. Les rats sont élevés en cages collectives dès le sevrage, il y a un enrichissement des cages d'hébergement : tubes, matériel de nid, bâtons à ronger. Dès qu'une diminution de poids corporel même minime est observée, l'animal est suivi avec le plus grand soin. Le nombre d'animaux (n=12 par groupes) sera utilisé est le minimum pour réaliser des tests statistiques en comportement et pour des études de microbiote intestinal.

18591 L'obésité est une maladie chronique que consiste à un excès de masse grasse et à une modification du tissu adipeux. Cette modification entraîne des conséquences à niveau métabolique, vasculaire et cardiaque et à une réduction de l'espérance de vie. Le développement et la progression de

l'obésité sont dues à différents facteurs, tel que l'alimentation, la prédisposition génétique et aussi à facteurs environnementaux.

L'adiponectine est une hormone produite par le tissu adipeux impliqué dans la régulation du métabolisme des lipides et du glucose. Son taux est inversement proportionnel aux quantités de graisse dans l'organisme : chez les personnes obèses, le taux d'adiponectine est plus faible. Cette hormone est aussi impliquée dans la survenue d'insulinorésistance observée chez les diabétiques. Comprendre les mécanismes biologiques qui conduisent à l'obésité est une question de plus en plus importante.

Nous nous intéressons aux vésicules extracellulaires (VEs) libérées par les cellules de l'organisme. Ces VEs sont considérées comme de nouveaux biomarqueurs de différentes pathologies et des vecteurs de communication intercellulaire. Des travaux préalablement réalisés au sein de notre équipe ont démontré que les VEs circulantes de sujets sains et des patients obèses sont significativement augmentés avec l'index de masse corporelle, soutenant le rôle des VE en tant que relais métaboliques dans l'obésité. En plus nous avons démontré que les VEs circulantes de ces patients transportent l'adiponectine.

L'objectif de cette étude est d'évaluer la contribution des VEs et de l'adiponectine portée par les VEs dans l'obésité et ses complications cardiovasculaires et métaboliques chez la souris.

Dans la première partie du projet nous allons induire l'obésité et les modifications vasculaires, cardiaque et métaboliques associées afin d'obtenir des VEs circulantes et dérivée du tissu adipeux. Nous utiliserons des souris C57bl/6J et des souris déficientes en adiponectine (ADPN KO) soumises à une régime alimentaire standard (SD) ou riche en graisse (HFD). Nous allons aussi utiliser des souris déficientes dans le récepteur à la leptine (Ob/Ob), qui développent spontanément l'obésité. Parmi les différents modèles disponibles à ce jour, ces modèles apparaissent comme étant le plus pertinents.

Dans la deuxième partie du projet nous allons évaluer les effets des VEs circulantes et dérivées du tissu adipeux des souris non-obèses et obèses sur les modifications vasculaires, cardiaque et métaboliques.

Nous étudierons in vivo les effets des VEs sur des souris C57bl/6J et ADPN KO nourries avec un régime standard et un régime riche en graisse (hypercholestérolémique) et Ob/Ob développant l'obésité.

Ainsi, les VEs seront administrées par injection à des souris obèses et non obèses. On déterminera les effets des VEs sur le poids, la tolérance au glucose et à l'insuline, la pression artérielle et la fonction cardiaque ainsi que sur la mesure de paramètres métaboliques (glycémie, cholestérolémie, triglycéridémie, insulinémie) à partir de plasma des animaux traités. Enfin, une étude immunochimique et histomorphologique de différents tissus et organes (tissus adipeux, foie, muscle, cœur, aorte) prélevés sur animaux euthanasiés complètera cette analyse métabolique.

Tout au long de l'étude, nous veillerons à respecter la règle des 3R. Cette étude a un caractère de stricte nécessité et ne peut pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information. Ainsi, le nombre d'animaux à utiliser a été restreint à son minimum sans compromettre les objectifs du projet et l'interprétation statistique des résultats. Quatre cent cinquante (450) souris C57bl/6J (dont 360 non-obèse et 90 obèses) ; 270 souris ADPN KO (dont 150 non-obèse et 120 obèses) et 90 souris Ob/Ob, soient 810 animaux au total seront utilisées.

Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux. De plus, pendant les différentes procédures expérimentales, le recours aux anesthésiants, analgésique, antiinflammatoire, au renforcement positif (l'entraînement à la coopération) ainsi que l'utilisation de tapis et lampe chauffants sera primordiale pour soulager l'inconfort, la douleur et la détresse des animaux.

Les animaux seront surveillés quotidiennement en termes d'aspect, de prise alimentaire et de vitalité. Une grille présentant les points limites (Annexe) sera utilisée pour déterminer la conduite à tenir.

Une telle étude nous permettra de mieux comprendre la contribution des VEs et de l'adiponectine dans pathogénèse et la progression de l'obésité et ses complications.

18592 Les candidoses profondes sont la quatrième cause d'infection nosocomiale. Elles concernent principalement des patients atteints de pathologies engendrant une immunodépression soit par elles-mêmes soit due à leurs traitements.

Le taux de mortalité reste élevé même avec une prise en charge thérapeutique adaptée. De plus, des résistances aux traitements actuels sont décrites. Il est donc nécessaire de développer d'une part de nouveaux traitements mais aussi de mieux comprendre les mécanismes de défenses immunitaire mis en jeu par le patient pour lutter contre ces infections fongiques.

Cette procédure vise donc à évaluer dans un modèle murin l'efficacité de nouveaux composés pour le traitement des candidoses invasives. Elle nécessite l'utilisation d'au maximum 900 animaux sur une période de 3 ans. Ce nombre d'animaux est prévisionnel et il est soumis à un fort risque de variations en fonction des résultats obtenus préalablement mais aussi du nombre de molécules expérimentales ayant passé les criblages in vitro, sur *Galleria mellonella* et de cytotoxicité. Il est donc basé et extrapolé du nombre d'expérimentations faites ces dernières années.

Les souris sont hébergées en groupe, dans un environnement enrichi.

Les protocoles expérimentaux ont été établis de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés en choisissant d'évaluer uniquement les nouveaux antifongiques ayant fait la preuve de leur activité in vitro. Le suivi de l'évolution de la maladie par la recherche dans le sang des champignons ainsi que l'évaluation de la charge fongique dans les organes cibles permettent d'améliorer la qualité de l'étude de l'activité antifongique et donc de raffiner nos procédures. Il n'existe pas, à notre connaissance, d'autres méthodes d'évaluation de l'activité antifongique pour le traitement de candidose que l'étude sur des animaux rendant actuellement leur remplacement impossible.

Le nombre d'animaux a été calculé pour obtenir une puissance du test >80% au risque alpha de 5%.

Les données quantitatives seront analysées par comparaison des moyennes de charge fongiques au niveau des organes prélevés (test de Student ou Man-Whitney ou Anova).

La survie des animaux est évaluée selon la méthode des Log-rank modifiée par Kaplan-Meier.

La durée maximale du traitement est de 5 jours.

La souffrance animale est évaluée au cours du suivi quotidien de l'évolution clinique des animaux. Tout animal manifestant un "score de points critiques" dépassant le seuil défini est euthanasié.

Un "score de points critiques" a aussi été défini pour déclencher l'administration d'analgésique (buprénorphine).

18593 L'hématopoïèse désigne le processus physiologique de production des cellules sanguines à partir de cellules souches hématopoïétiques dont les mécanismes restent encore mal caractérisés tout spécialement dans l'espèce humaine. Dernièrement il a été démontré l'existence de deux voies de production indépendante du compartiment cellulaire à l'origine des lymphocytes (cellules jouant un rôle dans la réponse immunitaire).

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

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

En accord avec la règle des 3R, nous avons réalisé le maximum d'expériences in vitro (modèle de différenciation en présence de facteurs de croissance et de cellules support). Néanmoins, le développement du système hématopoïétique est un processus dynamique complexe qui ne peut pas être reproduit parfaitement in vitro. Il est donc indispensable de générer les différentes populations d'intérêt dans un organisme entier. Compte tenu de l'impossibilité de remplacer complètement les expériences in vivo, nous avons réduit le nombre de souris utilisés au minimum nécessaire et suffisant pour satisfaire la validité scientifique de l'étude, en particulier au niveau de l'analyse statistique. Ce projet nécessitera donc l'utilisation de 600 souris sur 4 ans. Afin de veiller au bien-être des souris au cours de l'expérimentation, une surveillance quotidienne sera effectuée (apparence, comportement). Dans le cas du modèle de leucémie expérimentale humaine, une attention particulière sera apportée aux souris en complétant la surveillance quotidienne par une pesée hebdomadaire et un suivi des cellules tumorales dans le sang. Les souris présentant une souffrance et/ou une douleur définies par des modifications des paramètres étudiés seront euthanasiées selon la méthode réglementaire. Le suivi des souris en expérimentation se fera sur une période maximale de 15 semaines, à l'issue de laquelle tous les animaux seront euthanasiés.

18594 Ce projet décrit les essais de recherche d'agents étrangers sur animaux réalisés selon les exigences réglementaires. Ces essais ont pour objectif la recherche d'éventuelles contaminations des cultures cellulaires utilisées dans la fabrication de vaccins destinés à l'homme. Ces tests consistent à administrer un produit (lot de semence virale ou banque cellulaire) à des animaux et à vérifier l'absence de signes cliniques liés à une contamination du produit par des micro-organismes. Ce projet représente l'ensemble des essais menés sur chaque lot de semence virale ou culture cellulaire employés dans la fabrication de vaccins commercialisés ou en développement.

Les espèces employées pour ces tests sont la souris et le cobaye, chacune s'avérant plus particulièrement sensible à certains microorganismes.

Aucune réaction liée au produit injecté n'est attendue dans ces tests. Les voies d'injections, sont définies par les textes réglementaires européens et internationaux.

Dans le cas où les animaux présenteraient une dégradation de l'état général, des lésions ou des symptômes nécessitant l'euthanasie, celle-ci sera effectuée selon une méthode recommandée. La prise en charge d'un animal ayant des signes cliniques de maladie est réalisée sous la responsabilité d'un vétérinaire.

Ce projet nécessite l'utilisation d'un maximum de 3 100 souris et 170 cobayes sur une période de 5 ans.

Les résultats attendus de ce projet sont de contribuer à la libération de lots de produits fiables et conformes aux spécifications et aux textes de référence en vigueur.

Suite à l'atteinte du point limite ou en fin de test, la majorité des animaux est euthanasiée selon les méthodes recommandées réglementairement, par le Comité de Protection Animale. En l'absence de signes cliniques, des animaux peuvent être réutilisés pour des besoins de formation dans le respect des exigences réglementaires.

Mise en œuvre des 3R :

Remplacement :

A ce jour, le recours à l'animal est encore exigé par les réglementations des pays de destination. Les évolutions réglementaires tendant à les supprimer ou les remplacer par des tests in vitro.

Réduction :

Le nombre d'animaux utilisés est calculé au plus juste de façon à répondre aux exigences réglementaires et aux besoins de tests sur la période.

Le nombre d'animaux par groupe est défini par la réglementation ou par une étude statistique. Il ne peut être pas réduit en deçà.

Raffinement :

Les animaux sont hébergés en groupe dans des cages contenant des enrichissements dans des locaux appropriés et conformes aux standards réglementaires (ETS 123), et suivis par un personnel spécifiquement formé.

En cas de signes cliniques, dans les meilleurs délais, les animaux bénéficient des soins vétérinaires ou sont euthanasiés selon les méthodes recommandées

18595 En cancérologie, l'une des approches thérapeutiques actuellement utilisées est basée sur l'utilisation de globules blancs du patient, modifiés pour se retourner contre un marqueur de la tumeur à traiter. Cette méthode d'immunocytothérapie utilise le système CAR (chimeric antigen receptor, ou récepteur antigénique chimérique) et des lymphocytes T du patient modifiés ex vivo, appelés CAR-T. L'idée d'appliquer cette technique thérapeutique à d'autres contextes pathologiques dans lesquels un marqueur spécifique d'une cible à détruire (antigène) est exprimé, a émergé, notamment dans le domaine de la fibrose myocardique. Dans ce contexte, une protéine spécifiquement exprimée par les cellules responsables du développement de la fibrose a été identifiée et pourrait constituer une cible pour des cellules CAR-T dirigées contre ce marqueur.

Des essais très encourageants ont été menés dans des modèles murins de fibrose myocardique. Une maladie humaine dans laquelle cette approche pourrait être très intéressante est la myopathie de Duchenne. Dans cette maladie, qui touche à la fois les muscles et le cœur, une fibrose progressive s'installe et contribue à la dégradation clinique des patients. Le modèle animal qui se rapproche le plus fidèlement de la maladie humaine est le chien atteint par cette même maladie, due à une mutation dans le gène de la dystrophine. Notamment, et contrairement au modèle murin mdx, les chiens développent une fibrose dans leurs muscles et leur cœur, et représentent donc un modèle particulièrement pertinent pour évaluer l'efficacité de ces CAR-T anti fibrose. Néanmoins, avant de démarrer une étude d'efficacité dans ce modèle, il est nécessaire de vérifier la faisabilité du prélèvement de lymphocytes par aphérèse (méthode de tri des cellules du sang, comme pour un don de plaquettes) chez le chien, de leur modification ex vivo, d'évaluer la tolérance des chiens à l'injection de CAR-T ainsi que la dose optimale et la fréquence nécessaire d'injections. Ce projet constitue donc une étude préliminaire, préparatoire de l'étude thérapeutique proprement dite. Ce projet inclura deux chiens, qui subiront une aphérèse, puis quatre injections à dose croissante de CAR-T pour l'un, et des injections répétées sur une durée maximale de 3 semaines pour l'autre. Un suivi clinique et fonctionnel musculaire étroit sera effectué, ainsi que des prélèvements sanguins réguliers et de l'imagerie cardiaque et musculaire, afin d'évaluer la tolérance de ces animaux à l'injection de CAR-T et un éventuel effet sur le tissu cible (muscle). Nous serons attentifs au principal risque de cette injection, celui d'un orage cytokinique, qui peut survenir chez les patients humains après une injection de CAR-T. Dans le cas où ce syndrome se manifesterait chez nos animaux, nous leur administrerions une thérapeutique anti-inflammatoire adaptée.

Remplacement: cette stratégie thérapeutique a été validée sur des modèles in vitro, puis dans des modèles rongeurs. La faisabilité de l'aphérèse, de la production de CAR-T, de la tolérance à l'injection de CAR-T et de la dose optimale dans l'espèce canine sont autant de questions qui ne peuvent être posées in vitro et nécessitent de l'être dans l'espèce cible.

Réduction : nous avons limité le nombre d'animaux à deux, ce qui nous semble le nombre minimal afin de pouvoir valider la procédure. Nous ne ferons pas d'analyse statistique sur ces animaux donc nous n'avons pas besoin de davantage d'individus.

Raffinement: la procédure d'aphérese sera réalisée sous anesthésie générale car elle dure deux-trois heures et serait stressante sur animal vigile, de même que les examens IRM et les mesures de force. La procédure d'aphérese sera pilotée par un hématologue expert de l'aphérese pédiatrique. Un suivi vétérinaire quotidien sera assuré tout au long de la procédure. En cas de survenue de complications de type orage cytokinique, la thérapeutique adaptée sera mise en place. Les deux chiens seront hébergés ensemble, auront à leur disposition des jouets, des plateformes, un lieu de couchage (corbeille + tapis). Ils bénéficieront d'interactions quotidiennes avec leurs soigneurs (caresses, jeux), et d'une sortie quotidienne dans des espaces de jeux intérieur et extérieur aménagés.

18596 L'arthrose est la principale cause de morbidité dans les pays développés, altérant considérablement la qualité de vie des patients humains. Chez le cheval, elle représente la principale cause de boiterie et la première cause de baisse de performance ou d'arrêt de carrière des chevaux de course et de sport. Ainsi, les affections articulaires ont un impact social et économique majeur dans ces deux espèces.

Le projet OA-ACTIVE est un projet de recherche translationnelle avec le cheval comme patient et modèle pour l'application ciblée, qui vise à développer une formulation thérapeutique en injection intra-articulaire qui favorise la régénération du cartilage, qui prévient sa dégradation tout en jugulant les mécanismes inflammatoires et douloureux de l'arthrose, afin de répondre aux besoins cliniques insatisfaits dans le traitement de cette maladie. Deux solutions thérapeutiques intra-articulaires seront développées et évaluées: (1) une stratégie de type visco-supplémentation avec un gel biologiquement actif et (2) le secrétome de cellules souches (CS) adultes. En fonction des résultats obtenus dans ce projet, ces 2 voies thérapeutiques pourraient être combinées dans le futur pour potentialiser leur efficacité.

Les études seront conduites d'abord à l'échelle des cellules du cartilage (sur culture cellulaire), puis du tissu cartilagineux (en utilisant des organoïdes de tissus cartilagineux sains et arthrosiques) pour une première évaluation standardisée de la tolérance et de l'efficacité de cette thérapie (incluant l'étude des effets-doses), et enfin à l'échelle de l'organisme à travers deux études de tolérance sur deux lots de 8 chevaux expérimentaux, soit un total de 16 chevaux. Chaque cheval recevra, en aveugle et aléatoirement avec une randomisation sur les 2 boulets antérieurs (articulations métacarpo-phalangiennes) :

- une injection intra-articulaire du candidat thérapeutique sur l'un des boulets (à 1X la dose efficace, déterminée d'après les études in vitro),
- une injection intra-articulaire d'un même volume de placebo sur le boulet controlatéral, comme témoin négatif.

Chaque cheval recevra en plus une injection d'un même volume d'un témoin positif, sur un boulet postérieur (articulation métatarso-phalangienne). Conformément aux recommandations de l'Agence Européenne du Médicament (EMA), les injections sur les deux boulets antérieurs seront renouvelées 2 fois à 7 jours d'intervalle (J7 et J14), puis une quatrième injection sera réalisée à 3X la dose efficace, 28 jours après le début du protocole (J28). L'évaluation de la tolérance sera effectuée sur la base de critères cliniques, par imagerie (examen échographique du liquide synovial articulaire) et biochimiques du liquide synovial. Aucun examen post-mortem n'étant réalisé, les chevaux sont gardés en vie en fin de protocole et placés comme chevaux de loisir. Cette étude est nécessaire à la poursuite des travaux, vers une étude clinique sur cas spontanés, afin de permettre à terme le développement industriel de la formulation thérapeutique retenue en santé équine.

Ainsi, conformément aux grands principes d'éthique en expérimentation animale :

- des mesures de Remplacement ont été adoptées dans ce programme à travers la réalisation d'études de tolérance et d'efficacité préliminaires sur des modèles in vitro et ex vivo (sur organoïdes);
- des mesures de Réduction ont été utilisées dans les 2 études de tolérance en utilisant 3 articulations d'un même cheval plutôt qu'en injectant 1 articulation par cheval, ce qui a permis de réduire par 3 le nombre d'animaux impliqués ;

- des mesures de Raffinement sont utilisées pour les études de tolérance avec des procédures limitant au maximum le stress et la douleur des chevaux impliqués dans l'étude. Les chevaux expérimentaux seront ainsi hébergés le plus possible en groupe dans leur environnement naturel (paddock avec abris) pour limiter le stress. Ils ne seront hébergés en box (3x4m) que les 3 jours suivants les injections intra-articulaires. Les actes pratiqués sont tous individuellement de classe légère, mais néanmoins pour limiter la douleur et le stress lié à leur répétition, les chevaux seront tranquilisés avec une molécule ayant également une action contre la douleur, le temps de leur réalisation. De plus, si un cheval développait des signes d'inconfort, le protocole autorise l'administration d'anti-inflammatoires par voie générale. Dans ce projet, il n'y a aucun dommage escompté pour les chevaux expérimentaux.

18597 L'ischémie myocardique est à l'heure actuelle une des principales causes de décès dans le monde. L'ischémie survient lorsque le myocarde ne reçoit plus l'oxygène dont il a besoin par l'apport sanguin. L'agression tissulaire hypoxique qui en résulte peut avoir des conséquences dramatiques et laisser des séquelles indélébiles. Lorsque la perfusion est restaurée et l'oxygénation tissulaire à nouveau possible, on observe alors une forte réaction inflammatoire associée à une production élevée des radicaux oxygénés qui ont un effet néfaste sur les cellules cardiaques. Cet effet paradoxal et indésirable de la restauration de la perfusion constitue le syndrome de reperfusion. La dénomination "Ischémie-Reperfusion" rappelle que les dégâts tissulaires liés à une interruption ou une réduction du flux sanguin, sont le résultat de deux phénomènes : l'effet de l'hypoxie-ischémie et l'effet de la reperfusion-réoxygénation.

A l'heure actuelle il existe très peu d'options thérapeutiques pour réduire ces lésions de reperfusion. Une de ces options est basée sur l'administration de l'adénosine. En essai clinique, l'adénosine a montré un fort effet cardioprotecteur. Cet effet bénéfique était obtenu après l'administration des doses élevées d'adénosine, car celle-ci est rapidement métabolisée dans l'organisme (quelques secondes). Les doses élevées ont induit également des effets secondaires indésirables aboutissant à l'arrêt des essais cliniques. Également testés en essais cliniques, les antioxydants (AO), molécules qui protègent contre l'action délétère des radicaux oxygénés, ont montré des résultats mitigés, dus à une faible pénétration cellulaire mais également à une faible stabilité et une durée de vie très courte dans la circulation sanguine. Des immunomodulateurs, tels que la ciclosporine A (CsA), ont montré aussi des effets limités, liés à une bio-distribution aléatoire dans le corps.

Compte tenu du fort potentiel thérapeutique de ces molécules, nous avons développé de nouvelles formulations de nanoparticules à base de squalène (SQ), qui est un lipide naturellement présent chez l'Homme, pour pallier les insuffisances des molécules libres. Le couplage du principe actif au squalène permet d'une part la protection du médicament d'une dégradation précoce dans la circulation sanguine et d'autre part une meilleure pénétration dans les cellules.

Il a été précédemment démontré que les nanoparticules de squalène couplé à l'adénosine (SQ-Ade) induisaient un fort effet neuroprotecteur chez la souris avec une ischémie cérébrale et un effet cardioprotecteur dans un modèle d'ischémie-reperfusion chez la souris.

Des études préliminaires *in vitro*, ont également montré un fort effet cardioprotecteur de nanoparticules de squalène-Ciclosporine A (SQ-CsA) sur une lignée de cellules cardiaques de rat soumis à une hypoxie/oxygénation expérimentale.

Nous souhaitons maintenant associer plusieurs thérapies dans un même nanomédicament pour améliorer l'effet cardioprotecteur en ciblant les différentes phases de la réponse inflammatoire. Le projet actuel vise à évaluer les nanoparticules de SQ-Ade couplées à un antioxydant ou à une molécule immunomodulatrice comme la CsA, dans un modèle d'ischémie/reperfusion myocardique chez le rat.

Nous avons réalisé les premières validations *in vitro*, sur des lignées cellulaires murines, où nous avons pu mettre en évidence l'absence de toxicité de nos nanomédicaments multi-drogues. Cette étape nous a également permis de choisir les meilleures nanoformulations (quantité de principe actif c'est-à-dire d'adénosine, AO, CsA) à administrer dans le modèle *in vivo*.

Les lésions d'ischémie/reperfusion myocardique sont associées à une forte réaction inflammatoire. Toutes ces modifications ont des répercussions sur le cœur entier non seulement au niveau structural mais également au niveau physiologique (cycle cardiaque, contractions des cellules cardiaques). Les études in vivo nous permettent d'évaluer un effet dans le temps au niveau de l'organe entier mais également de tenir compte de la réponse immunitaire. C'est pourquoi le recours à un modèle animal est incontournable.

La procédure expérimentale consistera en une ligature de l'artère coronaire gauche, suivi d'une reperfusion. Elle prendra en compte les principes de raffinement et de réduction. Raffinement car elle sera réalisée sous anesthésie générale par un personnel expérimenté et un traitement analgésique sera mis en place les jours suivant la chirurgie pour traiter la douleur. De plus, l'évaluation de l'effet cardioprotecteur sera réalisée de manière non invasive par mesure de la fonction cardiaque par échographie. Réduction car le dimensionnement des groupes expérimentaux a été réalisé à l'aide d'un logiciel permettant une planification statistique minutieuse qui permettra l'utilisation d'un nombre minimum d'animaux tout en préservant la validité statistique de l'étude. Ainsi, pour l'ensemble de cette étude 456 rats seront nécessaires sur une durée de 5 ans.

Le bien-être des animaux sera également pris en compte. Les animaux seront hébergés en groupes dans un environnement enrichi sauf dans les 24h suivant la chirurgie pour limiter les interactions entre les individus.

18598 Dans les pays industrialisés, le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) affecte 10% des patients admis en réanimation médicale, avec un taux de mortalité atteignant 30% à 50%. Ce syndrome est une forme grave d'insuffisance respiratoire aiguë, associée à une inflammation épithéliale sévère et un œdème pulmonaire (eau dans les poumons). Il conduit à une réduction de la fonction pulmonaire et à une déficience des échanges gazeux. Le traitement actuel repose sur l'assistance ventilatoire des patients avec de faibles volumes inspiratoires pour limiter l'étirement des alvéoles. Néanmoins, cette assistance mécanique peut devenir délétère en cas de SDRA sévère. Afin d'améliorer cette prise en charge, nous proposons d'étudier une stratégie ventilatoire innovante, la ventilation liquide totale. Cette approche thérapeutique nécessite un ventilateur spécifique permettant l'inhalation d'un liquide dédié à cet usage. Cette technologie permet des échanges gazeux par oxygénation et retrait du CO₂ du sang et ce en délivrant de faibles volumes inspiratoires, en faisant disparaître l'interface air-liquide et en recrutant les zones lésées du poumon à basse pression.

Dans cette étude, notre objectif est donc d'évaluer l'efficacité de la ventilation liquide par rapport à une ventilation mécanique conventionnelle. Nous utiliserons un modèle de SDRA chez le porc avec une évaluation de la fonction pulmonaire. Les animaux seront anesthésiés tout au long de la procédure, avec en plus une administration d'antalgique. Ils démontreront une perturbation des échanges pulmonaires gazeux, caractéristiques du SDRA.

Compte tenu de la complexité de l'affection considérée et du caractère intégratif des critères étudiés, cette étude ne peut pas être mimée in vitro (absence de Remplacement possible). Le nombre d'animaux inclus sera réduit autant que possible, avec un total de 105 animaux. L'ensemble des expériences sera réalisé à l'état anesthésié avec une administration d'antalgique, pour prévenir toute souffrance de l'animal (Raffinement). Avant les expériences, les animaux seront hébergés dans des boxes avec des copeaux de sciure au sol (pas de caillebotis, enrichissement avec des jouets en plastique). Ce travail se justifie par des applications potentielles chez l'homme en cas de bénéfice pré-clinique.

18599 Le stress chronique a des conséquences néfastes sur les capacités cognitives des individus et joue un rôle de facteur déclenchant ou aggravant dans de nombreuses pathologies neuropsychiatriques comme la dépression et neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer. Ce projet a pour but d'évaluer l'implication d'un système neuromodulateur, le système nociceptine, dans les effets négatifs du stress chronique sur la mémoire et sur les phénomènes de plasticité neuronale associés chez la souris. Le rôle de la nociceptine endogène libérée suite au stress sera évalué par des approches pharmacologiques (bloqueurs du récepteur NOP de la nociceptine) et génétiques

(blocage de l'expression du récepteur). Nous utiliserons deux modèles de stress chronique connus pour entraîner des déficits de mémoire chez la souris: 1) un modèle lié à la dépression basé sur l'administration chronique de corticostérone (CORT) per os, et 2) un modèle de stress de contention répétée. La mémoire sera évaluée dans les tests de reconnaissance d'objet et du labyrinthe aquatique de Morris. De plus nous nous attacherons à corrélérer les données comportementales à d'éventuels effets neuroprotecteurs induits par l'inhibition du système nociceptine (évaluation de la production de nouveaux neurones chez l'adulte, ainsi que de la structure des neurones). La réalisation de ce projet pré-clinique pourra permettre d'identifier une nouvelle cible pharmacologique pour traiter les troubles cognitifs liés au stress chronique.

L'objectif du projet étant l'étude de comportements complexes, l'apprentissage et la mémoire, il est indispensable de travailler sur un modèle animal. Il s'agit de valider une stratégie thérapeutique dans un modèle pré-clinique. La réalisation de ce projet nécessitera au maximum l'utilisation de 536 animaux sur une période de 5 ans afin de tester différentes stratégies de blocage des récepteurs NOP et d'effectuer l'ensemble des contrôles permettant de garantir la validité des résultats. Le nombre de groupes expérimentaux a été défini de façon à limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés. Cependant il est important, afin d'assurer la validité des conclusions de l'étude, d'avoir des contrôles négatifs (souris non exposées à la corticostérone ou au stress). Dans l'objectif de diminuer le nombre d'animaux, ceux-ci pourront être soumis à plusieurs tests comportementaux, en veillant toutefois à ce que l'accumulation des tests ne constitue pas une source supplémentaire de stress. Le nombre choisi de souris par groupe représente l'effectif minimal nécessaire pour obtenir une puissance statistique suffisante pour les comparaisons de plusieurs groupes (ANOVA à 2 facteurs) dans les tests comportementaux ou les analyses post-mortem. Tous les animaux sont hébergés selon les normes d'éthique en vigueur et disposent d'enrichissement lors de la stabulation. Afin d'assurer un suivi optimal du bien être animal, notamment ceux subissant une chirurgie, une surveillance jusqu'au réveil puis quotidiennement sera effectuée de manière à identifier d'éventuels signes d'infection ou de douleur (hyperactivité puis isolement et indifférence par rapport au milieu extérieur, diminution du comportement exploratoire, attitude prostrée avec dos voûté, expression faciale modifiée, fuite ou défense à la manipulation, vocalises). Les animaux présentant de tels symptômes seront mis à mort.

18600 La pollution est un facteur de risque important pour la santé humaine. Cependant son impact global sur l'organisme ainsi que les mécanismes moléculaires mis en jeu ne sont pas encore bien connus. Nous avons démontré au laboratoire que la dioxine, un polluant organique persistant, omniprésent et hautement toxique, avait un impact à court et long terme sur les cellules souches du muscle squelettique : les cellules satellites. Nous avons également montré qu'il existe une différence de réponse face à la pollution au sein des sous populations de cellules souches du muscle. Une partie d'entre elles semblent résistantes à la pollution et présentent un mécanisme de résistance unique. Il existe une sous population de cellules satellites qui résiste au stress induit par la pollution tandis que la majorité des cellules satellites y sont sensibles. Ceci interroge désormais sur le rôle respectif de ces deux sous-populations quant à la réparation du muscle squelettique dans un contexte de pollution. Sur la base de ces résultats, nous proposons ici de décrypter les réponses cellulaires et moléculaires déployées par ces deux sous-populations au cours de la régénération musculaire après une exposition à la pollution utilisant deux modélisations complémentaires.

La première modélisation utilise une molécule, la dioxine, qui est un polluant environnemental émis dans l'atmosphère par combustion incomplète de composants organiques issus d'événements naturels et de l'activité humaine. En raison de sa grande stabilité, ce polluant est omniprésent dans notre environnement conduisant à une contamination de notre chaîne alimentaire entraînant l'accumulation de ces composés principalement dans le tissu adipeux, le foie et le muscle squelettique. L'autre modélisation consiste en une modélisation de la pollution atmosphérique qui résulte de l'extrême complexité du mélange physico-chimique qui s'y opère. Nous disposons d'un système unique permettant de soumettre des animaux à des atmosphères polluées complexes. Ce système permet d'aborder de manière pertinente et réaliste la problématique des effets de ces pollutions sur la santé. Les souris seront exposées aux différents atmosphères, filtrée ou polluée,

pendant 10 jours continus à l'âge adulte. Elles seront hébergées dans des cages ventilées et placées dans une armoire de stabulation couplée à la chambre de simulation atmosphérique sans modification de leur environnement proche.

Alerter sur les effets de la pollution dans un système biologique tel que le système musculo-squelettique permet de comprendre quel stress cellulaire peut engendrer la pollution. Il est important de comprendre la réparation du muscle en réponse à la pollution pour développer à plus long terme des approches innovantes de prévention et de thérapie cellulaire basées sur la modulation de la résistance au stress environnemental contre les myopathies.

Les principales approches mises en œuvre dans notre laboratoire pour répondre à cette question englobent un large éventail de techniques de biologie, d'imagerie et d'utilisation de modèles murins génétiquement modifiés pour lesquels nous induisons une lésion musculaire localisée. Dans notre étude, nous utiliserons des modèles murins qui subiront, préalablement à leur blessure musculaire, soit une exposition à la dioxine soit une exposition à une atmosphère polluée contrôlée. Nous pourrions ainsi étudier l'impact du stress environnemental sur les cellules souches musculaires notamment au cours du processus de réparation post-lésionnelle. Tout au long de cette étude, nous respecterons la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). Nous limiterons ainsi le projet aux seules expériences indispensables, tout en tenant compte des contraintes liées à l'utilisation de l'enceinte d'exposition. Afin de limiter le stress et la douleur, toutes les interventions sur animaux seront pratiquées sous anesthésie générale et sous analgésie. Les modèles d'exposition à la pollution et de lésion musculaire sont parfaitement maîtrisés au laboratoire et effectués par un personnel qualifié. Le bien-être des animaux sera vérifié de façon quotidienne, leur milieu sera enrichi à l'aide de maisonnette jetable en cellulose, de petits carrés de coton ainsi que des bandes étroites de calage découpés en accordéon. Si cela est nécessaire, nous faciliterons l'accès à l'eau en mettant un hydrogel et des coquettes directement dans la cage. Les animaux seront acclimatés une semaine avant d'être utilisés et lorsque cela sera possible les procédures utiliseront les mêmes animaux. Afin de limiter leur nombre, aussi bien les femelles que les mâles seront utilisés selon le type de procédure considérée.

Notre étude utilisera un total de 1200 souris (600 mâles et 600 femelles) réparties sur 5 procédures expérimentales.

18601 L'insuffisance cardiaque est une maladie fréquente, chronique, et fortement invalidante. Elle expose les millions de patients atteints à une limitation de la vie quotidienne et à des ré-hospitalisations fréquentes. En dehors de l'infarctus du myocarde, l'insuffisance cardiaque peut aussi se développer dans le cadre du vieillissement souvent associé à l'hypertension artérielle. Cette forme d'insuffisance cardiaque est caractérisée par une croissance du muscle cardiaque (dite hypertrophie) qui devient plus rigide et plus fibreux. Les traitements actuels luttent contre les symptômes de l'insuffisance cardiaque mais il n'existe pas de traitement permettant d'améliorer directement la constitution du muscle cardiaque, en limitant notamment le développement de la fibrose cardiaque.

Ce projet cherche à mieux comprendre les mécanismes contribuant au développement de la fibrose cardiaque aux dépens du muscle cardiaque et ainsi à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques afin d'éviter ou de retarder les complications cardiaques liées à la fibrose cardiaque et donc le développement de l'insuffisance cardiaque dans le contexte de l'hypertrophie cardiaque.

Ce projet ayant pour but d'étudier des phénomènes cardiaques pathologiques et de tester de nouveaux principes thérapeutiques, les méthodes alternatives actuelles sont insuffisantes. Les modèles cellulaires ne peuvent refléter la complexité de la pathologie humaine. Les modèles chez la souris restent donc les meilleurs pour étudier ces processus.

La souris est un modèle de choix pour l'étude de l'hypertrophie du myocarde et de sa transition vers l'insuffisance cardiaque. En réponse à une augmentation du niveau de pression artérielle, le cœur de la souris développe en effet des modifications de sa structure et de son contenu qui sont très proches de celles observées chez l'homme. Il existe notamment une croissance de la masse musculaire associée à un développement de la fibrose cardiaque, mécanisme étudié dans ce projet.

De plus, la fonction cardiaque peut être mesurée par des techniques d'imagerie non-invasives qui permettent de bien caractériser le développement de la fibrose cardiaque.

Le nombre total de souris nécessaires à la réalisation de ce projet est de 630 pour une durée de 4 ans. Les différentes procédures expérimentales ont été consciencieusement pensées et définies afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en nous permettant d'obtenir des résultats statistiquement exploitables. La taille des échantillons permettant une analyse statistique efficace des résultats a été calculée grâce aux données collectées au cours d'expériences précédentes.

Ce projet met en jeu des procédures chirurgicales, l'administration de nouveaux traitements à action anti-fibrosante, et une évaluation de la fonction et de la structure cardiaque à l'aide d'examen d'imagerie.

Pour éviter toute souffrance, toutes les procédures de chirurgie sont réalisées sous anesthésie générale. Des traitements antalgiques sont utilisés afin de réduire au maximum la souffrance animale. Une grille d'évaluation des points limites est mise en place et utilisée pour activer les mesures d'accompagnement améliorant le bien-être de l'animal. Tout signe de douleur, de souffrance, d'angoisse ou de stress chez les animaux sera soulagé avec des analgésiques.

A terme, les résultats de ce projet permettront d'identifier une nouvelle cible thérapeutique limitant le développement de la fibrose cardiaque. Ces résultats pourraient conduire au développement de nouveaux traitements adaptés pour des millions de patients souffrant d'insuffisance cardiaque, notamment les patients les plus âgés.

18602 Plusieurs études ont montré que l'approvisionnement en cholestérol de la cellule tumorale représente un point clé dans la progression et la dissémination de la tumeur primaire. Ainsi, cibler les voies d'entrée du cholestérol dans la cellule constitue une piste thérapeutique d'intérêt. Nous souhaitons pour ce projet étudier le rôle du récepteur SRB1 capable de lier et de faire entrer du HDL-cholestérol dans la cellule dans le processus de dissémination des cellules de carcinomes prostatiques. Pour cela, nous souhaitons utiliser un modèle de greffes orthotopiques intraprostatiques maîtrisé dans notre laboratoire pour évaluer le potentiel métastatique de cellules tumorales dont les capacités d'influx de cholestérol auront été modifiées, soit par des approches génétique, soit par des approches pharmacologiques. Le modèle cellulaire utilisé possède un traceur endogène GFP (protéine fluorescente) qui permettra d'évaluer l'étendue de la dissémination des cellules dans les différents tissus. Dans un souci constant de respect de la règle des 3R, REDUIRE : le nombre d'animaux utilisés a été restreint au maximum et définit pour obtenir une puissance statistique satisfaisante à l'issue du protocole, celui-ci a été fixé à 60 individus. RAFFINER : En parallèle, la dissémination de cellules tumorales peut conduire à l'apparition de lésions douloureuse pour l'animal. Un suivi régulier tout au long du protocole sera mis en place pour évaluer l'apparition de signe de douleur et une prise en charge par traitements antalgiques. Les points limites d'expérimentation seront particulièrement adaptés à ce risque. Un enrichissement important de la cage est prévu dans le but d'optimiser le bien-être animal. REMPLACER : cette étude fera suite à des tests réalisés in vitro en culture de cellules ayant permis de caractériser les paramètres d'agressivité des clones CRISPR et l'efficacité des inhibiteurs de SRB1. Grâce à cette approche rationnelle, nous avons ainsi sélectionné les modèles ayant démontrés leur efficacité in vitro, limitant ainsi l'usage du modèle souris.

18603 A l'heure actuelle, les lésions nerveuses périphériques, comme les paralysies du nerf facial, sont sources de handicap. En cas de lésion avec perte de substance trop importante, un traitement par suture directe n'est pas envisageable. Dans ce cas, le gold standard est une autogreffe nerveuse, dont l'inconvénient majeur est une perte de sensibilité dans la région de prélèvement du greffon, sans garantie de récupération fonctionnelle et motrice totale pour le patient dans la zone d'innervation du nerf.

Par ailleurs, un guide nerveux en nanofibres de soie a été mis au point récemment par un autre laboratoire. Un test in vivo de ce biomatériau a été réalisé sur un modèle de nerf sciatique chez le rat. Il a montré sa capacité à induire une repousse axonale.

Par une approche clinique, électrophysiologique, histologique et par retracement, nous souhaitons évaluer la capacité de ce nouveau biomatériau à permettre la repousse axonale sur des modèles de lésion du nerf facial chez le rat. L'objectif est de comparer, sur les plans de la récupération motrice et fonctionnelle (ciblage axonal), la technique standard actuelle (interposition nerveuse) à une réparation utilisant le guide nerveux en fil de soie. L'obtention d'un résultat au moins équivalent, au mieux amélioré, permettrait d'envisager son application chez l'homme pour la réparation des lésions nerveuses avec perte de substance. Ce projet, non réalisable chez l'homme à l'heure actuelle (caractère expérimental), ne peut être proposé sur des sujets non vivants du fait de la nécessité d'une évaluation fonctionnelle de l'efficacité des techniques appliquées à la fonction faciale.

Les guides constitués de nanofibres se présentent sous la forme de petits tubes biocompatibles qui seront implantés chez des rats dont le recouvrement fonctionnel sera suivi et évalué durant 75 jours. En gardant à l'esprit la nécessité de réduire le nombre total d'animaux conformément aux principes de l'éthique animale reposant sur la règle des 3R, et en nous basant sur l'expérience de notre laboratoire, il a été déterminé que le nombre d'animaux nécessaire est de 65 rats au total pour obtenir des résultats fiables et statistiquement significatifs : 5 rats pour un premier groupe témoin, 15 rats pour chaque groupe expérimental (3 groupes différents) et 15 pour l'acquisition du geste chirurgical.

Au cours de cette étude, les conditions d'hébergement, de soin, d'antalgie, et les méthodes utilisées seront adaptées pour réduire au maximum toute douleur, souffrance ou angoisse durables que pourraient ressentir les animaux de manière à réduire au maximum les contraintes imposées aux animaux conformément aux normes actuelles encadrant l'éthique animale. Ces derniers seront observés quotidiennement pendant toute la durée du protocole expérimental.

Nous mettrons en place des points limites basés sur différents critères objectifs (perte du poids de plus de 10%, prostration, posture "dos voûté", etc). Tout signe de souffrance entraînera la mise à mort des animaux.

18604 Nous nous intéressons particulièrement à la maladie du greffon contre l'hôte, une complication majeure de la greffe de cellules souches hématopoïétiques provenant d'un donneur sain. Ces greffes restent le seul traitement de recours pour les patients atteints de différentes formes de leucémies et lymphomes qui ne répondent pas aux chimiothérapies classiques.

Nous importons une lignée de souris exprimant un récepteur humain à la surface des cellules du système immunitaire. Ce modèle de souris pourrait permettre d'étudier l'efficacité de molécules thérapeutiques développées pour une application chez l'homme.

Pour valider cette lignée nous devons confirmer que les cellules provenant de ces souris sont aptes à induire une maladie du greffon contre l'hôte de la même façon que des souris sauvages. Seule l'expérimentation dans un organisme entier permet la validation de leur efficacité. Nous allons donc tester cette lignée dans un modèle de greffe de moelle osseuse chez la souris, qui est le modèle in vivo de référence pour l'étude de la physiopathologie de la maladie du greffon contre l'hôte et des leucémies. Ce modèle nécessite l'irradiation corporelle des animaux et une greffe de moelle osseuse provenant d'animaux de fond génétique différent. Pour induire la maladie, des lymphocytes (provenant du même donneur de moelle osseuse) sont injectés.

Des mesures de raffinement seront mises en place pour limiter au maximum le stress des animaux et contribuer à leur bien-être. Les expériences de maladie du greffon contre l'hôte chez les souris nécessitent un suivi quotidien des animaux notamment avec l'établissement d'un score pathologique (1-5, 5 étant le plus sévère). La surveillance des animaux avec l'établissement de ce score assure le bien être des animaux. Les animaux sont mis à mort en fonction de la sévérité de la maladie (score de 5).

Une seule expérience préliminaire sera nécessaire pour valider l'utilisation de cette lignée. Des tests in vitro seront également utilisés en parallèle afin de réduire l'expérimentation in vivo.

Pour l'ensemble de ce projet, qui sera réalisé en 6 mois, nous allons utiliser 35 animaux qui correspondent aux souris receveuses avec trois grands groupes comprenant entre 5 et 10 animaux selon leur degré d'importance.

18605 Un risque de contamination des aliments pour animaux par les antibiotiques existe lors de la fabrication car des lignes de production communes à tous les types d'aliments, y compris les aliments médicamenteux, sont utilisées. Des plans de surveillance portant sur les aliments pour animaux au sein d'élevages français ont mis en évidence des fréquences de contamination en antibiotiques élevées, en particulier dans les aliments de porc. Ceci entraîne une exposition non maîtrisée des porcs à des concentrations en antibiotiques très inférieures aux doses posologiques. La Bretagne étant la première région française de production de viande de porc, l'objectif de ce projet est donc d'évaluer les risques de transfert de résidus d'antibiotiques et d'émergence de résistance chez des porcs soumis à une alimentation « supplémentée » à des concentrations correspondant aux teneurs actuellement tolérées par les bonnes pratiques de fabrication des aliments pour animaux.

L'évaluation du risque de transfert des antibiotiques de l'aliment vers les denrées consommables se fera par une étude expérimentale sur 4 groupes de 6 porcs (24 animaux). Chaque groupe se verra administrer via l'alimentation un antibiotique (supplémentation) ou une combinaison d'antibiotiques à des concentrations correspondant aux taux actuellement tolérés. Les fèces et le plasma des animaux seront prélevés régulièrement et dosés en antibiotiques. A l'issue de la période d'administration de l'aliment supplémenté et après mise à mort, les antibiotiques seront dosés dans le foie, le muscle et la graisse.

L'évaluation du risque d'émergence d'antibiorésistance dans le microbiote intestinal des porcs se fera par une étude expérimentale sur 4 groupes de 6 porcs (2 groupes témoin, 2 groupes recevant un antibiotique). L'antibiotique d'intérêt sera administré aux porcs via l'alimentation (supplémentation). Les fèces de tous les animaux seront prélevées avant le début de la supplémentation pendant et après l'arrêt de la supplémentation. Les populations totales d'E. coli, marqueurs du microbiote intestinal seront dénombrées sur milieu sélectif et leur sensibilité à l'antibiotique présent dans l'aliment sera déterminée. L'impact de l'antibiotique présent dans l'aliment sur la co-sélection de résistance à d'autres familles d'antibiotiques d'intérêt en médecine vétérinaire et humaine sera également étudié.

Au préalable une étude pilote sera réalisée sur un nombre restreint de jeunes porcs (8 animaux). Elle permettra de maîtriser la technique d'administration de l'aliment supplémenté, de déterminer la durée nécessaire d'administration, et d'adapter les fréquences des prélèvements plasmatiques. Cette étude préliminaire permettra également de définir les conditions expérimentales de traitement des fèces et la taille des populations totales et résistantes d'Escherichia coli. L'ensemble des trois procédures représente un nombre total de 56 animaux.

Remplacement : En ce qui concerne l'étude de l'émergence de bactéries résistantes il n'existe pas de modèle in vitro suffisamment développé et performant permettant de reproduire l'environnement complexe du tube digestif et du microbiote intestinal. Il est également nécessaire d'utiliser un modèle expérimental de destination pour étudier les conséquences d'une consommation non maîtrisée d'antibiotiques sur le microbiote des animaux de rente. En ce qui concerne l'étude cinétique, il est nécessaire, pour réaliser une modélisation pertinente, d'étudier simultanément les processus d'absorption, de distribution et d'élimination ce qui n'est pas possible à l'heure actuelle avec seulement des études in vitro ou in silico. .

Réduction : Le nombre d'animaux est estimé de façon à avoir des résultats probants. Pour la cinétique, le nombre d'animaux par groupe sera minimisé et aucun groupe témoin n'est prévu car l'animal est son propre témoin. Dans le cadre de l'étude sur l'antibiorésistance, le nombre a été fixé en tenant compte de la variabilité biologique entre animal et ce, pour chaque groupe séparé. Un groupe témoin est nécessaire dans ce type d'étude pour suivre l'évolution du microbiote intestinal sans pression liée à la consommation d'antibiotique.

Raffinement : Les prises de sang répétées seront effectuées après la pose chirurgicale de cathéters (sous anesthésie et analgésie), permettant ainsi une récolte de sang non-douloureuse et limitant le stress. La contention sera effectuée par des opérateurs formés, assurant la sécurité des animaux et des opérateurs et minimisant les sources d'inconfort pour les animaux. Cependant, des points limites et critères d'arrêt ont été définis afin de permettre une intervention rapide sur les animaux. Un enrichissement de l'environnement est prévu avec des jeux. Le traitement sera administré via l'alimentation à des teneurs extrêmement faibles par rapport aux doses posologiques et ne devrait pas entraîner d'effets secondaires sévères.

18606 Le diabète est la maladie métabolique chronique la plus commune, affectant environ 5% de la population française et plus de 8% de la population mondiale. Le diabète de type 2 correspond à 90% des cas. Cette maladie est la cause majeure de cécité, d'accidents cardiaques, vasculaires et cérébraux et d'amputation des membres inférieurs. De ce fait, les diabétiques ont une espérance de vie diminuée courant un risque de décès par maladies cardiovasculaires ou par cancer. C'est pourquoi cette maladie représente un enjeu de santé publique majeur.

Les molécules testées agissent via un mécanisme d'action totalement inédit, fruit de plusieurs années de travaux. Leurs mécanismes d'action et leur efficacité ont été validés *in vitro* et *in vivo*. Les résultats des études précédentes laissent à penser que les molécules pourraient avoir un effet bénéfique sur l'obésité et l'insulinorésistance notamment.

Le but de cette étude est donc de caractériser l'effet des molécules dans un modèle de diabète de type 2 induit par un régime gras. L'avantage de ce modèle est qu'il repose sur une des principales causes de diabète de type 2 chez l'homme : les mauvaises habitudes alimentaires. Les souris développent comme chez l'homme, une obésité, une hyperglycémie et une hyperinsulinémie ce qui constitue un excellent modèle de diabète de type 2.

Ce modèle consiste à donner à la souris une alimentation riche en gras. Des souris mâles seront réparties dans 7 groupes expérimentaux

: un groupe de souris témoin recevant de la nourriture normale, un groupe de souris recevant de la nourriture riche en gras (High Fat Diet, HF) non traité, un groupe de souris HF traité avec une molécule de référence, un groupe de souris HF traité avec une molécule de la même famille que les molécules d'intérêt, ainsi qu'un groupe de souris HF traité avec une des molécules d'intérêt. Des analyses seront ensuite effectuées pour déterminer l'effet du traitement sur l'aspect clinique et biochimique.

Cette étude sera réalisée sur un total de 400 animaux. La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée sur le terrain:

1) réduction, le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum (notamment grâce à la présélection des molécules dans un projet précédent) tout en permettant de générer des données statistiques solides ; des études statistiques basées sur les résultats d'autres études nous permettent de prédire le nombre d'animaux suffisant pour obtenir les réponses à nos interrogations.

2) raffinement, les procédures prennent en compte des temps de récupération entre chaque manipulation stressante pour les souris (prises de sang, injections des molécules, glucose challenges) et un nombre optimisé de prélèvements visant à réduire le stress et la fatigue des animaux. " Un enrichissement se fera par ajout de coton de nidation.

3) remplacement, les études *in vitro* et sur animaux invertébrés ne permettent pas l'étude de comportements complexes et le développement multifactoriel de la maladie; le rongeur est donc une des espèces les plus appropriées pour ce type d'étude.

Ce projet rentre dans le cadre d'un projet plus global ayant pour but de développer des molécules à potentiel thérapeutique et de les amener aux essais cliniques chez l'Homme.

18607 La trace de la mémoire dite engramme serait accessible physiquement grâce à des outils de génétique moléculaire. Nous proposons d'utiliser de tels outils pour capturer l'engramme d'une tache de peur conditionnée dans différents contextes associés à des dimensions pathologiques humaines. D'abord l'alimentation obésogène détériore les capacités cognitives surtout chez l'enfant

et l'adolescent. Ensuite, un stress d'observation d'une expérience traumatique crée une mémoire de l'évènement dont les récurrences multiples peuvent conduire à un désordre psychiatrique post-traumatique chronique.

L'objectif sera d'identifier et de manipuler l'engramme de peur conditionnée au cours du temps et de l'expérience. En particulier, il s'agira de réactiver un engramme sur des sujets atteints de troubles de la mémoire. Au contraire, il s'agira de bloquer un engramme traumatique sur des sujets atteints de stress post-traumatique.

Nous formulons l'hypothèse que cette engramme peut être réactiver malgré des conditions pathologiques à l'origine de déficits cognitifs.

Cette étude ne peut pas être pratiquée sur l'Homme puisque les seuls tissus cérébraux disponibles sont post-mortem. Nous collecterons des données physiologiques et comportementales à des moments prédéterminés sur des souris prédisposées à développer des troubles cognitifs ou bien sur des animaux sains dont on aura inhibé l'engramme.

Remplacer:

Nous avons effectué une recherche approfondie sur Pubmed et Google Scholar (période 2009-2020) afin de nous assurer de l'inexistence d'approches alternatives in vitro qui pourraient être utilisées pour reproduire l'interaction entre neurodéveloppement et anatomie fonctionnelle. Cette recherche n'a pas identifié de solution in vitro alternative conservant les systèmes de communication multicellulaires récapitulant l'encodage de la mémoire qui sont nécessaires pour ce projet. Nous étudierons des modèles génétiques murins pour capturer et modifier l'engramme et aussi parce que c'est un animal social.

Réduire:

Tout les modèles seront croisé dans la même souche génétique selon les études précédentes de notre laboratoire.

Des tests statistiques nous permettrons de réduire le nombre d'animaux. Le nombre d'animaux utilisés sera réduit grâce à une approche longitudinale rationnelle de plusieurs paramètres sur les mêmes animaux pour en limiter le nombre sans compromettre la puissance statistique des analyses. Plusieurs paramètres seront mesurés sur le même animal.

L'objet de la présente demande, qui concerne 436 animaux génétiquement modifiés.

La réalisation du projet concerne 48 groupes expérimentaux et contrôles divisés en 7 cohortes d'animaux exposés soit au modèle d'alimentation obésogène pour détériorer la mémoire soit un stress d'observation pour faciliter la formation d'une mémoire post-traumatique.

Raffiner:

Le raffinement implique un hébergement dans un environnement enrichi (copeaux, igloo et coton dans la cage) avec libre accès à l'eau et à la nourriture.

Afin de réduire la douleur et la souffrance des animaux, les mesures suivantes seront prises :

les animaux seront opérés sous anesthésie profonde ; avant la chirurgie les animaux seront administrés avec un antidouleur et anti-inflammatoire; après la chirurgie les animaux seront maintenus en atmosphère humide et chauffée jusqu'au réveil et administrés avec un analgésique et un anti-inflammatoire pendant une semaine. Ensuite, ils seront stabulés en cage transparente et suivis quotidiennement pour des signes de détresse/infection/souffrance en suivant une grille de score avec des points limites adaptés.

18608 Notre groupe a pour objectifs de comprendre les mécanismes moléculaires engagés dans les phénomènes de résistance aux drogues et d'identifier de nouvelles cibles pouvant faire l'objet de traitements innovants. Notre stratégie d'étude repose sur trois axes complémentaires basés sur 1) des études cellulaires in vitro, 2) l'analyse de tissus de patients, 3) la génération et l'utilisation de modèles animaux expérimentaux. Ces modèles nous permettent d'identifier de nouvelles combinaisons de traitements pour surmonter la résistance au traitement dans le cancer. L'étape suivante est donc la mise en place d'essais cliniques pour valider notre approche.

Dans le cas du cancer colorectal, la maladie métastatique atteint en majorité le foie, puis les poumons, mais aussi peut atteindre le péritoine. Dans ce cas des centaines de nodules se développent dans le péritoine et se fixent aux viscères et ces tumeurs sont extrêmement difficiles à traiter. Nous venons d'identifier de nouvelles combinaisons de traitements capable de surpasser la résistance aux chimiothérapies dans le cas de tumeurs primaires. Nous voulons donc maintenant savoir si ces traitements peuvent être efficaces dans le traitement des carcinomes péritonéaux. C'est pour cette raison que nous voulons mettre en place un modèle murin de carcinome péritonéal (déjà publié) pour montrer que notre combinaison de traitement est efficace et qui pourra donc bénéficier aux patients atteints de cette pathologie.

Dans le cadre de la règle des 3R, le nombre d'animaux sera déterminé avec discernement, après calcul de l'échantillonnage nécessaire afin d'obtenir une puissance statistique satisfaisante (pour ne pas avoir à refaire l'expérience) et des mesures destinées à réduire la contrainte, la douleur et la souffrance des animaux ont été prévues (enrichissement du milieu, suivi régulier des animaux, injection d'analgésiques en cas de douleur). Nous avons notamment mis au point une grille de suivi clinique des animaux répertoriant 33 points de contrôle (aspect général de l'animal, comportement dans la cage, comportement à la manipulation, poids, taille de la tumeur) et permettant de faire un score. C'est donc avec cette grille que nous prenons la décision de prendre en charge la douleur de l'animal ou de l'euthanasier.

Pour l'ensemble de ce projet, nous avons prévu un nombre de 1488 souris sur une durée de 5 ans.

18609 Le but de ce projet est l'étude d'une population de cellules immunitaires particulières : les macrophages résidents. Ces cellules, comme tous les macrophages, assurent une fonction de protection de l'organisme grâce à leur capacité à phagocyter, c'est à dire à ingérer différentes cibles biologiques, en particulier des agents infectieux (virus, bactéries, parasites) mais aussi certaines cellules devenues inutiles (cellules vieillissantes ou endommagées) ou dangereuses (cellules cancéreuses). Ils possèdent aussi la capacité de sécréter différentes substances biologiques permettant d'attirer d'autres cellules immunitaires (cytokines) ou de modifier leur environnement tissulaire (enzyme de digestion de la matrice extracellulaire). Toutes ces propriétés en font des agents majeurs dans la réaction inflammatoire, en cas d'infection, mais aussi dans la cicatrisation et la régénération des tissus lésés.

Les macrophages résidents, qui sont le sujet d'étude de ce projet, se distinguent des macrophages « classiques » par le fait qu'ils ne sont pas générés par les cellules souches hématopoïétiques qui, chez l'adulte, se trouvent dans la moelle osseuse et produisent, tout au long de la vie, l'ensemble des cellules sanguines.

Les macrophages résidents sont, eux, produits très tôt au cours du développement embryonnaire, dans le sac vitellin, une poche extra-embryonnaire qui entoure et protège l'embryon. Ensuite, rapidement, ces macrophages migrent pour coloniser les différents organes du fœtus (cerveau, peau, poumons, foie, rein, etc...) où ils persisteront après la naissance chez l'individu adulte (d'où le qualificatif de « résidents »).

Au cours de la vie adulte, les macrophages résidents ne sont remplacés que partiellement par ceux générés par la moelle osseuse et de manière variable suivant l'organe concerné. Par exemple, les macrophages du cerveau demeurent presque exclusivement d'origine embryonnaire alors que les macrophages alvéolaires du poumon sont progressivement remplacés par des macrophages adultes.

La découverte de l'existence des macrophages résidents étant relativement récente, nos connaissances sur leurs propriétés biologiques demeurent encore incomplètes. Étant donné le rôle majeur joué par les macrophages en générale dans de nombreux processus biologiques (protection immunitaire, protection contre le cancer, cicatrisation, régénérescence tissulaire), il est important de pouvoir faire la distinction entre les propriétés des deux populations (classiques et résidents) pour mieux comprendre leur rôle pendant le vieillissement de l'organisme.

C'est pourquoi nous avons mis en place ce projet dont l'objectif général est l'étude des macrophages dans les phénomènes physio-pathologiques liés au vieillissement.

Le projet peut être divisé en deux grandes sous-parties : d'une part une analyse générale des conséquences du vieillissement sur la physiologie des macrophages et leurs conséquences physiopathologiques, d'autre part une étude plus spécifique du rôle des macrophages dans la physio-pathologie du cœur, plus précisément suite à un infarctus. En effet, des travaux récents ont montré que l'origine des macrophages influe sur leur activité dans le cœur suite à un infarctus du myocarde. Les macrophages dérivés des monocytes de la moelle osseuse auraient un rôle essentiellement pro-inflammatoire, alors que les macrophages résidents, d'origine embryonnaire, auraient une action plutôt immuno-modulatrice et pro-régénérative.

Par ailleurs, les conséquences d'un infarctus du myocarde sont considérablement plus mauvaises chez les individus âgés que jeunes, aussi bien chez la souris que chez l'Homme. C'est pour cette raison que notre étude se fera en comparant des lots d'animaux d'âges différents et que nous avons regroupé l'ensemble de ces expériences dans ce projet « Etude des macrophages résidents pendant le vieillissement ».

En résumé, si ce projet est avant tout un projet de recherche fondamentale sur la biologie du vieillissement et des macrophages, les connaissances qu'il apportera, en particulier dans le domaine de la pathologie cardiaque, pourront bénéficier, à terme, à des domaines plus appliqués concernant la défense immunitaire ou la réparation tissulaire.

Le recours à l'animal est nécessaire car il n'existe actuellement aucun modèle *in vitro* pouvant se substituer à l'étude directe du système immunitaire *in vivo*. En particulier, les essais *in vitro* sont incapables de reproduire toute la complexité des facteurs impliqués dans les phénomènes de réaction immunitaire ou de vieillissement. De même, la différenciation des macrophages à partir de leurs précurseurs embryonnaires est influencée par des facteurs de la niche foetale et ne peut pas être reproduite *in vitro* sans artefact.

Un total de 1700 animaux seront utilisés pour ce projet avec un total de 7 procédures de sévérité légère (4 procédures) à modérée (3 procédures). Ce nombre a été limité au maximum en tenant compte de la nécessité de produire des résultats interprétables sur le plan statistique. En particulier, nous utiliserons de manière intensive la technologie de cytométrie de flux qui permet l'analyse détaillée d'un grand nombre de populations cellulaires de façon simultanée, permettant des analyses statistiques basées sur un grand nombre d'évènements pour chaque animal utilisé. Ceci, allié à l'utilisation rationnelle de différentes lignées de souris transgéniques permettra de maximiser l'efficacité de nos analyses et de réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés.

En ce qui concerne le bien-être animal, une observation quotidienne des animaux sera réalisée afin de vérifier les signes cliniques et comportementaux pouvant signaler un état de souffrance (perte de poids, voussure du dos, isolement, apathie), et dans ce cas mettre fin à la procédure par mise à mort de l'animal. Une attention particulière sera apportée aux animaux soumis à une procédure chirurgicale. D'une part la chirurgie ne sera réalisée que par des personnes qualifiées et expérimentées dans des conditions strictes d'asepsie. L'anesthésie médicamenteuse par injection sera précédée d'une anesthésie gazeuse pour diminuer au maximum le stress de l'animal. Au cours de l'opération, un gel hydratant sera déposé sur les yeux de l'animal pour éviter le dessèchement de la cornée. Dès la phase de réveil, un traitement analgésique sera administré à l'animal sous la forme d'un analgésique de type morphinique de façon à diminuer au maximum les douleurs post-opératoires.

18610 Le syndrome de Rendu-Osler-Weber ou Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia est une maladie génétique humaine rare caractérisée par des malformations vasculaires sources d'hémorragies qui peuvent s'avérer dramatiques pour la santé des malades. Cette pathologie repose majoritairement sur la mutation de deux gènes, Endogline et ALK1.

Notre projet consiste à développer des modèles d'étude de cette maladie chez le poisson-zèbre en générant des mutants, de l'Endogline et d'ALK1 notamment, ainsi que des animaux transgéniques

qui serviront d'outils dans le cadre de l'analyse de ces désordres vasculaires. Ces modèles seront utilisés dans des cribles pour identifier des molécules capables de prévenir et traiter cette maladie. Entre la génération de poissons mutants (5 lignées) et transgéniques (4 lignées), l'analyse du phénotype des mutants et les cribles à visée thérapeutique, nous estimons qu'un maximum de 10354 poissons seront utilisés pour ce projet sur l'ensemble des 5 années couvertes par cette saisine soit 2071 poissons par an.

Le syndrome de Rendu-Osler-Weber repose sur une réponse anormale des vaisseaux sanguins aux contraintes du flux sanguin qu'il est impossible de reproduire fidèlement in vitro d'où le recours indispensable à un modèle animal. Cependant, conformément à la règle des 3R, chaque fois que cela s'avère possible, une approche in vitro ou l'utilisation de larves de moins de 5 jours sera privilégiée (Remplacement). Des expériences pilotes et des outils statistiques seront mis à profit afin d'estimer au plus juste le nombre d'animaux nécessaires pour atteindre une significativité des résultats (Réduction). Un système à points basé sur l'apparence et le comportement des poissons sera utilisé pour évaluer l'inconfort ou la douleur des animaux. Un nombre de points défini comme critique entrainera la sortie des individus de l'expérimentation et leur euthanasie (Raffinement).

18611 Le cancer colorectal (CCR) reste toujours la troisième cause de décès par cancer dans le monde. Détecté à un stade précoce, il est de bon pronostic avec environ 90% de guérisons, mais lorsqu'il est découvert tardivement et qu'il présente des métastases, les chances de survie sont très faibles. La recherche de nouvelles cibles thérapeutiques ainsi que développement de nouvelles thérapies reliées au développement tumoral et au processus métastatique constitue donc un enjeu majeur en oncologie.

Les différents modèles précliniques développés par ce projet, accès sur le cancer colorectal, permettront aux chercheurs de la communauté de mieux comprendre les processus impliqués dans la croissance tumorale, l'apparition de métastases, ainsi que de tester de nouvelles molécules ou des combinaisons de traitements.

Cette plateforme a pour objectif de pouvoir proposer aux chercheurs différents modèles de greffes chez la souris :

- des greffes dites « intra-spléniques » qui permettent d'appréhender les phénomènes relatifs à la croissance des métastases hépatiques,

- des greffes dites « intra-caecales » qui permettent d'appréhender les phénomènes relatifs à la croissance de la tumeur primaire et à toutes les différentes étapes du développement des métastases,

- des modèles de greffes sous-cutanées de tumeurs humaines dites « PDX », plus proches de la pathologie humaine car réalisées non pas avec des lignées cellulaires établies mais avec des échantillons tumoraux cliniques bien caractérisés.

L'utilisation de ces différents modèles précliniques de cancérologie chez la souris est vraiment essentielle pour permettre aux chercheurs de confirmer in vivo les résultats/l'efficacité des traitements qu'ils ont pu préalablement obtenir in vitro et pouvoir appréhender certaines étapes complexes du processus tumoral qui sont impossibles à étudier in vitro sur des cultures de cellules ou sur d'autres modèles.

Dans le cadre de la règle des 3R, le nombre d'animaux sera réduit au minimum après calcul de l'échantillonnage nécessaire afin d'obtenir une puissance statistique satisfaisante et des mesures destinées à réduire la contrainte, la douleur et la souffrance des animaux ont été prévues (enrichissement du milieu, suivi régulier des animaux, injection d'analgésiques en cas de douleur).

Pour l'ensemble de ce projet, nous avons prévu un nombre de 640 souris sur une durée de 5 ans.

18612 Nous avons montré un impact significatif d'une exposition chronique à de faibles doses de certains pesticides ou de polluants environnementaux, type nano ou micro plastiques, in cellulo sur la prolifération de plusieurs lignées de cancer colorectal et in vitro sur les formes neurotoxiques associées aux maladies neurodégénératives.

Notre objectif est d'évaluer l'impact in vivo d'une exposition chronique à de faibles doses de ces pesticides ou de polluants environnementaux sur 2 pathologies: le cancer colorectal et la maladie d'Alzheimer.

La collaboration entre nos 2 équipes spécialisées en cancers digestifs et maladies neurodégénératives, permet d'appliquer la règle des 3R :

1. Remplacement : nos données in cellulo et in vitro suggèrent un impact potentiel de ces pesticides ou polluants environnementaux, in vivo.
2. Réduction : l'étude sera réalisée selon 3 phases sur un total de 910 souris (sauvages et transgéniques) pour étudier l'impact des pesticides ou polluants environnementaux sur les 2 maladies : la phase 1 (étude pilote) sera déterminante pour réajuster si nécessaire, les doses de pesticides et le nombre d'animaux afin que les données des phases 2 et 3 soient statistiquement valides.
3. Raffinement : les données publiées par les industriels n'indiquent aucune toxicité à la dose de 0.1ug/L (dose max autorisée dans l'eau potable par l'UE et dose max utilisée dans l'étude). Il n'est donc pas attendu de souffrance chez l'animal. Les animaux (10/lot ; 4/cage) seront hébergés sous surveillance quotidienne, dans un milieu enrichi, avec un accès illimité à la nourriture et à l'eau de boisson, avec ou sans polluants.

18613 La morphine et ses dérivés (opioïdes) sont les analgésiques les plus puissants et sont fréquemment utilisés en clinique pour le traitement des douleurs sévères. Lors de traitements chroniques, ces analgésiques induisent une tolérance conduisant les cliniciens à augmenter les doses, exposant le patient au risque d'effets secondaires graves, dont la dépression respiratoire. De plus, les opioïdes créent une addiction caractérisée par un très fort taux de rechute. Les méthodes alternatives actuelles sont insuffisantes donc, pour mieux traiter la douleur avec des opioïdes ou ses dérivés, il est nécessaire d'étudier davantage les mécanismes qui conduisent à la tolérance et à l'addiction.

Ce projet vise à mieux comprendre les phénomènes de tolérance aux opioïdes chez la souris à l'aide d'une technique d'imagerie à ultrasons fonctionnels (fUS).

Nous avons comme objectif la validation d'un marqueur cérébral permettant la détection de la tolérance. Ce projet implique une étude intégrée de modifications cérébrales et comportementales en réponse à des opioïdes et, de ce fait, ne peut être réalisé que sur un modèle animal. La souris est un modèle de choix pour l'étude des phénomènes d'addiction car le génome est accessible pour des modifications génétiques nécessaires à notre projet. Le nombre total de souris nécessaire à la réalisation de ce projet est de 300 pour une durée de 3 ans. Pour réduire le nombre d'animaux, nous avons estimé la taille des échantillons permettant une analyse statistique efficace des résultats grâce aux données collectées au cours d'expériences précédentes et nos hypothèses de travail seront testées de façon séquentielle.

Ce projet met en jeu des procédures chirurgicales, l'administration de substances à action psychotrope et une technique d'imagerie du flux sanguin cérébral basée sur des ultrasons. Pour éviter toute souffrance, les procédures de chirurgie se feront sous analgésie et anesthésie générale. Les séances d'imagerie seront réalisées sur animal vigile dont la tête sera immobilisée mais dont le mouvement des pattes ne sera pas entravé; des séances d'habituation seront effectuées au préalable. Les souris seront observées quotidiennement. Une grille précise d'évaluation des points limites sera utilisée. Tout signe de douleur, souffrance, angoisse ou stress chez les animaux sera soulagé avec des analgésiques. Ce projet de recherche fondamentale a pour but de découvrir des marqueurs biologiques de tolérance aux opioïdes, ainsi que d'identifier des facteurs pronostiquant la réponse thérapeutique aux traitements de substitution ouvrant ainsi la voie vers de nouvelles stratégies pour traiter la douleur.

Amendement 1. Nous voulons ajouter à cette étude deux molécules opioïdes qui ont des modes d'action différents à celles déjà incluses dans le projet et pour cela le nombre d'animaux nécessaire s'élève à 426.

18614 La sphère cranio-faciale est particulièrement exposée à ces pertes osseuses plus ou moins importantes (trauma, tumeurs, maladies infectieuses) dans lesquelles le défaut de tissu osseux implique des reconstructions difficiles. Des substituts osseux synthétiques ou biologiques ont été développés mais ne permettent pas une réparation osseuse "ad integrum".

L'objectif de ce projet est d'étudier la biocompatibilité, l'ostéoinduction/conduction et le potentiel de réparation de plusieurs types de nouveaux biomatériaux osseux (porcins et humains) à l'aide d'un nouveau procédé pharmaceutique. Pour cela ce projet va mettre en œuvre deux procédures successives : la procédure 1 permettra de tester la biocompatibilité et l'inflammation induite par ces biomatériaux en implantation ectopique bilatérale chez la souris à 21 jours et la procédure 2 permettra de tester plus spécifiquement l'impact de ces biomatériaux sur la régénération osseuse dans un modèle de défaut osseux au niveau de la calvaria (os du crane) chez le rat sur une période de 3 mois.

Dans le respect des 3R:

Réduction : le nombre d'animaux utilisé sera réduit par l'utilisation de tests statistiques déterminant la taille minimale des groupes expérimentaux (ici 10 animaux par groupe et par temps). Sur 3 ans un nombre maximum de 60 souris et 190 rats seront utilisés soit 250 animaux, des études par imagerie longitudinale seront effectuées à différents temps afin de réduire au maximum le nombre d'animaux par temps d'analyse. Tous les matériaux sont préalablement sélectionnés sur leurs propriétés ostéogéniques démontrées in vitro et une veille bibliographique sera systématiquement effectuée pour éviter toute expérience redondante. Si nous n'observons pas de différence entre les groupes à la moitié du nombre requis d'animaux, l'expérience sera arrêtée et les matériaux repensés.

Raffinement : La souffrance animale sera réduite au maximum par le raffinement des méthodes expérimentales notamment l'utilisation d'anesthésie et d'analgésique adaptée durant les procédures avec une médication anti-douleur systématique en per et également post-opératoire, et l'établissement de points limites adéquats. Une surveillance quotidienne des animaux sera effectuée. Les conditions d'élevage sont présentes pour le bien-être animal de façon à réduire le stress et l'anxiété dans un environnement enrichi au sein de groupes sociaux de plusieurs individus, avant et après les procédures.

Remplacement : La régénération osseuse présente une biologie complexe impliquant la participation et l'interaction de différents types cellulaires. Ces processus complexes ne peuvent être mimés en utilisant uniquement des cultures in vitro ou des modèles informatiques. Les modèles d'implantation ectopique chez la souris et de défaut osseux de calvaria chez le rat sont deux modèles in vivo classiquement utilisés et il n'existe à ce jour aucune méthode alternative.

A terme, ces travaux permettront de mettre au point des matériaux utilisables en clinique pour la réparation de défauts osseux de la sphère cranio-faciale.

18615 Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est responsable d'une pandémie touchant 38 millions de personnes qui continue de s'étendre avec près de 2 millions de nouvelles infections chaque année. Un vaccin préventif serait le moyen le plus efficace de diminuer la propagation du VIH tandis qu'un vaccin thérapeutique aiderait à contrôler l'évolution de la maladie et à proposer des stratégies d'éradication du virus chez les personnes déjà infectées. Toutefois, après près de 40 ans de recherches, nous ne disposons d'aucun vaccin capable de prévenir l'infection ni de contrôler la progression de la maladie.

C'est pourquoi plusieurs équipes européennes, australiennes, canadiennes et américaines, parmi les plus compétitives dans la recherche vaccinale, se sont associées pour identifier de nouveaux candidats vaccins contre le VIH. Dans ce projet, une fois réalisées les études précliniques réglementaires, l'innocuité et l'immunogénicité des candidats vaccins seront évaluées chez l'homme, au cours d'essais cliniques de phase 1. En parallèle, afin de maximiser les chances de succès des vaccins en phase clinique avancée (phases 2 et 3), l'efficacité des candidats vaccins sera étudiée chez le primate non humain (PNH).

Il est aujourd'hui impossible de reproduire la complexité d'une infection virale et d'une réponse immunitaire, soit in vitro, soit par des modèles ne représentant que partiellement un organisme. Le recours à des modèles animaux est nécessaire en complément des essais cliniques de phase 1 pour évaluer l'efficacité des vaccins. Après une sélection stricte réalisée in vitro et chez le rongeur, l'innocuité et l'immunogénicité des candidats vaccins les plus prometteurs seront évaluées chez le PNH, modèle le plus pertinent en raison de sa proximité génétique avec l'être humain. Afin d'éprouver l'efficacité des vaccins à protéger de l'infection par le VIH, les PNH vaccinés seront exposés à des virus SHIV, chimères du virus de l'immunodéficience simienne (SIV) et du VIH. En effet, les PNH infectés par les virus SIV et SHIV sont le modèle le plus pertinent de l'infection de l'homme par le VIH.

Le projet prévoit d'inclure au maximum 80 macaques nés et élevés dans des élevages agréés, sur une durée totale de 5 ans (soit une moyenne de 16 animaux par an). Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux est réduit au minimum nécessaire pour permettre l'utilisation de tests statistiques non paramétriques et une interprétation fiable des résultats. Les méthodes expérimentales ont été élaborées pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux : les immunisations, inoculation virale et prélèvements de sang, de moelle osseuse, de fluides muqueux et biopsies seront réalisées sous anesthésie et les volumes de sang prélevés seront limités. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus des candidats vaccins et de l'infection virale. Des échantillons biologiques produits dans ce projet seront partagés avec d'autres laboratoires afin de limiter le recours au modèle PNH. En cas d'apparition d'effets inattendus, le vétérinaire de l'installation sera alerté et mettra en œuvre des traitements appropriés. Les animaux seront hébergés par paires avant infection puis en hébergements individuels contigus permettant des interactions sociales. Les animaux bénéficieront d'un programme défini par la cellule « bien-être animal » de l'établissement pour l'enrichissement de leur milieu de vie qui sera renforcé lors des phases d'hébergement individuels.

18616 L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie rare et dévastatrice due à une occlusion progressive des artères pulmonaires distales ayant pour conséquence une élévation de la résistance vasculaire et de la pression artérielle pulmonaire entraînant in fine une insuffisance cardiaque droite et la mort.

Les facteurs prédisposant à la maladie ont été récemment décrits tels que des mutations génétiques, le rôle de l'inflammation, la dysfonction endothéliale pulmonaire, la survie cellulaire et la prolifération aberrante des cellules de la paroi vasculaire. L'hypertension artérielle pulmonaire implique quatre systèmes principaux : immunitaire, vasculaire pulmonaire, cardiaque et musculaire squelettique. A ce jour, les seules thérapies de l'HTAP restent essentiellement palliatives et ciblent la vasoconstriction. En dépit des traitements disponibles, la seule option envisageable est la transplantation bi-pulmonaire. De nouvelles approches thérapeutiques sont donc nécessaires pour améliorer la prise en charge des patients.

L'objectif général du projet de recherche repose sur le potentiel thérapeutique de ciblage de la voie des kynurénines pour traiter l'HTAP. L'hypothèse de travail avancée est que certains métabolites de la voie des kynurénines pourraient jouer un rôle sur les cellules de la paroi vasculaire pulmonaire et participer au développement et/ou à la progression de l'HTAP. Pour se faire, le modèle expérimental HTAP chez le rat est indispensable afin d'étudier l'impact de cette voie métabolique dans les différents systèmes (pulmonaire, cardiovasculaire, immunitaire et musculaire). Afin de mimer l'HTAP dans un modèle expérimental, nous allons traiter les rats avec de la monocrotaline par injection unique en voie sous-cutanée avec une cinétique de suivi de 21 jours. Nous allons suivre trois procédures afin d'évaluer l'effet thérapeutique de différents modulateurs de la voie de la kynurénine en traitement curatif.

Toutes les procédures seront pratiquées en utilisant des anesthésiques. Les animaux sont mis à mort en fin d'expérimentation après un dernier bilan (cathétérisme) de leur fonction cardiaque, et les tissus prélevés sont partagés afin de minimiser encore le nombre d'animaux utilisés. Des expériences de biochimie et de biologie moléculaire à partir des différents tissus collectés et des études sur cellules isolées seront effectuées dans la mesure du possible afin de réduire le nombre

d'animaux utilisés. Ainsi, toutes les procédures de ce projet sont conçues pour respecter le principe des 3 R (Réduction, Raffinement, Remplacement). De l'enrichissement sera ajouté dans les cages des animaux. Les animaux seront quatre par cage avec nourriture et boisson ad libitum. Ils seront surveillés quotidiennement et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer que les animaux ne subissent aucun stress. Le nombre total de rats utilisés sera de 420 sur l'ensemble de l'étude.

Au final, ce modèle expérimental nous permettra de mettre en évidence la dérégulation de la voie des kynurénines chez les rats HTAP et d'évaluer l'effet thérapeutique d'une inhibition de la voie des kynurénines sur le développement de l'HTAP expérimentale afin de répondre à ces deux questions : Quel est le rôle de la voie des kynurénines dans l'HTAP? Peut-on cibler la voie des kynurénines pour traiter l'HTAP?

18617 La cachexie est un syndrome métabolique global dévastateur associé avec de nombreuses maladies chroniques, et en particulier avec le cancer. Les patients atteints de cachexie voient leurs réserves adipeuses et musculaires fondre drastiquement de manière irréversible entraînant une grande faiblesse générale. Il est estimé que 30% des patients cancéreux meurent de cachexie. Malgré l'enjeu de santé évident, il n'existe pour le moment ni de biomarqueur fiable, ni de traitement reconnu pour la cachexie. La découverte de nouveaux biomarqueurs et de nouveaux traitements est donc essentielle afin d'améliorer la survie des patients.

Notre laboratoire a récemment développé des modèles non-mammifères de cachexie induite par des tissus tumoraux chez la drosophile, qui a permis d'identifier et de valider fonctionnellement certains marqueurs et médiateurs nouveaux de la cachexie. Le but de ce projet est ainsi de valider en modèle mammifère les nouveaux bio-marqueurs potentiels et la relevance fonctionnelle des nouveaux médiateurs de cachexie identifiés chez la drosophile. Pour cela, nous proposons d'utiliser 2 modèles très bien décrits chez la souris par greffe syngénique par voie sous-cutanée de cellules murines tumorales (C26 côlon, KPC pancréas) induisant une cachexie rapide et reproductible. Pour l'ensemble du projet, nous avons prévu un nombre total de 416 souris sur une durée de 5 ans, regroupant la recherche de bio-marqueurs sanguins de cachexie et les essais précliniques visant à évaluer l'efficacité thérapeutique des traitements proposés.

Le projet sera développé en conformité avec la règle des 3R :

1- Remplacer : bien que des études pharmacologiques aient été menées in vitro sur des cellules adipocytaires et musculaires en culture, la cachexie est un syndrome global qui ne peut être étudiée de façon complète que sur des animaux entiers avec leur physiologie et les différents échanges inter-organes. Ainsi, afin de valider des biomarqueurs sanguins pertinents de ce syndrome et tester l'effet des antagonistes sur la physiologie et la reprogrammation métabolique systémique, nous ne pouvons pas nous passer de tests chez l'animal.

2- Réduire : le nombre d'animaux a été réduit au minimum après calcul de l'échantillonnage nécessaire afin de nous permettre de réaliser des études statistiques robustes. Des études préliminaires chez la drosophile ont permis de restreindre les hypothèses, et donc le nombre de souris dont nous aurons besoin.

3- Raffiner : afin de réduire la contrainte, la douleur et la souffrance des souris, elles sont maintenues en portoir ventilé dans des cages d'une superficie de 500 cm² avec en fond un mélange de litière et de copeaux de peuplier et un enrichissement du milieu (briques de peuplier, carrés de cellulose, ouate de cellulose et/ou tunnels en plastique). Le syndrome cachexique induisant un affaiblissement profond de l'organisme (perte de poids, asthénie, atrophie musculaire, etc.) lié à une dénutrition, une observation quotidienne et minutieuse des animaux sera assurée tout au long des expériences. Une alimentation riche sous forme gélatinée sera proposée aux animaux en vue de contrôler la perte de poids. Tout sera mis en œuvre pour assurer le bien-être des animaux.

18618 Les reins assurent l'homéostasie de l'organisme, en épurant le sang de ses déchets et en régulant le niveau d'eau et d'électrolytes du corps. Ils peuvent être fréquemment affectés par différentes maladies aboutissant à une fuite massive de protéines du sang dans les urines (protéinurie), et à

une dysfonction chronique de l'organe (insuffisance rénale chronique) mettant en jeu le pronostic vital en l'absence de traitement. La protéinurie elle-même entraîne des complications majeures telles qu'une rétention d'eau, des thromboses veineuses, ou encore un déficit immunitaire. La protéinurie peut aussi elle-même aggraver l'insuffisance rénale. Les mécanismes d'apparition de cette protéinurie sont encore imparfaitement connus.

Nous avons identifié une protéine, la vasorine, dont l'absence entraîne une protéinurie massive, des lésions rénales et la mort des souris. Notre projet a pour but de comprendre son rôle exact dans le fonctionnement du rein. Certains travaux suggèrent un effet biologique porté par la partie extracellulaire de la vasorine, qui peut être clivée et donc circulante. Cependant, il n'existe pas de protéine recombinante commerciale, et il s'agit d'une protéine fortement modifiée après sa production par des mécanismes complexes intrinsèques à notre organisme, ce qui rend très difficile et peu pertinent sa production in vitro pour le moment.

De plus, seule l'expérimentation animale permet actuellement d'étudier les mécanismes physiopathologiques des maladies rénales, en reproduisant fidèlement l'ensemble des interactions cellulaires existant au sein du rein dans un organisme vivant. La souris est un modèle de choix car son architecture et sa physiologie rénales sont proches de celles connues chez l'homme.

Ainsi, le seul moyen d'étudier avec pertinence le rôle de fraction soluble de la vasorine dans la survie et la fonction rénale est la parabiose, où deux organismes, ici des souris, auront leur système sanguin reliés par chirurgie.

Nous étudierons une lignée de souris mutante pour la vasorine, dont la délétion est inducible par injection de tamoxifène, car la délétion constitutive est létale pour les souris. Pour étudier le rôle du fragment circulant de la vasorine dans le maintien de la fonction rénale et donc dans la survie des animaux, la circulation de souris dont nous aurons au préalable délété la vasorine sera reliée à la circulation de souris exprimant la protéine. La fonction rénale des souris sera évaluée notamment par la prise de sang et d'urines lors de la mise à mort des animaux.

Ce projet sera réalisé dans le respect de la règle des 3Rs :

Remplacer : L'utilisation d'un modèle animal est une nécessité car il n'y a pas de méthode alternative pour l'étude de la fraction circulante de la vasorine et des pathologies complexes du rein.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est le minimum nécessaire permettant une analyse statistique robuste des résultats grâce aux données collectées au cours d'expériences précédentes.

Raffinement : Pour éviter toute souffrance, les procédures de chirurgie se feront sous analgésie et anesthésie générale. Les souris seront observées quotidiennement et une grille précise d'évaluation des points limites sera utilisée. Tout signe de douleur, souffrance, angoisse ou stress chez les animaux sera soulagé avec des analgésiques.

Afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, les procédures se dérouleront avec une surveillance quotidienne et des antalgiques sont prévus. Enfin, des points-limites ont été établis et seront évalués via une grille d'évaluation définie, permettant de pouvoir prendre en charge précocement toute douleur ou souffrance selon les scores obtenus. Un niveau de souffrance trop élevé entraînerait l'euthanasie anticipée de l'animal par la méthode réglementaire, la dislocation cervicale.

Ce projet s'inscrit sur une durée de 2 ans. Le nombre de souris utilisées sera de maximum 40. Une étude a été réalisée afin de réduire au maximum le nombre d'animaux sans compromettre l'analyse statistique des résultats.

A terme, les résultats de ce projet permettront de comprendre plus précisément le rôle de la vasorine dans le fonctionnement rénal. Ils pourraient permettre l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et améliorer la prise en charge des maladies rénales chroniques.

18619 Le cancer du poumon est la première cause de décès par cancer dans le monde et la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques est un challenge majeur. A l'heure actuelle, des traitements existent, mais présentent des récurrences quasi systématiques à moins de 5 ans. Notre équipe

s'intéresse à l'implication de la voie de signalisation Notch dans le cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) et la possibilité d'en faire une cible thérapeutique. En effet, il a été montré que cette protéine est importante dans le développement de tumeurs dans différents organes et notamment est retrouvée surexprimée fréquemment dans les CBNPC. Afin d'étudier l'effet de l'inhibition de la voie Notch sur la progression tumorale, seul ou en combinaison avec des thérapies actuellement utilisées en clinique, nous souhaiterions injecter des cellules humaines dans des souris immunodéficientes. Nous aurions besoin pour ce projet de 2640 souris (détails plus bas). Cela nous permettra ainsi de déterminer si le ciblage de cette voie peut être efficace dans le traitement des cancers bronchiques. Afin de respecter au mieux le bien-être animal, nous prendrons toutes les dispositions nécessaires pour appliquer la règle des 3R : -« Remplacer ». Nous avons remplacé dès que possible le modèle vivo par des modèles de cultures cellulaires. En effet nous avons fait plusieurs tests qui nous ont permis d'identifier les traitements les plus adéquats pour cette expérimentation et notamment de mettre en évidence les inhibiteurs de la voie Notch les plus efficaces.

- « Réduire » le nombre d'animaux. Nous avons prévu le nombre nécessaire d'animaux minimal pour garder une puissance statistique forte. Notre expérience nous a montré qu'avec 10 animaux par groupe et en utilisant un test de Student, nous sommes capable de déterminer si les traitements administrés sont significativement efficaces.

- « Raffiner Afin d'améliorer la vie des souris, elles sont maintenues dans des cages d'une superficie supérieure à 500cm². La litière est faite à base de copeaux de peuplier et le milieu est enrichi avec des bûchettes de bois ou des frisottis. La méthodologie utilisée, implique la notion de points limites : nous porterons une attention particulière au bien-être des animaux et nous prendrons en charge la contrainte que les animaux subissent au cours des procédures expérimentales et particulièrement après l'induction tumorale. Pour cela, nous effectuerons un suivi régulier des animaux et dès lors qu'un animal présentera des signes cliniques pouvant être apparentés à un point limite, il sera sacrifié.

18620 Les cellules du sang assurant l'oxygénation des tissus et la défense immunitaire se développent dans la moelle osseuse (MO) à partir d'un petit nombre de cellules appelées : cellules souches hématopoïétiques (CSH). L'ensemble des mécanismes biologiques qui maintiennent le pool de CSH au cours de la vie ainsi que la différenciation de ces CSH en cellules du sang ne sont pas totalement élucidés. D'autre part la perturbation de ces mécanismes participe au développement de maladies auto-immunes et de leucémies chez l'homme. Ainsi, une meilleure compréhension de la biologie de ces cellules permettra de développer des cibles et des stratégies thérapeutiques pour les pathologies humaines.

Afin comprendre les CSH, nous utilisons des souris qui possèdent un système hématopoïétique très similaire à celui de l'homme et qui sont faciles à manipuler génétiquement. Nous nous intéressons plus particulièrement, à une famille de gènes fréquemment mutée dans les pathologies humaines notamment dans certaines leucémies. Dans un premier temps, nous allons générer des CSH mutées in vitro pour ces gènes et étudier leurs fonctions in vitro. Cependant ces CSH se comportent différemment dans leur environnement naturel la MO. Ainsi nous testerons les rôles de ces gènes in vivo par des expériences de transplantation des CSH mutées chez la souris. Dans un second temps, nous allons générer des lignées de souris génétiquement modifiées pour ces gènes dans les CSH et étudier leurs fonctions dans le sang.

Pour réduire le nombre d'animaux, tout en tenant compte des variabilités entre souris (individus) et des fluctuations liées aux expérimentations, une étude statistique adaptée, basée sur des tests paramétriques nous permettra de préserver la significativité des résultats obtenus avec un nombre minimum d'animaux utilisés (6 animaux /groupe / expérience). Le projet nécessite 378 souris pour l'ensemble de l'étude.

Pour répondre à l'objectif de raffinement, les souris transplantées seront observées quotidiennement durant la prise de greffe (10 premiers jours après transplantation). Des dispositions adéquates seront prises si les animaux greffés présentent des signes d'anémies (pattes blanches) ou une perte de poids supérieurs à 20% par rapport au poids de départ. D'autre part, les animaux

généralisés portant des mutations dans les CSH seront observés quotidiennement pendant et durant les 10 jours suivants l'induction de mutations. Si, les animaux présentent des signes d'anémie ou des pertes de poids supérieur à 20%, ils seront sacrifiés et analysés pour détecter les défauts hématologiques. Les animaux ne présentant pas de signes d'anémie sévère ou de perte de poids durant les 10 premiers jours seront observés hebdomadairement pour détecter des signes d'activité réduite, de pertes de poids supérieur à 20% ou de fourrure hérissée.

Pour le remplacement, des études in vitro de différenciation de cellules du sang sont effectuées cependant le passage à la souris est nécessaire pour suivre le développement de ces cellules souches dans l'organisme en entier et dans leur environnement naturel. Par ailleurs ces études ne sont pas possibles sur des organismes moins évolués comme le poisson ou la drosophile possédant un développement des cellules souches sanguines trop différent de celui de l'homme ou de la souris.

18621 Le cancer du poumon est aujourd'hui la première cause de décès par cancer en France et dans le monde. Nos travaux ont montré que les tumeurs pulmonaires humaines présentent des voies métaboliques remaniées, mettant en évidence une vulnérabilité métabolique de ces cancers. En d'autres termes, les modalités de production d'énergie au sein des tumeurs diffèrent des tissus normaux et il est aujourd'hui possible d'identifier des mécanismes de survie au plan bioénergétique, spécifiques aux cellules cancéreuses, que nous proposons de bloquer pour les tuer. La vulnérabilité métabolique désigne ainsi une voie biochimique spécifiquement utilisée par la cellule cancéreuse pour produire l'énergie à partir des nutriments. Ce mécanisme vital constitue une 'vulnérabilité' car son blocage réduit l'approvisionnement énergétique des cellules cancéreuses et limite leur croissance et leur survie.

Nos résultats ont ainsi permis d'élaborer une nouvelle approche thérapeutique ciblant le métabolisme tumoral que nous proposons d'évaluer au stade préclinique. Ce projet fut évalué par les instances scientifiques d'organismes financeurs nationaux. En particulier, nous avons identifié un médicament utilisé en parasitologie qui cible la vulnérabilité métabolique des tumeurs de poumon et entraîne le blocage de la production d'énergie et consécutivement, l'inhibition de la croissance des cellules cancéreuses. Afin de progresser vers le repositionnement de cette molécule dans le traitement ciblé du cancer du poumon nous devons apporter une preuve de concept in vivo et établir une preuve de mécanisme pharmacologique in vivo. Pour cela, un modèle murin d'adénocarcinome pulmonaire est indispensable. Le remplacement par une méthode alternative est impossible. Expérimentalement notre projet consistera à injecter des cellules tumorales humaines dans les poumons des souris immuno-déficientes pour éviter le rejet de greffes à les traiter par gavage et à suivre la croissance des tumeurs par un système d'imagerie. La comparaison de la croissance des tumeurs des souris traitées à celle des souris non traitées validera ou invalidera l'efficacité du traitement. Selon la règle des 3R, dans le respect du R de réduire, afin de restreindre le nombre d'animaux, nous combinerons nos lots témoins. De plus, le nombre d'animaux a été défini d'un point de vue statistique afin de réduire leur nombre. Nous avons déterminé via des tests statistiques qu'un lot de 20 souris par groupe était nécessaire pour avoir des données statistiquement exploitables à la fin de l'étude. Nous avons, de plus, recouru à un système d'imagerie qui nous permet de suivre le développement des tumeurs dans le temps. Cela nous permet de ne pas réaliser de sacrifices d'animaux intermédiaires pour documenter l'évolution de la maladie.

Dans le respect du R de raffiner le bien-être de nos animaux sera pris en compte dès leur naissance jusqu'à leur mort: hébergement en cages collectives, enrichissement de l'environnement et points limites précoces adaptés à chaque protocole et/ou situation nous permettant de prendre les décisions qui s'imposent face à la souffrance ou l'inconfort de nos animaux. Utilisations d'anesthésiques et d'analgésiques dès que nécessaire. Dans le respect du R de remplacer, il n'existe pas à ce jour de méthode alternative suffisamment prédictive pour mimer le processus complexe que nous étudions tel qu'il se déroule chez l'homme. Nous ne pouvons pas remplacer l'utilisation des animaux par des tests in vitro ou in silico car le mécanisme que nous étudions est trop complexe pour être étudié sans expérimentation chez la souris. Nous demandons pour réaliser l'ensemble de nos expériences un total de 320 animaux.

18622 L'estimation du niveau de production d'anticorps contre un pathogène ainsi que les effets indésirables potentiels dans l'animal vacciné constituent des moyens incontournables pour évaluer la capacité de protection et l'innocuité d'un vaccin. Dans ce cadre, ce projet vise à produire des anticorps polyclonaux (AcP) dirigés contre plusieurs protéines d'un pathogène) qui serviront d'outils pour : 1/ comprendre la dynamique d'interaction des pathogènes avec son hôte, 2/ évaluer l'innocuité et l'antigénicité d'un vaccin, 3/ développer et ou valider des tests de diagnostic ou autre technique immunologique. Ces objectifs passent par l'inoculation d'animaux avec des souches virales ou bactériennes atténuées (pas virulentes) ou inactivées (mortes) et adjuvées ou des sous-unités vaccinales (parties d'un pathogène, comme une protéine, l'ADN etc. .) ou simplement avec des micro-organismes non pathogènes et des protéines d'intérêt.

Le recours à des animaux pour la production des anticorps est malheureusement encore indispensable parce qu'une réponse immune doit être générée chez l'animal pour déterminer le degré d'efficacité vaccinale et pour l'obtention des anticorps spécifiques à un antigène. Pour obtenir des résultats satisfaisants et éviter les répétitions de protocoles et, par conséquent, réduire le nombre d'animaux utilisés, le choix des animaux sera effectué avec soin. Plusieurs facteurs sont pris en compte dans ce choix comme la taille des animaux qui doit être proportionnelle à la quantité d'anticorps souhaitée et l'espèce et lignée animales qui doivent être adaptées. Pour éviter le maximum la douleur chez l'animal, l'antigène à injecter ne sera pas toxique, sera préparé dans des conditions d'asepsie et aura un pH ajusté aux conditions physiologiques de l'animal. Le volume d'injection sera le plus petit possible et dans les limites recommandées pour chaque espèce. Les rappels seront évités au maximum. La voie d'injection sera adaptée à l'espèce et choisie. Toutes les procédures seront adaptées à l'espèce animale choisie réalisées par du personnel expérimenté. Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de leur hébergement. Par exemple, les animaux ne sont jamais hébergés seuls, les animaliers sont en contact constant avec les animaux et des sorties des enclos pour une « balade » dans le couloir de l'animalerie sont organisées quotidiennement. Le foin est posé en hauteur pour que les chèvres puissent monter la mangeoire. Les enclos accueillant les chèvres et les moutons ont une surface au sol d'environ 11 m². Un maximum de 6 animaux sont hébergés ensemble. Les espèces animales choisies pour ce projet sont les espèces cibles ou les modèles animaux des maladies étudiées. Il pourra donc s'agir de caprins (15), ovins (3).

18623 Le purpura thrombotique thrombocytopénique acquis (PTT-a) est une maladie rare et grave, touchant le plus souvent l'adulte jeune. Les manifestations de cette pathologie sont une baisse du nombre de plaquettes, une baisse de l'hémoglobine et une souffrance brutale d'un ou plusieurs organes comme le rein et le cerveau. Sans prise en charge adaptée, 90% des patients décèdent.

Le PTT-a est lié à la formation de caillots de plaquettes dans les petits vaisseaux de l'organisme, les plaquettes s'agrégeant sur des grandes protéines : les multimères de von Willebrand (VWF-HM), ces multimères étant dégradés par l'enzyme ADAMTS13 en situation physiologique. Deux événements sont nécessaires pour déclencher la maladie : premièrement le système immunitaire des patients inactive l'enzyme ADAMTS13, qui ne peut alors plus dégrader les multimères de von Willebrand; et deuxièmement l'activation des cellules endothéliales qui vont libérer brutalement de grandes quantités de VWF-HM.

Notre projet de recherche vise à évaluer l'efficacité de l'ITF1697 dans un modèle de souris atteinte de PTT. Ce peptide récemment développé a la propriété d'inhiber la libération du VWF-HM par les cellules endothéliales.

Le modèle de souris atteinte de PTT sera développé tel qu'il a été développé aux USA: nous utiliserons des souris dont le gène codant pour la protéine ADAMTS13 a été « éteint », prédisposant ainsi les souris à la maladie ; la maladie sera déclenchée par injection de Shigatoxine (protéine connue pour fortement activer l'endothélium) ; les souris seront alors traitées par le peptide d'intérêt qui sera administré de manière continue par mise en place de pompe micro osmotique dans la cavité abdominale sous anesthésie générale.

La règle des 3R sera respectée :

1) Remplacer : Seule une étude in vivo, c'est-à-dire incluant la complexité des mécanismes physiologiques mis en jeu lors du développement du PTT peut permettre d'atteindre l'objectif de ce projet. Aucune méthode de remplacement ne peut donc être employée.

2) Réduire : Le nombre de souris a été réduit au minimum pour démontrer cette efficacité du peptide et a été évalué par des tests statistiques à 96 souris KO ADAMTS13 (test Mann-Whitney).

3) Raffiner : Les animaux ne subiront que très peu de contraintes et la douleur sera minimisée. Les cages seront enrichies (coton). De plus, la douleur et la souffrance seront évaluées lors des protocoles et durant toute la vie de l'animal de la naissance à la mort grâce à une grille d'évaluation de la douleur et nous agissons en conséquences : la mise en place des pompes micro-osmotiques se fera sous anesthésie générale; dès la mise en place de la pompe l'animal sera placé en hébergement seul enrichi; les animaux seront observés quotidiennement, l'état clinique et la souffrance seront évalués à partir d'une grille d'évaluation adaptée, avec notamment évaluation des critères physiques et comportementaux permettant d'instaurer et d'adapter les mesures à visée antidouleur.

Nous attendons du traitement par le peptide une diminution de la gravité de la maladie, à savoir une diminution du nombre de caillots au niveau des organes de la souris et une survie augmentée.

Pour finir, en axant notre recherche sur un aspect découvert récemment de la physiopathologie du PTT, notre étude porte un projet thérapeutique innovant que nous pensons prometteur à court terme, à la lumière de données expérimentales et théoriques encourageantes.

18624 L'inhibition spécifique des NADPH oxydases (NOX) et NO-synthases (NOS), deux enzymes associées au stress oxydatif dans les cellules tumorales, a suscité un grand intérêt pharmacologique. Ces deux enzymes utilisent un cofacteur commun, le NADPH, pour initier leur activité catalytique. Ce projet vise à déterminer la biodistribution in vivo et ex-vivo d'un analogue du NADPH, appelé NS1, et de ses isomères NS1-2 et NS1-3 par des techniques d'imagerie en fluorescence. En effet, ces analogues sont non fluorescents dans les solutions aqueuses et deviennent fluorescents lors de leur liaison à leurs cibles (NOS, NOX2). Leur liaison engendre une inhibition de l'activité des NOS.

Le profil de biodistribution du NS1 et de ses 2 isomères sera déterminé chez des souris saines. Le nombre d'animaux par groupe expérimental a été réduit au minimum requis pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs. Il a été défini avec un risque alpha de 0.05, une puissance de test égale à 0.8. Le nombre total de souris pour cette étude s'élève à 20 souris athymiques. Un enrichissement matériel (twists, cocon ou nid) de l'environnement des animaux est mis en place dans toutes les cages afin qu'ils expriment un répertoire diversifié de comportements normaux. De plus, une observation quotidienne des animaux sera effectuée afin de s'assurer que les souris n'ont pas perdu de poids, ne présentent pas de signes de douleur ou de souffrance notable (cardiaque, respiratoire). Tout signe de douleur ou souffrance notable (cardiaque, respiratoire) de l'animal avant expérimentation ou après anesthésie constituera le point limite de l'expérience.

Les expériences d'imagerie in vivo seront réalisées sous anesthésie gazeuse et ex-vivo après sacrifice des animaux. Ce protocole est mis en place afin de respecter la règle des 3Rs, à savoir 1/ le remplacement, toutes les procédures proposées ont été réfléchies dans le but de remplacer, quand c'est possible, les modèles in vivo par des modèles in vitro, 2/ la réduction, le nombre d'animaux proposé a été calculé selon une procédure statistique permettant de réduire au minimum le nombre d'animaux nécessaires à l'obtention d'un effet biologique robuste et significatif et 3/ le raffinement, les expérimentations ont été réfléchies dans le but de réduire au maximum la souffrance des animaux notamment via des points de limite bien définis. Enfin, les animaux seront hébergés dans des cages par groupe de 5 afin qu'ils conservent des interactions sociales.

18625 Le but de ce projet vise à comprendre les mécanismes de la formation osseuse. Le projet est dédié à l'étude de la cellule responsable de la formation de l'os. Cette cellule est l'Ostéoblaste. Grâce à des modèles de souris, le projet va permettre d'étudier l'effet de l'inhibition spécifique dans la cellule ostéoblaste de l'expression de l'Autotaxine d'une part et du récepteur de type 1 de l'acide

lysophosphatidique (LPA1) d'autre part que ce soit au niveau de la structure osseuse à l'état normal ainsi qu'en situation expérimentales analogues à deux pathologies humaines que sont l'ostéoporose et la polyarthrite rhumatoïde. Le projet consiste tout d'abord à générer 2 nouvelles lignées de souris génétiquement modifiées afin de stopper la production d'ATX d'une part et de LPA1 d'autre part spécifiquement dans les ostéoblastes. La qualité du tissu osseux de ces animaux sera tout d'abord évaluée par microtomographie en absence de toute autre manipulation. Puis la qualité du tissu osseux de ces animaux sera évaluée dans deux conditions pathologiques grâce à la mise en place de deux modèles expérimentaux viables pour l'étude de la perte osseuse qui présentent toutes les caractéristiques pour le premier de l'ostéoporose et pour le deuxième de l'arthrite rhumatoïde. Réduire : Le nombre d'animaux sera limité aux seules expériences indispensables restantes. Le nombre d'animaux est estimé à 90 sur une période de 2 ans permettant l'obtention de résultats statistiquement exploitables sans avoir recours à une répétition des protocoles. Remplacer : L'emploi des modèles animaux est nécessaire au projet car il n'existe pas à l'heure actuelle de méthodes alternatives permettant de reproduire in vitro la complexité physiologique des échanges entre les nombreux types cellulaires responsables de la formation du tissu osseux. Raffiner : Les expériences seront menées sur la base des meilleures connaissances actuelles de l'os humain et de souris à partir des protocoles les plus pertinents réalisés chez la souris. Ces protocoles seront réalisés en tenant compte de la sensibilité des animaux à l'environnement (enrichissement du milieu, soins, suivi du bien être) et à la douleur (traitements antalgiques pré- et post-opératoires, imagerie non-invasive sous anesthésie volatile). Les souris seront mises à mort à la fin des protocoles selon les méthodes autorisées par la législation afin de prélever les échantillons tissulaires permettant une exploitation maximale par des analyses histologiques des données issues de l'expérimentation

18626 L'accident vasculaire cérébrale (AVC) est un enjeu majeur de santé publique en étant la troisième cause de mortalité dans le monde avec 15 millions de décès chaque année. Il s'agit également de la 1ère cause de handicap acquis chez l'adulte et 25% des patients survivant à l'AVC vont être atteint de déclin cognitif dans les 5 ans. Un AVC, ou ischémie cérébrale, est une occlusion, causée par un caillot de sang, dans une artère cérébrale ou à destinée cérébrale entraînant la mort rapide de cellules en aval du territoire touché. Les seuls traitements actuellement disponibles consistent à recanaliser le vaisseau occlus soit à l'aide d'un médicament désagrégant le caillot soit en le récupérant mécaniquement via un dispositif médical. Du fait de la courte fenêtre thérapeutique de ces traitements, moins de 10% des patients peuvent en bénéficier. Néanmoins, certains patients récupèrent spontanément, ainsi, il y a donc des mécanismes de récupération qui peuvent se mettre en place. Réussir à les comprendre et à les favoriser permettrait de développer de nouveaux traitements et d'élargir la fenêtre thérapeutique.

D'après de récentes études, cibler l'inflammation cérébrale afin de la rendre moins délétère pourraient stimuler le remodelage cérébral et favoriser la récupération post AVC à long terme, sur le plan de la motricité mais aussi en limitant/empêchant la démence. Lors d'un AVC, une des premières cellules inflammatoires à intervenir et ayant des conséquences considérables sur la survie du tissu cérébral est le neutrophile. En effet, il libère des dérivés réactifs de l'oxygène, qui sont des molécules toxiques, et de puissantes enzymes qui contribuent à la destruction et / ou au dysfonctionnement cérébral. Parallèlement, l'AVC induit la rupture de la barrière hémato-encéphalique qui est la barrière physiologique entre sang et cerveau constituée de cellules de la paroi vasculaire notamment et ayant un rôle de filtre. Cette rupture favorise alors l'entrée de cellules inflammatoires nocives pour la survie des cellules cérébrales, et également la formation d'œdème concourant à l'aggravation de l'état du patient.

De manière intéressante, une protéine appelée CD31 et ayant un rôle essentiel dans le maintien d'un état stable des cellules qui l'expriment, est retrouvée à la fois à la surface des neutrophiles, et à la fois à la surface des cellules de la paroi vasculaire, notamment. Il joue un rôle pacificateur de l'interface sang-vaisseau. Pendant l'AVC, le CD31 est cependant partiellement coupé de la surface cellulaire, perdant ainsi ses propriétés régulatrices. Ce phénomène, au niveau cérébral et/ou de l'organisme entier, pourrait donc contribuer à un emballement de la réponse inflammatoire et à la

rupture accrue de la barrière hématoencéphalique et donc aux dommages observés lors d'un accident vasculaire cérébral.

Le but du projet est de comprendre le rôle du CD31 lors d'un AVC.

Ainsi, les AVC seront induits de manière chirurgicale aux souris puis évaluées régulièrement à l'aide de tests comportementaux reflétant leur handicap moteur et à plus long terme la démence et seront euthanasiés afin de récupérer les organes. Toutes ces étapes seront réalisées au sein d'un autre laboratoire et a fait l'objet d'une autre demande d'autorisation.

En parallèle ces animaux seront suivis au cours du temps par technique d'imagerie par résonance magnétique (IRM), faisant l'objet de cette demande, afin d'évaluer 1) la taille de la lésion 2) les changements des propriétés visqueuses et élastiques du cerveau pouvant refléter un remodelage cérébral. Les animaux seront amenés à la plateforme de manière transitoire le jour de leur évaluation IRM puis ramenés après expérimentation dans leur animalerie d'accueil.

De plus, nous faisons l'hypothèse qu'en restaurant les fonctions du CD31, les phénomènes inflammatoires ainsi que la rupture de la barrière hématoencéphalique seraient diminués et permettrait de limiter la lésion cérébrale. Pour vérifier cette hypothèse, nous allons évaluer le rôle thérapeutique d'un peptide agoniste, développé au sein du laboratoire, c'est-à-dire d'une petite chaîne d'acides aminés bien définie pouvant se fixer sur le CD31 coupé et ainsi en restaurer sa fonction initiale. Une étude dans un modèle d'ischémie/reperfusion intestinale a pu démontrer l'efficacité d'une telle stratégie.

Ce projet nécessite 330 souris mâles adultes pour l'ensemble des procédures expérimentales sur une période de 5 ans, ce nombre ayant été élaboré en respectant la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner). Le recours au modèle animal est justifié car aucune approche *in vitro* ne permet de rendre compte de ces phénomènes au cours du temps. Les modèles d'AVC ne sont à l'heure actuelle pas remplaçables. Ce nombre prend compte de 6 groupes de souris génétiquement modifiés pour une invalidation totale ou partielle, de façon ubiquitaire ou de manière spécifique dans les neutrophiles ou les cellules de la paroi vasculaire, du CD31. Un groupe contrôle sans altération génétique sera également nécessaire. Deux modèles d'ischémie expérimentale induit par chirurgie permettant d'occlure l'artère cérébrale moyenne, permettront d'évaluer le rôle du CD31 sur différents aspects de la pathologie. En effet, selon que l'occlusion de l'artère soit transitoire ou permanente différents mécanismes entrent en jeu. Pour chaque groupe nous utiliserons 10 souris et l'étude se fera sur deux temps de prélèvement à J7 et J40. Puis dans un modèle d'AVC expérimentale, le peptide versus un groupe contrôle recevant une solution saline sera évalué jusqu'au temps d'analyses J7 et J40. Enfin, 10 souris saines serviront pour mettre au point les séquences IRM au préalable de l'étude, c'est-à-dire l'ensemble des paramètres définissant les impulsions de champ magnétique

et les caractéristiques des mesures effectuées en imagerie par résonance magnétique, dans le but de déterminer les propriétés de viscosité et d'élasticité cérébrales.

Les groupes ont été conçus de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Un calcul statistique du nombre de sujets nécessaires a été réalisé afin d'évaluer le nombre d'animaux à inclure pour obtenir des résultats significatifs tout en minimisant ce nombre. Ces calculs ont été possibles grâce aux résultats antérieurs obtenus avec ces modèles animaux. Pour le raffinement, le soin et le suivi des animaux seront faits par des personnes compétentes et expérimentées. La douleur sera évaluée par la mise en place de points limites bien définis à l'aide d'une grille de score. En cas de douleurs, l'administration d'antalgique et d'analgésie sera réalisée. Si la douleur persiste, l'animal sera euthanasié.

Les groupes seront opérés, suivis et euthanasiés aux différents temps dans un autre laboratoire et font l'objet d'une autre autorisation APAFIS. La présente demande ne concerne que l'aspect imagerie du projet.

18627 Plusieurs voies d'administration médicamenteuse sont possibles pour les maladies oculaires dépendant de la localisation de la pathologie: topique par collyres, injections périoculaires et administration dans le corps vitré, c'est-à-dire le gel qui remplit l'œil (voie intravitréenne). Des traitements

systémiques (càd par voie orale ou intraveineuse) sont parfois nécessaires en cas de maladie oculaire bilatérale, ou associée à des manifestations générales ou certains cancers. Cependant, leur diffusion ophtalmologique peut être limitée par la présence de barrières hémato-oculaires. Concernant les maladies rétiniennes, il s'agit des barrières hématorétiniennes interne (vaisseaux rétiniens) et externe (épithélium pigmentaire et membrane de Bruch). La sonication, qui correspond à l'utilisation d'ultrasons pour augmenter (de façon transitoire) la perméabilité de barrières cellulaires afin de permettre le transfert de molécules (de plus ou moins grande taille), a montré son intérêt en augmentant l'efficacité de l'administration d'un traitement systémique. La technique de la sonication est utilisée en Neurochirurgie dans le cadre d'essais cliniques. Une équipe de Neurochirurgie a par exemple montré l'efficacité d'un dispositif de sonication pour une perméabilisation transitoire de la barrière hémato-encéphalique avant administration intraveineuse de carboplatine (une chimiothérapie) chez des patients atteints de glioblastome cérébral. Cela leur a donc permis de faire pénétrer en intracérébral, le carboplatine qui ne pénètre habituellement que peu ou pas le cerveau lorsqu'administré par voie intraveineuse. D'autres équipes ont montré dans un modèle de souris, que la sonication pouvait perméabiliser la barrière hémato-rétinienne (BHR). L'utilisation de la sonication pourrait être bénéfique pour le traitement de multiples maladies rétiniennes comme la DMLA atrophique pour laquelle aucun traitement n'a prouvé son efficacité. Elle peut aussi s'envisager dans des maladies comme la chorioretinite séreuse centrale pour laquelle le seul traitement actuellement utilisé (l'éplerénone oral) traverse très peu les barrières hémato-rétiniennes. La sonication permettrait donc de faire pénétrer des molécules administrées par voie systémique (orale ou intraveineuse) dans l'œil, alors qu'elles ne peuvent habituellement pas pénétrer les structures oculaires lorsqu'administrées par ces voies.

L'objectif principal de ce travail sera :

- De calibrer le matériel de sonication afin de trouver les paramètres permettant une ouverture transitoire de la BHR. Il s'agira d'évaluer l'efficacité du dispositif de sonication (générateur utilisé en neurochirurgie avec une sonde adaptée à la taille de l'œil murin) en évaluant plusieurs puissances d'ultrasons et leur effet sur la BHR chez la souris Wild type (C57bl6).

- Le second objectif sera d'étudier l'innocuité de ce traitement : i. Évaluation en lampe à fente des structures du segment antérieur (cornée, cristallin, iris). ii. Évaluation en tomographie par cohérence optique de la cornée et la rétine. iii. Électrorétinogrammes. iv. Évaluation histologique de la cornée et de la rétine. v. Evaluation immunohistochimique et moléculaire.

- Le troisième objectif sera de tester cette ouverture de la barrière sur différents modèles murins de pathologies pour lesquelles les traitements actuels sont insuffisants ou très chroniques: dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA)

L'utilisation du modèle animal est indispensable pour notre étude. Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Les conditions d'hébergements seront adaptées au modèle expérimental. Le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement « règle des 3R ».

- (Remplacer) Ce projet nécessite un système biologique intégré allant de l'oeil au cerveau. Il n'y a pas d'alternative par des modèles in vitro.

- (Réduire) Le nombre d'animaux a été réduit au minimum pour pouvoir atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus et obtenir des résultats statistiquement significatifs.

- (Raffiner) Les animaux seront examinés quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Les animaux sont hébergés dans les conditions conformes à la réglementation. Les rongeurs bénéficieront si nécessaire d'une anesthésie générale ainsi qu'une administration d'analgésiques opioïdes en pré- et post- opératoire afin de prévenir la douleur lors des procédures chirurgicales. Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée. Elle permet une observation adaptée des animaux pour s'assurer de leur bien-être.

Un total de 1980 souris sera nécessaire. Nous avons limité au maximum le nombre de souris à utiliser compte tenu des nombreuses expérimentations à réaliser. Nous menons plusieurs expériences ne pouvant se superposer et nécessitant l'utilisation d'un même tissu oculaire (ex :

ré tine), et ce, de façon définitive, ce qui justifie que nous ne pouvons pas coupler toutes les expérimentations sur un même œil, justifiant ainsi ce nombre.

18628 L'équipe s'intéresse aux bases neurales de la navigation spatiale. Lorsque nous effectuons un chemin familier, nous nous repérons grâce aux objets présents autour de nous, mais aussi à l'aide des mouvements de notre propre corps. Nous sommes ainsi capables de nous représenter notre corps dans l'espace tout en bougeant. Cette carte mentale est formée grâce à l'implication de nombreuses structures cérébrales qui interagissent les unes avec les autres et elle nous permet de produire un comportement optimal vers le but à atteindre. Nous avons ainsi montré que le cervelet intervient dans la construction mentale de la représentation de l'espace dont le siège se situe au niveau de l'hippocampe. Nous cherchons maintenant à clarifier les mécanismes par lesquels le cervelet participe à la représentation mentale de l'environnement lors d'une tâche de comportement de navigation spatiale. Pour cela nous manipulerons l'activité des neurones du cervelet et nous réaliserons des enregistrements de leur activité in vivo lorsque l'animal est en train de s'orienter dans l'espace. Ce projet nécessitera donc l'implantation d'électrodes lors d'une procédure de chirurgie suivie d'une étude comportementale. Nous utiliserons sur 5 ans un total de 240 souris. La règle des 3R a été prise en compte pour la mise en oeuvre du projet et sera appliquée sur le terrain : 1) remplacement, les études in vitro et les animaux invertébrés ne permettent pas l'étude des comportements complexes ; la souris est donc l'espèce la plus appropriée pour ce type d'études ; 2) réduction, le nombre d'animaux prévu est inspiré du nombre d'animaux utilisé dans des travaux précédents de l'équipe et est réduit au maximum pour nous permettre de générer des données statistiques solides ; 3) raffinement, les procédures tiennent compte des temps de récupération et du nombre de tests pour réduire le stress et la fatigue des animaux. Les animaux sont placés dans des cages (58x38x20cm), en communauté de 2 à 5, dans des conditions d'hébergement contrôlées (12:12 h cycle lumière/sombre, 22°C ± 2°C, humidité de 65%). L'eau, la nourriture et un nid végétal, seront placés dans chacune des cages. Lorsque la procédure nécessite l'isolement d'un animal, un jouet d'exploration supplémentaire (cube, tunnel ou abri) est placé dans la cage de manière à lui offrir plus d'enrichissement. De plus les animaux sont hébergés dans des cages transparentes et non hermétiques permettant aux informations visuelles, auditives et odorantes de circuler entre les souris. Les animaux sont suivis quotidiennement par les mêmes manipulateurs afin de réduire leur stress au maximum. Toutes les conditions sont réunies pour prendre en compte la douleur de l'animal (anesthésie, analgésie, suivi post-opératoire). Des points limites sont définis et un suivi régulier des souris par un personnel qualifié, sera réalisé après chirurgie à l'aide de grilles d'évaluation (étude du comportement, du poids et de l'apparence). Des méthodes seront mises en place pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux.

18629 Les maladies à prions (MP) sont des affections neurodégénératives transmissibles d'évolution fatale. Le système nerveux central est le tissu le plus infectieux. Aucun micro-organisme conventionnel n'a été mis en évidence. Les agents pathogènes sont appelés prions. Ces maladies touchent aussi bien l'homme que l'animal. Outre leur transmissibilité, les MP se caractérisent par leur rareté, leur longue incubation, leur évolution d'un seul tenant sans réaction inflammatoire ou immunitaire et par un tableau lésionnel associant spongiose, gliose, raréfaction neuronale et dépôts le plus souvent extracellulaires de protéine prion anormale.

Sur le plan clinique, ces maladies sont caractérisées chez l'homme par une démence rapidement évolutive associée à différents symptômes neurologiques tels que les myoclonies, des troubles visuels, une ataxie, un syndrome pyramidal et/ou extrapyramidal, des crises d'épilepsie. L'évolution se fait vers un état de mutisme akinétique avec troubles de la déglutition et du contrôle des sphincters conduisant au coma et au décès du patient en mois de 6 mois en moyenne. Aucun traitement spécifique susceptible de ralentir cette évolution dramatique n'est disponible. Le diagnostic clinique est un diagnostic de probabilité reposant sur un ensemble de données cliniques et paracliniques. Seul l'examen neuropathologique du cerveau, en général obtenu post-mortem, permet le diagnostic de certitude.

Ces maladies surviennent chez l'homme de manière sporadique, génétique et infectieuse. Elles sont toutes transmissibles expérimentalement. Les agents responsables ont occasionné un certain nombre d'accident de transmission, qu'il s'agisse du passage de l'agent bovin à l'homme ou des formes iatrogènes secondaires à l'hormone de croissance d'origine humaine ayant occasionné une épidémie chez les jeunes patients receveurs.

Différents modèles expérimentaux ont contribué au développement du concept de prion (agent transmissible de nature exclusivement protéique). Ils ont notamment permis d'évaluer le caractère infectieux de différents tissus animaux ou humains et de mieux cerner les propriétés de ces agents particuliers. Ils notamment permis d'identifier différentes souches de prions, y compris chez l'homme. Chaque souche induit un phénotype clinico-pathologique qui lui est spécifique (période d'incubation, symptômes, distribution des lésions et de l'accumulation de protéine prion dans le cerveau pathologique selon un tropisme propre à chaque souche). L'efficacité des molécules anti-prion expérimentales et celle des procédés d'inactivation varient selon les souches. Il est donc fondamental de valider l'efficacité toute approche thérapeutique ou de décontamination vis-à-vis des agents rencontrés dans la population humaine.

Dans ce projet nous envisageons à l'aide d'expérience de transmission de souches d'intérêt direct en pathologie humaine 1) de surveiller les souches de prions en circulation dans la population française ; 2) d'étudier l'infectiosité des tissus périphériques ; 3) d'étudier le phénomène de tropisme de souche, ses mécanismes et ses acteurs. La nature même des souches, leur mode de dissémination ainsi que les modalités de ciblage et de destruction de zones précises du cerveau, demeurent largement méconnues alors qu'ils jouent un rôle clef dans la symptomatologie et la survie des patients ; 4) d'étudier les phénomènes de cross-seeding (qu'il soit direct par la co-agrégation de protéines spécifique ou indirect par la saturation des mécanismes cellulaires de la protéostase) entre les prions et différentes protéinopathies du SNC comme les tauopathies et la pathologie bêta-amyloïde ; 5) d'évaluer l'effet de molécules pharmacologiques et d'agents décontaminants sur la propagation des prions ; 6) d'étudier la mise en jeu et le rôle du réseau lymphatique associé aux méninges dans les maladies à prions. [SEP] L'ensemble des travaux programmés nécessitera l'utilisation de 4682 souris sur 5 ans. Les animaux utilisés seront principalement des souris transgéniques surexprimant la protéine du prion le plus souvent humaine de manière à réduire la période d'incubation qui peut dépasser deux ans. La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée 1) remplacer : l'utilisation de modèles murins conventionnels ou transgéniques est indispensable. La transmission à la souris est à ce jour la seule méthode éprouvée permettant d'isoler et de caractériser les souches humaines, de titrer l'infectiosité associée à des tissus ou des liquides biologiques, de valider l'efficacité vis-à-vis des agents humains de traitements anti-prion, d'étudier les mécanismes physiopathologiques complexes mettant en jeu in vivo des systèmes fonctionnels différents. Les résultats obtenus dans ces modèles ont une importance capitale pour i) la prévention de la transmission à l'homme (encéphalopathie spongiforme bovine, formes iatrogènes...) ii) la veille sanitaire iii) la recherche d'un traitement de référence ; 2) réduire : le nombre d'animaux par lot sera le plus réduit possible de manière à permettre une analyse lésionnelle quantifiée d'une part et biochimique d'autre part pour nous permettre de générer des données reproductibles et donc solides conformément à l'état de l'art du domaine ; 3) raffiner : les animaux sont hébergés en groupe avec un nid dans chaque cage et disposent donc d'un environnement enrichi. [SEP] L'inoculation IC sera réalisée sous anesthésie générale par stéréotaxie. L'expression clinique de la maladie est neurologique et non douloureuse. Un suivi rigoureux des animaux (points limites) permettra de limiter au maximum l'inconfort associé à la phase terminale de la maladie. [SEP] Nous recherchons également des méthodes de remplacement en développant des modèles cellulaires (neurones en cultures primaires) permissifs aux prions humains et des systèmes acellulaires de conversion de la protéine prion qui, à ce stade, ne permettent pas de surseoir à l'expérimentation animale.

18630 Certaines pathologies affectant l'œil, requièrent aux patients, l'instillation quotidienne voire pluriquotidiennes de divers collyres ophtalmiques. De nos jours, il existe un intérêt certain pour améliorer les contraintes liées à ce type de traitement, de développer des inserts ophtalmiques qui

une fois disposés sur la surface de l'œil, permettront la diffusion passive et prolongée dans le temps d'une quantité contrôlée de principe actif, augmentant ainsi son efficacité thérapeutique. Le présent projet a pour but d'étudier la validation et l'innocuité de nouveaux inserts ophtalmiques (de formulations chimiques innovantes) qui permettront une libération prolongée de principes actifs à la surface de l'œil en vue de leur utilisation future chez l'homme comme système d'administration de principes actifs sur l'œil. Ainsi dans ce contexte d'étude, ce projet de recherche vise, dans un premier temps, à contrôler les propriétés de muco-adhésion (à pH physiologique) à la surface de l'œil de ces inserts ophtalmiques (réalisés à partir de différentes formulations de polymères) ainsi que leur bonne tolérance et leur innocuité oculaires. Nous évaluerons dans un premier temps : les capacités de gélification in situ des inserts (sans principe actif) ainsi que leurs propriétés de muco-adhésion à la surface de l'œil chez des animaux naïfs (rats adultes). Les inserts seront placés sur un seul œil. En outre, cette étude permettra d'évaluer la bonne tolérance (aigüe et chronique), l'absence d'inconfort ou de sensibilité de l'œil liée à la présence continue de l'insert à la surface de l'œil. Dans un deuxième temps, nous examinerons également l'absence de signes cliniques d'inflammation et de modification histologique de la surface oculaire suite à une application hebdomadaire répétée sur 3 semaines de l'insert ophtalmique (sans principe actif). Ce projet nécessitera l'utilisation de 560 rats. Concernant la « règle des 3R » décrite au 2° de l'article R214-105, il n'existe aucune méthode alternative (in vitro) pouvant répondre aux mêmes questions sans recourir à des animaux vivants. En outre, ces expériences visent à évaluer la tolérance/l'innocuité de la pose d'inserts ophtalmiques, nécessitant des expériences comportementales et également par des évaluations ex vivo de certains marqueurs biologiques qui nécessitent le prélèvement des tissus sur des animaux euthanasiés. L'utilisation de rats est donc indispensable à ce projet. Nous limiterons au maximum le nombre d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement interprétables. Des analyses longitudinales seront réalisées sur un même animal. Les animaux seront examinés quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié de l'animalerie. L'ensemble des animaux disposera d'un enrichissement dans leur cage de stabulation (bâton à ronger et maison en carton). De plus, afin d'éviter toute souffrance animale, les animaux bénéficieront d'une anesthésie générale et/ou locale selon les procédures.

18631 Une meilleure maîtrise des conditions d'élevage couplée au progrès génétique a permis d'optimiser la croissance des poulets de chair de souches dites standard. En dépit de la technicité de ces élevages, des problèmes sanitaires peuvent survenir, notamment en lien avec une ambiance d'élevage inadaptée (température, humidité...), un aliment mal formulé (mauvaise évaluation des besoins, qualité variable des ingrédients utilisés...) ou encore l'apparition de pathogènes. En conséquence, la mortalité dans ces élevages atteint en moyenne 5% et les problèmes de santé associés limitent également la bonne efficacité alimentaire de ces animaux. Dans un contexte où l'amélioration de la durabilité des élevages est un enjeu majeur (limitation des intrants médicamenteux, amélioration du bien-être des animaux de rente, maintien de la rentabilité économique des systèmes d'élevage...), l'utilisation d'additifs alimentaires à visée d'amélioration de la santé des animaux représente une voie prometteuse.

Notre étude s'intéresse plus particulièrement aux troubles d'ordre digestif qui affectent communément les poulets de chair (par exemple infections parasitaires, microbiennes...). La santé intestinale dépend en partie du système immunitaire de l'animal mais également de facteurs extérieurs tels que l'environnement ou l'alimentation. Dans cet essai, des suppléments alimentaires en acides aminés sont testés en combinaison avec un produit antioxydant pour valider l'intérêt de l'association de tels produits dans la préservation de la santé digestive du poulet de chair de souche standard. Les bénéfices santé de chacun de ces produits candidats (additifs autorisés sur le marché en alimentation animale) ont pu être précédemment validés sur d'autres espèces et par des outils in vitro (principe de remplacement). Il s'agit ici d'évaluer l'intérêt de leur combinaison dans le cadre d'une stratégie de préservation de la santé chez le poulet de chair.

Afin d'établir cette preuve d'efficacité, nous devons reproduire des conditions physiologiques favorisant l'émergence d'un trouble digestif. Les perturbations de l'environnement intestinal se caractérisent couramment par une inflammation intestinale et une altération des fonctions barrière

des organes digestifs. Par l'administration de corticostérone (hormone produite naturellement chez le poulet en cas de stress) dans l'eau de boisson à une concentration modérée et sur une période courte (2 jours), une perturbation légère de l'intégrité intestinale est obtenue selon les critères énoncés (légère inflammation, perturbations de la barrière intestinale et de la flore digestive), mimant ainsi une prédisposition à une infection digestive. L'administration orale de corticostérone est un modèle d'étude reconnu qui reproduit les mêmes réactions hormonales observées chez le poulet lors d'un événement stressant (production de corticostérone par les glandes surrénales).

Un seul essai est à ce jour prévu (sur une période de 35 jours d'élevage) mais pourrait être reconduit avec de nouveaux additifs préalablement identifiés (même procédure, seul l'aliment changerait). Ce test serait mené sur un total de 175 poulets de souches standard ROSS PM3 (7 animaux/cage en suivant les réglementations en vigueur avec 5 cages représentant des réplicats et 5 traitements expérimentaux). Il s'agit du nombre minimum d'animaux nécessaire à l'obtention d'une bonne puissance statistique (principe de réduction).

Dans cette expérimentation, le principe de raffinement est assuré par plusieurs voies. Pour ce faire les animaux sont élevés à plusieurs en cages aux normes (Directive 1999/74/CE) et enrichies (Directive 2010/63/UE, Décret n°2013-118) d'un système de balles pendues ce qui permet aux animaux d'élargir leur gamme d'activité. Ils profitent également d'une radio qui leur apporte une ambiance sonore et les apaise. Dans un souci de réduction de l'angoisse et du stress des animaux élevés en cages, l'animalerie a été construite de telle sorte que les animaux puissent interagir entre eux : ils se voient, s'entendent et peuvent se toucher. Pendant toute la durée de l'élevage, les animaux sont élevés dans des conditions d'ambiance optimales de température, d'humidité et de luminosité en accord avec les recommandations des sélectionneurs. Le dispositif de cages utilisé est conforme à la réglementation en termes de surface par animal. Un tel dispositif assure une bonne répétabilité des mesures (plusieurs cages utilisées par traitement, dans les mêmes conditions d'élevage ce qui limite la variabilité) et permet de mieux contrôler les conditions d'ambiance.

18632 Le projet vise à l'étude des récepteurs ionotropiques du glutamate (iGluRs), qui font partie d'une grande famille de récepteurs-canaux aux neurotransmetteurs activés par le neurotransmetteur glutamate et fortement présents dans le système nerveux central des Vertébrés. Les iGluRs jouent un rôle central dans la communication neuronale et le fonctionnement des circuits neuronaux. L'objectif de ce projet est triple : 1/ disséquer les mécanismes moléculaires et structuraux régissant le fonctionnement des iGluRs ; 2/ identifier et caractériser de nouveaux sites et ligands modulateurs en vue du développement d'une nouvelle pharmacologie ; 3/ évaluer et comprendre l'importance de la régulation des différentes sous-populations de iGluRs dans la physiologie et la pathologie de la transmission excitatrice.

Ce projet devrait permettre des avancées scientifiques sur la biologie des iGluRs et sur la régulation des signalisations neuronales et des fonctions cérébrales et comportementales associées, ainsi que sur la mise au point de nouveaux agents d'intérêt thérapeutique en neurologie et psychiatrie.

Le recours à l'expérimentation animale concerne deux types d'animaux, l'amphibien *Xenopus laevis* (Xénope) d'une part et les rongeurs (souris) d'autre part. Le Xénope est utilisé principalement comme source d'ovocytes, ces cellules étant utilisées comme vecteur d'expression pour les récepteurs recombinants. Nous utiliserons aussi, de façon ponctuelle, des têtards de Xénope pour tester l'effet de modulateurs des iGluRs sur leur comportement. Les têtards sont une bonne alternative à l'utilisation de rongeurs pour des études phénotypiques et comportementales simples, permettant ainsi une diminution de la quantité de rongeurs à utiliser. Les rongeurs sont eux utilisés soit comme source de cellules ou tissus nerveux (dissection post-mortem) soit comme modèle animal pour étudier les rôles et l'importance des iGluRs dans le fonctionnement cérébral et le comportement. Les expériences proposées seront réalisées soit *in vitro* sur des préparations d'animaux euthanasiés soit *in vivo* sur des animaux (rongeurs) vigiles en comportement.

Justification du choix des espèces animales utilisées :

Batraciens (*Xenopus laevis*) : Le système d'expression en ovocytes de Xénopes est très largement utilisé en laboratoire de par le monde du fait de la grande taille et robustesse des ovocytes facilitant ainsi leur manipulation et permettant la production de quantités importantes de protéines recombinantes. Sur la durée du projet, le nombre de Xénopes est estimé à 100.

Rongeurs : Un impératif concernant les études sur récepteurs natifs est de conserver l'intégrité membranaire de cellules isolées (cultures de neurones) ou l'intégrité d'un réseau neuronal afin de préserver les connexions synaptiques. A ces fins, il n'existe, à ce jour, aucune méthode alternative à l'utilisation de modèle rongeurs. Sur la durée du projet, le nombre maximum d'animaux est estimé à 850 souris.

La réalisation de ce projet se fera suivant les règles de bonnes pratiques d'expérimentation animale et tout sera mis en oeuvre pour respecter le plus strictement la règle des 3R ('Remplacer, Réduire, Raffiner'). Tous les animaux sont maintenus dans des animaleries spécialement dédiées selon l'espèce animale, dans les conditions standards d'hébergement :

1/ Les grenouilles sont hébergées dans des bacs de taille conforme à la réglementation en vigueur, dont la température, l'hydrométrie, la qualité de l'eau et le cycle lumineux sont contrôlés. L'eau des bacs contenant les animaux est continuellement renouvelée. L'alimentation des animaux est à base de granulés pour poissons et amphibiens. Des tubes en plastique sont mis dans les bacs afin de permettre un enrichissement de leur milieu de vie.

2/ Les rongeurs sont hébergés dans des portoirs ventilés, avec un nombre limité d'animaux par cage, conforme à la réglementation. Ils ont à disposition de la nourriture (en granulés) et de l'eau ad libitum, avec différents programmes d'enrichissements (bandes cartonnées en accordéon et boudins en papier à dépiauter). La température, l'hydrométrie et le cycle lumineux sont contrôlés.

Les animaux impliqués dans ce projet seront surveillés quotidiennement. Le nombre d'animaux utilisés sera réduit autant que possible et tout sera fait pour minimiser la souffrance des animaux. Seules des procédures d'anesthésie et d'euthanasie dûment validées seront utilisées. Enfin les expériences réalisées seront optimisées dans la mesure du possible et les manipulations in vitro seront utilisées à la place du modèle in vivo dès que la problématique le permet.

18633 Il a été démontré que l'efficacité des traitements de chimiothérapie et radiothérapie dépend de la réponse immunitaire anti-tumorale, souvent à travers l'induction de la mort cellulaire immunogène (ICD, de l'anglais « immunogenic cell death »). Les inhibiteurs d'ALK (de l'anglais « Anaplastic lymphoma kinase »), kinase responsable du lymphome pédiatrique anaplastique à grandes cellules (ALCL) ont été montrées capables d'induire l'ICD in vitro. Nous souhaitons valider ces résultats dans un modèle de vaccination anti-tumorale chez la souris. Dans ce contexte, les cellules murines traitées in vitro avec un inducteur d'ICD et injectés dans des souris immunocompétentes réduisent l'apparition de tumeurs lors d'une injection ultérieure des cellules tumorales vivantes du même type. Ensuite, nous étudierons si l'efficacité des inhibiteurs d'ALK peut être amélioré en combinaison avec des molécules dites « immune checkpoint blockers », qui stimulent la réponse immunitaire anticancéreuse. Les procédures expérimentales mises en jeu respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement. Remplacement : Ce projet nécessite l'implication d'animaux vivants car il est actuellement impossible de reconstituer un système immunitaire in vitro/ex vivo du fait de sa complexité. Réduction : Ce projet nécessitera au maximum de 510 souris (dont 390 immunocompétentes et 120 immunodéficientes). Ce projet d'une durée de 2 ans prévoit des expériences de vaccination et croissance tumorales. L'étude sera arrêtée si les résultats invalident l'hypothèse de travail. Les expérimentations seront par ailleurs regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. Par ailleurs, une veille bibliographique constante sera faite pour éviter toute manipulation déjà rapportée dans la littérature. Raffinement : Les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux. Le personnel impliqué dans ce projet est qualifié et expérimenté sur le plan technique et par ailleurs formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale. Au cours de l'expérimentation, les animaux seront hébergés dans le respect de leur bien-être et disposeront de coton dans les cages. Les animaux seront acclimatés pendant une semaine avant le début de l'expérimentation. La surveillance régulière permettra le suivi du comportement

(prostration, autoagression, etc) et de la croissance tumorale, afin d'euthanasier les animaux dès qu'ils atteignent un point limite.

18634 L'hypertension pulmonaire (HTP) est une maladie mortelle affectant l'arbre vasculaire pulmonaire. L'HTP est de plus en plus prévalente au niveau mondial avec d'importants besoins médicaux non satisfaits. En réponse à des stress

hormonaux, inflammatoires et environnementaux tels que l'hypoxie ou la distension vasculaire, les fibroblastes adventitiels de l'artère pulmonaire (FAAP) sont les premières cellules de la paroi vasculaire à s'activer.

Nous avons mené toutes nos études sur des tissus pulmonaires obtenus lors de transplantation ou de chirurgie thoracique, ainsi que sur des cultures de FAAP humain de patients témoins et HTP (Principe de remplacement). Nos travaux montrent que le dépôt de collagène périvasculaire produit par les FAAP et le remodelage de la matrice extracellulaire qui rigidifie les artères pulmonaires, reposent sur le métabolisme de la proline et de la glycine. Afin de mesurer l'impact de la modulation de ce métabolisme sur l'évolution de la maladie et son transfert vers une nouvelle thérapie de l'HTAP, nous devons maintenant tester l'effet de la restriction en certains acides aminés nécessaires à ce métabolisme dans des modèles précliniques pertinents de la maladie. Les meilleurs modèles existant étant des modèles développés chez le rat, et miment parfaitement les caractéristiques hémodynamiques et morphologiques principales de la maladie humaine.

Utiliser des modèles d'HTP chez le rat est incontournable pour s'assurer de l'efficacité et de la sécurité de ces restrictions sur la santé des malades. Il est en effet crucial de vérifier que ces restrictions n'ont pas d'effets indésirables notamment sur le cœur de ces animaux, qui est très impacté par l'HTP.

Toutes les procédures seront pratiquées en utilisant des anesthésiques et des analgésiques. Les fonctions cardiovasculaires seront étudiées au cours du temps par des méthodes non invasives comme l'échocardiographie, permettant de limiter le nombre d'animaux utilisés. Les animaux sont mis à mort en fin d'expérimentation après un dernier bilan (cathétérisme) de leur fonction cardiaque, et les tissus prélevés sont partagés afin de minimiser encore le nombre d'animaux utilisés. Des expériences de biochimie et de biologie moléculaire à partir des différents tissus collectés et des études sur cellules isolées seront effectuées dans la mesure du possible afin de réduire le nombre d'animaux utilisés. Ainsi, toutes les procédures de ce projet sont conçues pour respecter le principe des 3 R (Réduction, Raffinement, Remplacement). De l'enrichissement sera ajouté dans les cages des animaux. Les animaux seront surveillés quotidiennement et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer que les animaux ne subissent aucun stress. Le nombre total de rats utilisés sera de 192 sur l'ensemble de l'étude en combinant plusieurs approches expérimentales par différents expérimentateurs sur le même animal.

L'HTP est une cause de handicap, d'insuffisance cardiaque et de mort. Au vu de l'absence de thérapie visant la rigidification des artères pulmonaires dans l'HTP, ce projet présente une utilité majeure dans la prise en charge de ces malades.

18635 L'ocytocine est une molécule libérée par les neurones du cerveau, connue pour son rôle dans la lactation et lors de l'accouchement. Cependant, des études récentes montrent que l'ocytocine a aussi une action sur le cerveau lui-même, et que cette action favoriserait les comportements sociaux et maternels. Ainsi, l'ocytocine est considérée comme une hormone ayant un effet « pro-social » mais ses mécanismes d'action sont encore méconnus. L'objectif de cette étude est de comprendre comment l'ocytocine agit sur les neurones du cerveau lors des comportements maternels.

Chez la plupart des mammifères, l'olfaction joue un rôle central pour les interactions entre individus et en particulier entre adultes et leurs progénitures. Chez la souris, le cortex olfactif présente une densité exceptionnelle de récepteurs à l'ocytocine par rapport à d'autres régions cérébrales, notamment chez les femelles, avec une densité accrue chez les mères par rapport à des femelles vierges. Aux vues de cette forte expression chez les mères, nous avons fait l'hypothèse que

l'ocytocine dans le cortex olfactif est nécessaire à la mise en place de comportements maternels chez les souris femelles.

Afin de tester cette hypothèse, nous proposons de réaliser des expériences de comportement en présence de souriceaux âgés de 1 à 10 jours, et de manipuler la transmission ocytocinergique dans le cortex olfactif pour tester le rôle de l'ocytocine dans ces comportements.

Afin de pouvoir tester le rôle de l'ocytocine, nous utiliserons des méthodes qui permettent de cibler les neurones capables de libérer de l'ocytocine ou bien les neurones qui répondent à l'ocytocine lorsqu'elle a été libérée. Pour cela, des injections d'agents pharmacologiques seront nécessaires et nous devons faire exprimer des molécules spécifiques dans le cerveau grâce à l'expression d'un adénovirus. Ceci nécessite des interventions chirurgicales de courte durée et sous anesthésie profonde, pour injecter l'adénovirus de manière très précise dans la région cérébrale cible ou pour réaliser les implants cérébraux nécessaires aux manipulations futures. Via ces approches, nous pourrions tester l'impact des neurones ocytocinergiques dans la région cible (cortex olfactif) lors de tâches comportementales en présence de souriceaux. Nous quantifierons alors l'expression des comportements maternels dans nos souris testées tout en veillant au bien-être des souriceaux.

- Remplacement :

La souris fait partie de la famille des Vertébrés, comme l'Homme, et elle est capable de fonctions cognitives relativement complexes : elle représente donc un modèle d'étude particulièrement intéressant pour comprendre le fonctionnement du cerveau humain. Nous étudierons les circuits neuronaux des souris alors que ces dernières effectueront une tâche comportementale : il nous faudra donc travailler avec des animaux vigiles. Par conséquent, il nous sera impossible de conduire cette étude *in vitro*. Enfin, dans l'état des connaissances actuelles, les questions que nous adressons ne peuvent malheureusement pas être réalisées *in silico*.

- Réduction :

Le nombre total d'animaux requis pour ce projet est de 1960 souris sur 5 ans. Nous prévoyons de minimiser ce nombre en utilisant les mêmes souris plusieurs fois, dans des tests différents, avec ou sans intervention sur le système ocytocinergique. Ce nombre sera réduit davantage grâce à nos études pilotes qui permettront une optimisation des paramètres de nos expériences.

- Raffinement :

Nos souris seront hébergées en portoir ventilé, dans des conditions qui favorisent l'expression de leurs comportements naturels : petits groupes sociaux (maximum 5 souris par cage) au moins jusqu'au début des tests comportementaux, cages enrichies d'éléments permettant de construire un nid (carré de coton, petites maisons en carton, frises de papier kraft) ou de favoriser l'exploration (jouets). Le bien-être de chaque animal sera évalué quotidiennement et une fiche de suivi individuel sera créée pour chaque procédure expérimentale. A partir des critères définis dans ces fiches, les expérimentateurs et techniciens animaliers seront informés des procédures à suivre pour limiter toute souffrance chez nos souris.

18636 La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est une pneumopathie interstitielle fibrosante caractérisée par l'accumulation de tissu conjonctif dans les poumons conduisant à une insuffisance respiratoire restrictive d'évolution fatale. En l'absence de traitement efficace, la médiane de survie à partir du diagnostic de FPI est d'environ 3 ans avec une évolution de la maladie variable selon les patients. La FPI est très souvent associée aux apnées du sommeil qui sont caractérisées par des pauses respiratoires récurrentes dues à un rétrécissement /collapsus des voies aériennes supérieures et/ou à un arrêt périodique du réseau respiratoire ponto-bulbaire au cours du sommeil, conduisant à des épisodes répétés d'hypoxie-réoxygénation. Ces apnées nocturnes constituent un stress d'hypoxie intermittente chronique (HIC), particulièrement délétères du fait du stress oxydant et de l'inflammation de bas grade qu'elles génèrent. Dans une étude récente il a été sur un modèle murin de fibrose induite par la bléomycine que l'HIC conduisait à une surmortalité des souris ainsi qu'à une aggravation de la fibrose pulmonaire avec une accumulation de collagène pulmonaire se traduisant par une altération de la mécanique ventilatoire. D'autre part les premiers résultats obtenus sur un modèle murins de pathologie pulmonaire aiguë induite à la bléomycine suggèrent

également une modification de la mécanique ventilatoire affectant les échanges gazeux au niveau pulmonaire se traduisant par une diminution de la saturation. Ces résultats sont conformes à ce qui est observé dans les pathologies pulmonaires interstitielles pour lesquelles on observe une dyspnée, une atteinte des régulations ventilatoires caractérisées par une faible valeur de capacité vitale forcée associée avec une augmentation de la fréquence respiratoire et une diminution du volume courant. Il a également été rapporté une diminution de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie chez des patients souffrant de fibrose pulmonaire.

Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'aggravation de la fibrose pulmonaire par l'exposition à de l'hypoxie intermittente sont actuellement mal connus. Il est intéressant d'étudier les mécanismes pouvant jouer un rôle et plus particulièrement à l'implication potentielle du stress du réticulum endoplasmique. En effet, le rôle délétère du stress du réticulum endoplasmique (RE) dans la fibrose pulmonaire (FP) a été décrit par plusieurs travaux *in vivo*, de plus, ces marqueurs ont également été retrouvés au niveau pulmonaire chez les patients atteints de FPI. De plus, ces marqueurs de stress sont induit en réponse à l'HI au niveau pulmonaire. De manière intéressante, nos résultats préliminaires, ont montré que le stress du RE serait un facteur impliqué dans l'effet aggravant de l'HI sur la FPI dans un modèle murin de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine, exposé à de l'HI.

L'objectif visé dans ce projet est donc de confirmer cette implication de ce stress dans cet effet aggravant de l'HI sur la fibrose pulmonaire en utilisant un inhibiteur connu du stress du RE, le TUDCA. Nous émettons l'hypothèse que l'utilisation de cette inhibiteur limiterait le développement d'une fibrose sévère chez les souris exposées à l'HI et traitées comparées aux souris exposées à l'HI et non traitées.

La vérification de cette hypothèse nécessitera une induction d'une fibrose pulmonaire *in vivo*. De plus, il n'existe pas à ce jour de méthode alternative à l'expérimentation *in vivo* pour étudier l'impact de l'hypoxie intermittente sur les mécanismes de fibrogenèse pulmonaire ni pour l'étude de la commande centrale respiratoire. L'utilisation d'un modèle murin ne peut donc être remplacé. Le nombre d'animaux qui sera utilisé dans ce projet sera de 180 souris sur 3 ans et se fera en accord avec la règle des 3R. En effet, ce nombre a été limité au minimum pour obtenir une puissance statistique suffisante. Un suivi quotidien sera mis en place pour éviter toute souffrance inutile des animaux et des points limites les plus précoces possible en fonction de l'objectif de l'expérimentation seront établis, en effet, les animaux seront anesthésiés avant toute procédure nécessitant une mise en sommeil des souris.

18637 Intitulé du projet : Optimisation des protocoles expérimentaux comportementaux chez la souris pour augmenter la puissance statistique

Durée du projet (en mois) :36

Mots-clés (maximum 5) : Puissance statistique ; raffinement expérimentation animale.

Finalité du projet : Recherche fondamentale

Objectifs et bénéfices escomptés du projet : La puissance statistique est la probabilité qu'une procédure expérimentale soit capable de mettre en évidence un effet lorsque celui-ci existe. Une étude à faible puissance statistique risque donc de négliger un effet réel et de produire ainsi un résultat faux négatif. Le coût d'une telle erreur expérimentale est important d'un point de vue économique (temps et ressources gaspillés) et éthique (utilisation de procédures expérimentales invasives chez l'homme ou les animaux de laboratoire qui n'amènent pas à une réponse correcte à la question scientifique). Il est connu que la puissance statistique augmente avec la taille de l'échantillon. La procédure commune pour augmenter ce facteur consiste donc à augmenter le nombre des sujets/animaux utilisés dans les expériences scientifiques. Mais il y a-t-il d'autres paramètres expérimentaux modifiables par l'expérimentateur permettant d'augmenter la puissance statistique à parité du nombre de sujets/animaux utilisés ? Une simulation statistique nous montre que, dans le domaine des expériences comportementales, on peut augmenter la puissance statistique à travers une augmentation du nombre de répétitions de la tâche comportementale effectué par le sujet/animale ainsi que à travers une diminution de la probabilité que le sujet/animale

donne la réponse correcte par hasard. D'un point de vue théorique on peut donc planifier des protocoles comportementaux puissants, avec un nombre réduit de sujets/animaux expérimentaux, en jouant sur ces deux paramètres. L'objectif de ce projet est de donner une validation expérimentale à la prévision théorique produite par la simulation statistique. Pour cela nous utiliserons des protocoles comportementaux chez la souris dans lesquels nous ferons varier ces deux paramètres afin de vérifier leur impact sur la puissance statistique. Dans ces protocoles les souris vont apprendre à retrouver une récompense alimentaire (un morceau de Kellogs) à l'intérieur d'un labyrinthe grâce à un indice olfactif.

Nuisances prévues : Les protocoles utilisées seront faiblement invasifs pour les animaux. Il sera mise en place une restriction alimentaire (une réduction de la quantité de nourriture fournie), qui a été montré n'avoir pas d'impact sur leurs états de santé. Cette restriction alimentaire est indispensable pour motiver les animaux à accomplir la tâche

Remplacement :

L'objectif du projet est de montrer que les expériences comportementales chez le modèle animale peuvent être effectuées avec un nombre d'animaux réduit par rapport au nombre actuellement utilisé dans les laboratoires de recherche. Une simulation statistique nous suggère que cette réduction est possible en modifiant certains des paramètres de la procédure expérimentale. Pour valider cette prédiction théorique est nécessaire évaluer les conséquences de ces modifications lors des expériences réelles chez l'animale. Pour que nos résultats puissent avoir un large impact il est donc important que cette évaluation soit faite dans un modèle animal largement utilisée dans les expériences comportementales, dont le choix de la souris.

Réduction:

Le nombre d'animaux utilisés dans chaque type d'expérience sera adapté de façon à n'utiliser que l'effectif d'animaux nécessaire à la validation statistique des effets observés. L'outil de simulation de puissance statistique que nous avons développé ainsi que le résultat d'expériences pilotes déjà effectués dans le cadre d'une autre étude nous ont permis de déterminer ce nombre. Basé sur ces informations, une autorisation pour un nombre maximal de 100 animaux sur une période de 3 ans est demandée ; ceci prend en compte d'éventuelles pertes dues aux critères d'arrêt de la procédure expérimentale. A la fin du projet, les animaux seront proposés à la réutilisation dans d'autres projets de recherche du laboratoire, après avis favorable du vétérinaire.

Raffinement:

Les souris seront hébergées en groupes de 3/5 animaux dans des cages présentant des éléments d'enrichissement (cachettes, éléments de nidification, bois à grignoter) dans notre animalerie agréée avec boisson ad libitum.

18638 L'athérosclérose est un problème de santé publique, responsable d'atteinte des vaisseaux du cœur (pouvant conduire à des infarctus du myocarde), du cerveau (responsable d'accidents vasculaires cérébraux) et des membres inférieurs (pouvant conduire à l'amputation). Il s'agit de la première cause de mortalité dans le monde, représentant 18 millions de décès par an, soit 30% des décès (source OMS).

Le traitement de l'athérosclérose fait à l'heure actuelle principalement appel aux traitements diminuant le taux de cholestérol, dont les statines.

Néanmoins, le rôle de l'inflammation dans l'athérosclérose est avéré dans l'athérosclérose: accumulation de cellules inflammatoires, diminution des lésions athérosclérotiques dans des modèles murins chez lesquels certaines cellules inflammatoires sont déficientes, et effet des traitements immunosuppresseurs. Cela a engendré la réalisation de 4 essais cliniques de traitements modifiant l'immunité chez l'Homme en prévention de récurrence de maladies liées à l'athérosclérose : le méthotrexate (absence d'efficacité), la colchicine (diminution de 25-30% des événements cardiovasculaires dans 2 essais) et le canakinumab (inhibiteur de l'interleukine-1beta, diminution de 15% des événements cardiovasculaires).

Les souris C57Bl/6J ApoE^{-/-} sont mutées sur le gène codant pour l'apolipoprotéine E. Cette protéine est nécessaire pour la prise en charge des particules de graisse appelées chylomicrons et VLDL (very low-density lipoprotein). Les souris C57Bl/6J ApoE^{-/-} ont donc une augmentation du taux de cholestérol importante, responsable de l'apparition de plaques d'athérosclérose dès 10 semaines de vie et qui reproduisent beaucoup de caractéristiques de celles rencontrées chez l'Homme (notamment leur localisation et leur composition). Ce processus peut être accéléré par différents procédés, notamment par un régime riche en cholestérol ou l'induction d'une insuffisance rénale. Néanmoins, peu de données existent concernant l'inflammation sur ces différents modèles, alors qu'ils permettraient de pouvoir essayer des traitements susceptibles de ralentir voire de faire régresser les plaques d'athérosclérose en ciblant notamment la composante inflammatoire.

L'objectif de ce projet est d'étudier différentes méthodes d'accélération du processus d'athérosclérose chez la souris C57Bl/6J ApoE^{-/-} : régime riche en cholestérol, induction d'une atteinte des reins, l'association des 2 procédés. La progression de l'athérosclérose sera évaluée par dosage sanguin de cytokines inflammatoires, réalisation d'une tomographie par émission de positons couplée à une imagerie par résonance magnétique, cytométrie de flux sur l'aorte et anatomopathologie avec immunomarquages de l'aorte.

Dans cette étude, nous utiliserons 4 groupes de souris : souris ApoE^{-/-} sous régime standard, souris ApoE^{-/-} sous régime riche en cholestérol, souris ApoE^{-/-} chez lesquelles on induit une insuffisance rénale par ablation d'un rein, souris ApoE^{-/-} chez lesquelles on induit une insuffisance rénale et nourries par un régime riche en cholestérol. Dans un souci de réduire le nombre d'animaux, nous utiliserons 15 souris par groupe, ce qui représente le nombre minimal afin d'obtenir des comparaisons fiables. De plus, 10 souris seront utilisées afin de mettre au point les techniques, soit un total de 70 souris.

Ce travail nécessite l'utilisation de souris, le recours à des modèles alternatifs n'étant pas opportun car les prélèvements humains d'athérosclérose sont rares et ne permettent pas de mettre en évidence l'efficacité d'éventuels traitements. De plus le remplacement n'est pas possible dans cette étude puisque l'atteinte athéroscléreuse ne peut être correctement étudiée que sur l'aorte en entier. Enfin, il n'existe pas de lignée cellulaire d'aorte appropriée.

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

18639 L'obésité est un problème majeur de santé publique à l'échelle mondiale. Actuellement, plus de 300 millions de personnes sont obèses et ce nombre ne cesse de s'accroître. Ces patients ont un risque accru de développer des pathologies chroniques telles que le diabète de type 2, les maladies cardiovasculaires et plusieurs types de cancers. Soigner l'obésité permettrait de réduire de manière significative l'incidence de toutes ces maladies associées. Malheureusement, les traitements existants à l'heure actuelle sont peu efficaces et les régimes hypocaloriques ne conduisent qu'à

une perte de poids temporaire, suivie très fréquemment par un retour rapide au poids initial dès la fin du régime.

Afin d'envisager de nouvelles thérapies, il est nécessaire de mieux connaître les phénomènes biologiques qui régulent prise alimentaire et poids corporel.

Nous nous intéressons à une famille de protéine connue pour réguler l'oxydation et le transport des acides gras. Le dernier membre de cette famille à avoir été découvert est localisé au niveau des neurones, un type de cellule qui n'utilise que peu, les acides gras comme combustible. Chez la souris, la suppression globale de ce gène entraîne une exacerbation de la prise de poids lorsque les souris sont mises sous un régime riche en graisse (RRG).

Ce gène semble jouer un rôle important au niveau du cerveau et plus particulièrement au niveau de l'hypothalamus, structure connue pour son implication dans la régulation de la prise alimentaire et du poids corporel. En effet, la restauration de ce gène dans cette structure, chez des souris qui ne l'ont plus, va inverser la prise de poids excessive observée sous régime RRG.

Afin d'apporter un nouvel éclairage sur l'importance ce gène au niveau de l'hypothalamus et son rôle dans l'établissement de l'obésité centrale et la progression du diabète, nous souhaitons utiliser des souris chez qui ce gène aura été inactivé localement au niveau de cette structure.

Nous utiliserons un maximum de 48 souris adultes mâles et femelles (âgées d'au moins 8 semaines,) sur une période de 2 ans. La souris est un modèle de choix car la physiologie générale est suffisamment proche de celle de l'Homme. De plus, la possibilité de manipuler les gènes de la souris, dans notre cas en inactivant notre gène d'intérêt au niveau des neurones de l'hypothalamus, en fait l'animal de laboratoire par excellence. Dans ce projet de physiologie intégrée, nous étudions des phénomènes impliquant une communication bidirectionnelle entre le cerveau et le reste de l'organisme, que ce soit pour la régulation de l'appétit, de la glycémie ou encore le stockage de graisse. Il n'existe à ce jour aucune méthode alternative ou substitutive permettant un remplacement in vitro ou in silico. Afin de respecter la règle des 3Rs, nous avons optimisé les protocoles pour réduire au maximum le nombre de souris utilisées : des tests de puissance statistique ont été employés pour calculer le plus petit nombre d'animaux nécessaire à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Enfin, dans un souci de raffinement des procédures, un soin particulier est apporté aux questions relatives au bien-être animal. L'évaluation des paramètres métaboliques nécessite un isolement de l'animal. Les souris sont hébergées en cages individuelles dans un système dédiée mimant au maximum les conditions habituelles d'hébergement, système dit « home cage », avec régulation de la température, de l'humidité et de la luminosité. Le manque d'interactions sociales est compensé par un enrichissement des cages (carré de cellulose, bâtonnets en bois), et en maintenant le contact visuel, et olfactif. Avant les expériences et pour réduire au maximum le stress des animaux, ces derniers sont manipulés en utilisant un tunnel en carton présent dans la cage.

Les informations apportées par ce projet nous permettront d'accroître nos connaissances et d'élucider une partie du dialogue complexe entre l'hypothalamus et les organes périphériques, et de déterminer si ce gène peut être considéré comme une cible thérapeutique intéressante pour le développement de nouveaux médicaments.

18640 De nombreuses recherches actuelles portent sur l'utilisation de méthodes alternatives et/ou raffinées (règle des 3R) à l'expérimentation sur les dits « gros » animaux (animaux de ferme tels que les ruminants ou les porcs). Dans ce contexte, en vue de réduire l'utilisation massive de vaches en installation expérimentale, et dans le cadre d'études focalisées sur le microbiote intestinal bovin, des essais de transplantation fécale bovine chez des rats axéniques sont proposés. L'utilisation de ce modèle permettrait en effet de :

i/ réduire le nombre d'animaux puisque l'utilisation d'un nombre moins important de rongeurs axéniques par rapport au nombre de vaches serait suffisant pour permettre une exploitation statistique satisfaisante des résultats (ce qui est dû à une variabilité inter-individuelle beaucoup plus faible chez le rongeur axénique). Plus précisément, moins d'animaux seraient nécessaires par traitement, et ceci, ajouté aux conditions d'expérimentation plus aisée sur les rongeurs que sur les

gros animaux permettraient de tester bien plus de traitements par expérimentation et de limiter considérablement le nombre d'animaux appartenant au groupe contrôle.

ii/ remplacer l'utilisation de gros animaux en installation expérimentale (vaches) par un nombre réduit d'animaux (rongeurs gnotobiotiques) puisque l'étude du microbiote intestinal bovin éventuellement soumis à des contraintes environnementales ou l'impact d'agents pathogènes intestinaux et des solutions de remédiation sur celui-ci, ne peuvent être évalués que sur un organisme vivant pris dans sa globalité.

iii/ raffiner les conditions expérimentales sur un nombre moins élevé d'animaux grâce à l'utilisation de ce modèle. Le suivi du microbiote fécal étant la base de notre projet, des prélèvements fécaux très réguliers et/ou en cinétique est possible chez les rongeurs car le matériel fécal est disponible quasiment en continu sans procédure particulière, alors que chez la vache, des prélèvements répétés directement dans l'ampoule rectale constituent une procédure invasive en elle-même et se font très rarement sans douleur et inflammation.

iv/ réduire les risques sanitaires lors de l'expérimentation puisque la surveillance de rongeurs est plus facile à gérer que celle de gros animaux.

Il est important de préciser qu'il ne s'agit en aucun d'un modèle de digestion puisque l'anatomo-physiologie du système digestif n'est évidemment pas la même chez le polygastrique ou le monogastrique, ce modèle servira uniquement à des études portant sur le compartiment du côlon et en particulier sur le microbiote qu'il héberge. La validation d'un tel modèle permettrait par exemple l'étude de l'effet d'additifs alimentaires sur le microbiote digestif bovin en dysbioses (acidose ruminale, présence d'agents pathogènes...), ainsi que l'évaluation de la réponse du microbiote à différents stress environnementaux. Notons qu'une transplantation fécale bovine a déjà été réalisée avec succès dans un modèle murin.

Dans l'essai de transplantation fécale bovine proposé, trois microbiotes bovins différents (prélevés chez des vaches ayant des régimes alimentaires différents) seront inoculés chez des rats axéniques afin de valider ce modèle. Nous prévoyons au maximum 4 séries d'expérimentations de ce type pour valider le modèle. Si les premiers résultats montrent que le modèle est satisfaisant dès la première série d'expérimentation, nous n'utiliserons pas les animaux supplémentaires autorisés afin de réduire au maximum le nombre d'animaux en expérimentation.

Pour respecter la règle des 3R, le nombre d'animaux (n=120 au maximum) a été déterminé sur la base de la bibliographie et d'une puissance statistique nécessaire à la validation du modèle, permettant une utilisation réduite du nombre d'animaux. Tout au long de l'expérimentation, une surveillance quotidienne sera mise en place pour détecter, réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse subie par les animaux.

18641 La migraine est un désordre neurovasculaire caractérisé par des crises récurrentes de céphalées accompagnées de troubles neurologiques variables dont l'allodynie cutanée céphalique (sensation douloureuse au toucher léger). Ce symptôme est le plus fréquent chez les patients atteints de migraine. Il affecte 60 à 80% des patients souffrant de migraine chronique. De plus, l'apparition de l'allodynie est considérée comme un facteur de risque de chronicisation de la migraine. Les traitements antalgiques de la migraine restent encore de nos jours insatisfaisants. En effet, les traitements de crise à base de triptans ou même d'opioïdes ont une efficacité relativement limitée et peuvent provoquer des effets indésirables importants et un abus médicamenteux. D'autres cibles moléculaires peuvent cependant être envisagées avec en particulier les inhibiteurs d'enképhalinases (IENk) qui bloquent la dégradation des opioïdes endogènes. Ces composés constituent un nouvel espoir dans le traitement de la migraine car, en plus d'être dénués des effets secondaires des opioïdes, des travaux préliminaires ont montré une activité antalgique dans un modèle de migraine par donneur de NO chez le rat. Ce modèle, utilisé dans ce projet, permet de mesurer une allodynie mécanique céphalique après injection systémique intrapéritonéale d'ISDN, un donneur de NO (monoxyde d'azote) connu chez l'homme pour déclencher des crises de migraine. Ce projet est de tester dans ce modèle l'association de deux composés : le sumatriptan

(antimigraineux de référence) et un IEnk afin de montrer si cette association peut induire une interaction positive, c'est-à-dire une

analgésie supérieure à l'addition des effets des deux molécules prises individuellement (synergie). Pour ce faire, chez le rat, plusieurs doses de sumatriptan et d'un IEnk ont été testées afin de déterminer la dose efficace 50% (ED50, dose qui permet d'obtenir 50 % de l'effet antalgique maximal) pour chacun d'eux. A partir de ces valeurs une étude isobologique sera menée pour définir la nature de l'interaction entre les 2 composés. Ainsi une courbe dose réponse de l'association sera obtenue après administration des 3 associations suivantes : (ED50 IEnk+ED50 sumatriptan)/2, (ED50 IEnk+ED50 sumatriptan)/4, (ED50 IEnk+ED50 sumatriptan)/8. A partir de là, l'ED50 de l'association sera calculée pour construire l'isobogramme et comparée aux ED50 individuelles. Cette comparaison permettra de déterminer si l'association des 2 composés conduit à un effet antalgique additif ou synergique. Durant ce projet, nous mesurerons après chaque injection la sensibilité cutanée par l'application mécanique de filaments de von Frey permettant de détecter un seuil (en g) de retrait facial et donc une allodynie en cas de baisse de

ce seuil. Ces mesures seront effectuées après injection ISDN (10mg/kg) toutes les 30 minutes pendant 4h chez le rat vigile. Chaque injection d'ISDN sera précédée 10 minutes avant par une administration orale de IEnk, de sumatriptan ou de serum physiologique.

Dans la première phase de ce projet, il convenait d'établir les ED50s respectives du sumatriptan et de l'IEnk à partir de 3 groupes d'animaux pour 3 doses de ces deux composés. Il s'est avéré que les valeurs antiallo-dyniques obtenues n'ont pas permis de déterminer les ED50 car les doses utilisées ont provoqué un effet antiallo-dynique trop important même pour les doses les plus faibles. Ainsi, nous nous voyons contraints d'augmenter le nombre de groupe d'animaux : 2 doses (par composé) inférieures à celles utilisées dans la version initiale du projet donc 2 groupe de 10 animaux par composé donc au final 40 animaux supplémentaires.

Au final, une fois cette première phase terminée (ED50 déterminées, l'étude isobologique pourra être réalisée et nos résultats permettront de montrer si l'association de IEnk et sumatriptan (à des doses faibles) est aussi efficace dans le traitement de l'allodynie que les composés seuls (à des doses plus élevées) et offrant ainsi un élément de plus dans l'arsenal thérapeutique anti-migraineux qui, de plus, réduirait ainsi les risques d'effet secondaires comme l'abus médicamenteux (lui même associé à l'aggravation de la migraine). Afin de respecter la règle des 3R nous utiliserons un nombre limité de rats (80 + 40 supplémentaires avenant = 120 au total) pour 8 (+4 supplé avenant) groupes de 10 animaux tout en gardant la significativité des résultats via une analyse statistique adaptée (analyse de variance suivi d'un test post-hoc paramétrique si la distribution est normale ou un test non paramétrique dans le cas contraire). Le recours à l'animal vivant pour le projet est justifié par le fait que l'étude des effets antalgiques de l'agent pharmacologique ne peut être réalisé que sur un animal conscient. Sachant que cette étude, du fait même de sa nature (étude douleur), ne permet pas d'administrer d'autres antalgiques, les conditions d'hébergement sont optimisées (enrichissement social et environnement), le test de sensibilité mécanique respecte les règles éthiques édictées par l'International Association for the Study of Pain puisqu'il permet l'échappement de l'animal vis à vis du stimulus qui présente d'autre part une durée très courte (douleur évoquée de faible intensité à modérée) : 3 sec par stimulation mécanique. Cependant, lors des sessions d'injections et de mesure, toute observation de signes (points limites) tels que la prostration, l'impossibilité de manipulation, à se mouvoir,..... mettraient fin à l'expérimentation pour ces animaux par une mise à mort par injection létale d'anesthésique.

18642 Dans son rapport présenté en Février 2017, l'Organisation Mondiale de la Santé lance l'alerte sur le nombre insuffisant de nouveaux antibiotiques en développement et la menace croissante de la résistance aux antimicrobiens. Elle publie également sa première liste « d'agents pathogènes prioritaires », hautement résistants aux antibiotiques, énumérant les familles de bactéries les plus menaçantes pour la santé humaine. En tête de liste de la catégorie « critique » se trouvent les bactéries du genre *Acinetobacter* spp, et en particulier l'espèce *Acinetobacter baumannii*. C'est un pathogène fréquemment associé aux infections nosocomiales (acquises en milieu hospitalier), telles que les pneumonies sévères acquises sous ventilation chez les patients de réanimation ou

immunodéprimés. *Acinetobacter baumannii* est le plus souvent résistant à un grand nombre d'antibiotiques, y compris les carbapénèmes, qui constituent l'une des dernières lignes de traitement actuellement disponible (51% de résistance aux carbapénèmes en 2010 et jusqu'à 80% de résistance dans certains pays européens). De ce fait, les infections à *Acinetobacter baumannii* sont grevées d'une mortalité hautement significative, à hauteur de 40%.

Par ailleurs, l'OMS met en avant la nécessité de mieux évaluer les antibiotiques dans des modèles précliniques pertinents. C'est dans cette perspective que ce projet s'inscrit. La rifampicine, seule ou associée à un autre antibiotique, semble présenter un intérêt thérapeutique dans le traitement aux infections pulmonaires à *Acinetobacter baumannii*. Mais la distribution de la rifampicine mérite d'être davantage décrite chez la souris de façon à adapter les modalités d'administration dans cette pathologie.

L'objectif de ce présent projet est d'évaluer la pharmacocinétique (distribution sanguine) de la rifampicine administrée par voie intra-péritonéale chez la souris immunocompétente. Pour cela, du sang sera prélevé sur animal anesthésié à différents temps.

Dans le cadre de cette étude, une attention particulière sera portée au respect de la règle des 3R. Le nombre d'animaux nécessaire pour répondre aux hypothèses et permettre une analyse statistique robuste a été réduit à 3 par groupe grâce à l'expérience acquise lors d'études précédentes. Des analyses *in vitro* ont déjà été réalisées sur l'efficacité de la rifampicine sur certaines souches d'*Acinetobacter baumannii*. Toutefois l'efficacité de tels antibiotiques ne peut être confirmée que dans des modèles pré-cliniques, c'est pourquoi aucune stratégie de remplacement ne peut être envisagée. Enfin, un enrichissement du milieu (jouets en plastique, igloos en carton) sera utilisé et une surveillance accrue sera également réalisée pour cette étude (raffinement).

42 souris sont nécessaires pour la mise en œuvre de ce projet.

18643 Les souris sont régulièrement utilisées pour la recherche en oncologie dans les domaines de santé humaine.

L'enjeu de ce projet est de réaliser des études chez les souris SCID (modèle de souris immunodéficients) et d'étudier la pharmacocinétique de molécules dans l'organisme notamment l'absorption, la distribution par la circulation sanguine, le métabolisme et l'élimination. Cela consiste à administrer aux animaux une molécule (classe thérapeutique: oncologie, principalement des inhibiteurs de kinases) puis de pratiquer des prélèvements sanguins dans le but de suivre la concentration sanguine de la molécule dans l'organisme.

Dans chaque étude, 9 animaux seront utilisés par voie administration (généralement voie intraveineuse et voie orale) et par molécule testée (généralement 2 ou 3 molécules différentes par études).

Le mode d'administration des produits sera fonction du produit à tester mais toujours conforme aux recommandations en vigueur et aux bonnes pratiques vétérinaires.

Aucune méthode alternative ne permet actuellement de reproduire la diffusion d'un produit dans le sang des animaux il est donc indispensable de recourir à l'animal dans son ensemble.

Des prélèvements de sang seront réalisés après administration de la molécule avec un maximum de 3 prélèvements sanguins par animal. Les prélèvements sanguins seront toujours réduits au minimum. Ils pourront être réalisés soit sur animal anesthésié (anesthésie gazeuse) par ponction directe, soit vigile par microsampling (technique permettant de faire des prélèvements de volume sanguin très faible (environ 40µL)).

Les prélèvements sanguins seront toujours réalisés conformément à la réglementation en vigueur et aux bonnes pratiques vétérinaires.

Ce projet englobe plusieurs études et pour chacune le nombre d'animaux nécessaire sera calculé, il sera toujours réduit au minimum, en tenant compte de la variabilité des résultats attendus.

Une évaluation éthique préalable sera faite pour chaque étude.

Les animaux seront hébergés en groupe (3 ou 6 animaux /cage) avec un enrichissement du milieu adapté sur un portoir ventilé.

Un suivi quotidien (voire plusieurs fois par jour) sera mis en place pour l'observation générale des animaux et la détection précoce de signe clinique pour une prise en charge rapide d'éventuels effets secondaires.

Un enrichissement du milieu adapté (enrichissement irradié) seront mis en place pour éviter l'ennui. Toute intervention sur l'animal sera effectuée par une personne habilitée et expérimentée afin de réduire au minimum le stress

Au total, 8 000 animaux pourront être utilisés en 5 ans dans ce projet.

18644 Les problèmes de rythme cardiaque, l'insuffisance cardiaque sont les principales pathologies cardiaques développées plusieurs années après une exposition cardiaque à des doses modérées et fortes de rayonnements ionisants, notamment dans les traitements par radiothérapie où on observe une augmentation des risques de maladies cardiovasculaires, chez les patients de la maladie de Hodgkin ou encore dans le cas d'un cancer du sein. D'ailleurs le risque de développer ces pathologies semble être fortement dépendant du volume du cœur exposé au rayonnement et de la dose reçue par ce volume. Toutes les parties du cœur sont touchées : le péricarde, le système vasculaire, le myocarde, les valves et le système de conduction. Dans plusieurs études épidémiologiques récentes les troubles du rythme semblent représenter une part non négligeable des patientes ayant été traitées pour un cancer du sein notamment par radiothérapie. Dans le cas des pathologies cardiaques du trouble du rythme (hors cancer), plusieurs études démontrent le lien entre le système nerveux sympathique (SNS) et le cœur. Par exemple, une suractivation sympathique est essentielle dans le développement des remodelages et des dysfonctionnements cardiaques indésirables.

Au vu de cette littérature, il paraît intéressant d'étudier le rôle du système nerveux sympathique sur la physiologie et le maintien de la fonction cardiaque. Actuellement, aucune étude n'a mis en évidence l'impact des doses faibles à modérées sur le développement de pathologies cardiaques en ciblant le système nerveux sympathique cardiaque. Dans ce projet, nous émettons l'hypothèse que les pathologies cardiaques à long terme, telles que les troubles du rythme seraient induites par des doses faibles à modérées absorbées par des petites sous structures du cœur potentiellement arythmogènes. Afin de répondre à notre hypothèse, nous examinerons les voies de signalisations et les mécanismes impliqués dans ces troubles du rythme de façon précoce (24h post-irradiation) et également à des temps plus longs (40 et 60 semaines post-irradiation) grâce à un modèle d'irradiation localisée du cœur sur des souris femelles C57BL/6J ciblant les différents nœuds du système nerveux sympathique cardiaque (le haut du cœur) et en comparant cette irradiation avec l'irradiation localisée de l'apex du cœur et du cœur entier.

Ce projet permettra d'obtenir de nouvelles connaissances d'un point de vue mécanistique sur l'effet d'une exposition de doses faibles à modérées du système nerveux sympathique cardiaque, d'identifier les voies de signalisation de la cardio-toxicité associée à long terme à des potentiels troubles du rythme radio-induite afin d'améliorer et d'actualiser les connaissances en radioprotection des patientes cancer du sein. En effet, les résultats obtenus par ce projet permettront de mieux localiser les points sensibles en termes de doses au cœur et la mise en place de nouvelles stratégies de traitements, une étape de contournage de certaines zones du cœur particulièrement radiosensibles, comme les oreillettes, le nœud sinuso-atrial et nœud atrio-ventriculaire lors de la radiothérapie des patientes.

Ce projet respecte les principes énoncés par les 3R. Il prévoit l'utilisation de 580 souris sur 5 ans. En effet le nombre d'animaux utilisés correspond au minimum nécessaire pour obtenir un résultat scientifique valide et statistique. L'utilisation d'animaux est nécessaire car nous voulons connaître l'impact de rayonnements ionisants sur le développement d'une pathologie à l'échelle de l'organisme entier et l'étude sur les cellules n'est pas suffisamment représentative d'un organisme intégré (cardiomyocytes et fibres nerveuses associées) et ne peut mimer une pathologie globale, dans ces conditions, il n'est pas possible de s'affranchir de l'expérimentation animale.

Nos souris sont hébergées en groupe dans un milieu enrichi en coton de nidification ; toutes les précautions sont prises afin d'assurer au mieux le bien-être de en réduisant au minimum leur stress

lors des manipulations (les irradiations localisée réalisée sous anesthésie et suivi de la fonction cardiaque effectuée par échographie-doppler sous anesthésie gazeuse et réalisée tous les 15 jours sur les souris des groupes 40 et 60 semaines après irradiation); nous avons déterminé des critères d'arrêt précoce pour tout animal présentant des signes de douleur ou de dégradation de l'état général sera exclu de la procédure en cours.

18645 L'objectif principal est de fabriquer des milieux de culture (exemple gélose Columbia, Chocolat...) et des réactifs pour le diagnostic biologique dans l'industrie pharmaceutique et agro-alimentaire. La culture des micro-organismes nécessite des milieux contenant des hématies intègres et / ou des éléments nutritifs du sang dont les caractéristiques sont propres à chaque espèce. Il n'existe pas de molécule similaire et performante aux caractéristiques des globules rouges et dérivés du sang.

Le sang des différentes espèces est utilisé pour la production de réactifs de diagnostic in vitro au moyen de méthodes reconnues ; ces réactifs permettent l'évaluation ou la détection ou le contrôle des modifications physiologiques chez l'homme et l'animal pour les pathologies suivantes :

- Amibiase, infection parasitaire du gros intestin
- Identification de bactéries associées à différentes pathologies d'origine bactérienne
- Mononucléose infectieuse
- Toxoplasmose
- Cancers
- Hépatite B
- HIV anticorps et antigène
- Différentiation infection bactérienne ou virale pour antibiothérapie
- Hormones de la reproduction
- Bilan martial
- Rougeole
- Marqueurs de l'infarctus du myocarde et de l'insuffisance cardiaque
- Syphilis
- Détection/recherche de divers virus

Les produits biologiques (sang et sérum animal) sont évalués au niveau des analyses de risque produit comme des composants critiques qui ne peuvent pas être remplacés sans repasser par des phases de développement pour l'ensemble de ces réactifs ; il n'existe pas de solutions identifiées permettant d'en réaliser la substitution dont la validation serait de toute façon prohibitive.

Ces sangs peuvent être également utilisés pour d'autres applications telles que l'alimentation d'insectes piqueurs hématophages (tiques, moustiques...), dans un but de recherche sur les maladies transmissibles à l'homme ou aux animaux par ces insectes.

Ce sang est prélevé sur des animaux "donneurs" qui ne subissent aucun autre protocole (pas d'administration, ni injection de quelconque substance). Durant toute leur vie productive les animaux vont uniquement donner leur sang, de manière comparable à un don du sang chez l'Homme.

Ce projet rassemble 8 espèces animales à raison de 2500 ovins, 100 équins, 65 caprins, 6 bovins, 5 porcs, 80 volailles, 25 cobayes.

L'effectif des animaux donneurs est adapté au plus juste pour répondre aux prévisions de production. La plupart de ces animaux sont issus de l'élevage classique et reclassés car inaptes à la production initiale à laquelle ils étaient destinés dans leur élevage d'origine.

Toutes ces espèces sont hébergées en groupe, sur litière, ceci leur assurant une vie sociale adaptée à l'espèce et garantissant un enrichissement efficace. Les conditions d'hébergement des animaux sont définies pour favoriser la réduction du stress ; une surveillance de l'état général des animaux est réalisée et toute dégradation déclenche une demande de conseil auprès d'un vétérinaire. Ceci est sous l'égide de la structure bien-être animal.

18646 Les patients admis en réanimation suite à une inflammation aiguë (infection, traumatisme) voient se mettre en place une cicatrice immunitaire qui perdure plusieurs années. Cette cicatrice immunitaire semble affecter l'immunité anti-cancéreuse car ces patients ont une incidence de cancer diminuée jusqu'à 10 ans après leur passage en réanimation. Cette cicatrice est associée à une signature du récepteur de chimiokine CXCR6.

Nous avons précédemment montré l'existence de cette signature CXCR6 dans notre modèle murin d'inflammation aiguë (pneumopathie bactérienne).

Le but de notre travail sera d'évaluer :

- 1- l'impact d'une inflammation aigue sur l'immunité anti-tumorale
- 2- Le rôle des lymphocytes CXCR6 dans cette défense anti-tumorale
- 3- Le rôle d'une voie de signalisation d'intérêt produite par les cellules CXCR6 sur l'immunité anti-tumorale

Au total, ce projet nécessitera 2304 souris.

L'utilisation d'animaux pour l'évaluation du rôle des lymphocytes CXCR6+ dans l'immunité anti-tumorale nous permettra d'apporter de nouveaux éclairages dans la lutte contre le cancer et dans la prévention de ces derniers.

Remplacement : Les paramètres étudiés dans ce travail ne peuvent être aujourd'hui remplacés par des procédures in vitro. Réduction : Le nombre de souris a été réduit au minimum afin de garder une analyse statistique fiable et ce nombre a été optimisé en fonction des expériences précédentes. Raffinement : Pour leur confort, les animaux seront hébergés dans des cages adaptées (groupe de 5 max), avec enrichissement (frisottis et/ou dôme) et accès libre à l'eau et à la nourriture. De façon à diminuer le stress, la souffrance et la douleur, les animaux seront sous anesthésie générale et un traitement analgésique leur sera donné de façon adaptée en fonction de la procédure réalisée. Le bien-être des animaux est surveillé tout au long de l'étude avec évaluation quotidienne des signes généraux. Une grille d'appréciation a été mise en place avec un système de barème de point afin de minimiser au maximum l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse des souris et d'obtenir les informations pertinentes à moindre coût en termes de "bien-être" animal.

18647 Au sein de l'élevage avicole, la coccidiose aviaire qui est une maladie parasitaire fréquente, conduit à des pertes économiques importantes de plus de 800 millions de dollars par an dans le monde (Chapman et al. , 2014). La coccidiose aviaire est causée par l'infection par le parasite Eimeria dans les cellules épithéliales des caeca de poulet. Parmi les espèces colonisant le poulet, Eimeria tenella étant l'espèce la plus virulente Les animaux infectés présentent des diarrhées pouvant être hémorragiques. Macroscopiquement, des lésions plus ou moins importantes sont observées au niveau des caeca. Ces symptômes sont accompagnés d'une réponse inflammatoire importante dont la nature des différents acteurs cellulaires et moléculaires ainsi que les mécanismes précis conduisant à cette inflammation nécessitent d'être mieux connus. Les monocytes et les macrophages sont des cellules de l'immunité innée qui jouent un rôle clé dans l'inflammation d'une manière générale ; les macrophages sont des cellules résidentes dans les tissus tandis que les monocytes sont présents dans le sang. Lors d'une infection, les monocytes sont recrutés du sang et se différencient en macrophages dans le tissu. Ces cellules produisent de grandes quantités des cytokines et d'autres médiateurs de l'inflammation au site de l'infection. Un excès de la production de ces médiateurs peut être impliqué dans l'apparition de lésions tissulaires. Dans l'infection par Eimeria tenella, le rôle de ces cellules n'a pas été étudié. Dans ce contexte, nous nous intéresserons dans un premier temps au rôle des monocytes et des macrophages dans la physiopathologie de l'infection par Eimeria tenella.

Pour ce faire nous utiliserons au maximum 200 poulets au total (40 animaux (4X10) pour les deux premières expérimentations tests soit 80 animaux puis 120 (4X30) pour l'expérimentation en elle-même soit 200 animaux au total.

Dans ce projet la règle des 3R est respectée comme suit :

Remplacement : le rôle des macrophages dans la physiopathologie de l'infection par *Eimeria*, nécessite l'utilisation d'animaux et ne peut être réalisée in vitro.

Réduction : Le nombre d'animaux par lot est adapté aux buts de cette expérimentation « établir le rôle des macrophages dans la physiopathologie de l'infection par *Eimeria tenella* ». Il est possible de déterminer le nombre de parasites produits par animal en fonction de la dose inoculée. Les expériences sont organisées pour optimiser l'utilisation des parasites et utiliser le moins d'animaux possible. Les effectifs sont basés sur le nombre d'oocystes excrétés à J7pi qui est le paramètre le plus variable de cette étude. Ainsi, pour avoir un log de différence d'excrétion d'oocystes entre 2 groupes avec une puissance de 90%, il faut 20 animaux.

Raffinement : Les poulets seront hébergés en cages adaptés à leur taille, dans des conditions environnementales contrôlées, avec nourriture et eau à volonté et disposeront d'un enrichissement social et comportemental (pellet de fourrage compressé permettant aux animaux d'exprimer leur comportement de grattage piquage, petites plaques en inox suspendues ce qui permet aux animaux de piquer dedans).

18648 Le projet a pour objectif de sélectionner un ou des composés, à tester ultérieurement en phase clinique, pour le traitement chez l'Homme, de la cystite interstitielle associée au syndrome de la vessie douloureuse (Interstitial Cystitis/ Painful Bladder Syndrome, IC/PBS), sans origine infectieuse. Cette maladie, chronique et débilitante, est caractérisée par une douleur pelvienne, accompagnée d'une augmentation de la fréquence urinaire et l'apparition d'urgences urinaires. Selon les données épidémiologiques, cette pathologie, d'étiologie inconnue et probablement multifactorielle, est sûrement sous-diagnostiquée et toucherait environ 3 femmes sur 1000.

Etant donné qu'il n'existe aucun traitement de référence, et qu'il en résulte une diminution de la qualité de vie des patients et un coût économique important, la recherche de nouvelles thérapies est nécessaire. Par ailleurs, il n'existe à ce jour aucun modèle in vitro permettant l'étude de cette pathologie (remplacement) définie par des symptômes et donc difficile à appréhender hors d'une situation physiologique.

Dans ce contexte, des modèles précliniques murins d'IC/PBS ont été développés depuis de nombreuses années et sont basés sur une irritation de la vessie consécutive à une injection de cyclophosphamide (CYP), molécule utilisée en chimiothérapie anti-cancéreuse et connue pour ses effets urotoxiques. Il a été clairement établi qu'ils récapitulaient les caractéristiques observées dans la pathologie humaine : fonction vésicale anormale, associée à une douleur pelvienne et des modifications histologiques de la vessie.

Ainsi, notre projet est basé sur le test de composés d'intérêt dans deux modèles d'IC/PBS, provoqués par une injection unique ou des injections répétées de CYP chez la rate adulte. La fonctionnalité de la vessie et la douleur seront ensuite évaluées expérimentalement, puis comparées entre des animaux CYP et sham, traités ou non avec un composé candidat.

Ce projet préclinique présente comme avantage l'utilisation de modèles animaux (chronique et aigu) bien décrits dans la littérature et dont le modèle chronique, déjà validé éthiquement, est utilisé en routine au laboratoire. Ainsi, il ne nécessitera pas l'utilisation d'animaux additionnels pour une mise au point (réduction). Par ailleurs, du fait des connaissances et de l'expérience du personnel participant au projet, le nombre d'animaux est réduit au minimum nécessaire (réduction) pour réaliser des statistiques acceptables (15 rats par groupe de traitement).

Ainsi, la sélection de composés amènera à l'utilisation d'environ 1200 rates sur 5 ans, en considérant que 10% des composés se révéleront candidats pour des tests en clinique suite à cette sélection.

De plus, les méthodologies utilisées dans ce projet ont été adaptées afin de compiler des résultats fiables, tout en limitant la douleur et le stress des animaux. Un suivi quotidien de l'état général et du poids des animaux sera réalisé, pour une action rapide en cas d'état de souffrance de l'animal. Enfin, les animaux seront hébergés par 2 par cage, dès leur arrivée à l'animalerie, afin de favoriser leur interaction sociale et réduire leur stress et un enrichissement de la litière sera mis en place de façon systématique (raffinement).

18649 Notre laboratoire développe des colles chirurgicales biocompatibles qui peuvent avoir différentes applications cliniques. Un premier produit a été déjà évalué en clinique en tant que sealant pour être utilisé comme adjuvant aux sutures dans des chirurgies de reconstruction vasculaire. Nos colles chirurgicales ont également la capacité d'encapsuler des molécules. Ces molécules pourraient être libérées sur le site d'implantation suivant l'indication désirée. Notre projet consiste à évaluer la capacité de nos colles à libérer de façon effective les molécules thérapeutiques encapsulées dans des disques sous-cutanés polymérisés. Après des temps définis, les animaux seront euthanasiés pour évaluer la quantité de molécules relarguées.

Après une caractérisation chimique de nos produits, une évaluation de leur propriétés mécaniques *ex vivo* et une étude de la cinétique de relargage des molécules thérapeutiques *in vitro*, ce projet nous permettra d'effectuer une validation *in vivo*.

Les objectifs de ce projet sont les suivants :

- 1) analyser la capacité de nos produits à délivrer localement des molécules thérapeutiques
- 2) Etudier le profil de libération des molécules
- 3) Contrôler la tolérance du tissu
- 4) comparer par rapport à des produits déjà commercialisés

Afin de réaliser ces objectifs, le rat a été choisi comme modèle expérimental pour sa pertinence. En effet, les rats sont des modèles animaux classiquement utilisés en expérimentation animale et courant pour l'étude de la délivrance de molécules thérapeutiques. L'utilisation d'un modèle mammifère est, selon nous, essentielle à cause des différences structurales existantes entre les organes des espèces mammifères et non-mammifères. Plusieurs groupes de rats seront utilisés et évalués dans le cadre des procédures expérimentales. Il s'agira de procédures expérimentales classiques, dont les bases sont connues et publiées dans des revues spécialisées. Nous utiliserons sur 5 ans un total de 688 rats.

La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée sur le terrain :

- 1) Remplacement : quand cela sera possible nous effectuerons des études *ex vivo*, utilisant des organes d'animaux sacrifiés et des abats de boucherie.
- 2) Réduction : le nombre d'animaux utilisé a été rationalisé au maximum tenant compte, quand applicable, des analyses statistiques qui seront effectuées;
- 3) Raffinement : Le nombre d'animaux par cage (2 animaux) respectera la législation sur la protection des animaux de laboratoire. Les rongeurs disposeront à volonté d'eau et d'aliments. Tous les animaux seront hébergés en portoirs ventilés et enrichis avec des tunnels. La totalité des gestes expérimentaux seront pratiqués par du personnel qualifié. Les animaux recevront un traitement antalgique avant toute procédure chirurgicale qui se fera sous anesthésie générale. À la suite de la procédure chirurgicale, un traitement antalgique systématique sera administré. Les animaux seront observés au minimum une fois par jour afin d'évaluer de potentiels signes de mal-être. Un vétérinaire est joignable tous les jours si besoin. En cas de perte de poids notable, une supplémentation en nourriture gélifiée sera donnée. Si par la suite aucune amélioration n'est observée et s'il y a atteinte des points limites (variation relative du poids corporel supérieure ou égale à 20% par rapport au poids maximum mesuré ou dégradation de l'état général de l'animal), l'euthanasie de l'animal sera effectuée.

18650 La surdité DFNB9 est une surdité profonde héréditaire causée par une mutation dans le gène OTOF codant pour l'otoferline, protéine essentielle à la transmission de l'information sonore au niveau des synapses des cellules sensorielles auditives.

Il n'existe aucun traitement curatif de cette surdité seulement une possibilité d'implantation cochléaire dont l'efficacité est partielle. Des résultats, obtenus chez la souris déficiente en otoferline, indiquent que cette surdité pourrait être corrigée par thérapie génique (par injection d'un vecteur porteur du gène de l'otoferline). Ces résultats, bien que très encourageants, ne permettent pas d'envisager immédiatement des essais chez l'Homme (essais cliniques) : certaines caractéristiques du modèle murin comme la taille et le développement de l'oreille interne ainsi que les fonctions des

gènes chez la souris diffèrent significativement de ceux des humains. De par des travaux antérieurs, le modèle primate non-humain apparaît comme le plus adapté pour l'étude des pathologies auditives. En plus des correspondances anatomiques et fonctionnelles, le modèle de primate non-humain permet aussi de tester la faisabilité d'une injection locale équivalente à celle qui serait pratiquée chez l'Homme. Certains aspects portant sur l'administration par voie chirurgicale, et la technique de prélèvement et d'histologie de l'oreille interne ont déjà été validés à l'aide de tests ex vivo. Le but de ce projet est d'étudier l'affinité de 4 vecteurs différents pour les cellules sensorielles auditives, ainsi que l'optimiser afin d'obtenir le meilleur taux d'expression possible du gène d'intérêt chez le primate non-humain sain afin de pouvoir envisager l'application chez l'humain atteint de surdité DFNB9. Pour cela nous utiliserons des techniques électrophysiologiques non invasives couramment utilisées en otologie humaine pour évaluer les seuils auditifs avant et après l'injection intra-cochléaire des vecteurs étudiés. Les prélèvements de l'oreille interne après euthanasie permettront de faire les analyses histologiques et de vérifier l'expression de ces vecteurs dans les cellules cibles. L'ensemble de ces travaux nécessitera un total de 21 macaques cynomolgus, nés et élevés en captivité dans des établissements autorisés

Remplacement : le recours à l'animal est nécessaire car aucune méthode alternative qui reproduise les caractéristiques fonctionnelles de l'ouïe n'existe actuellement. Nous souhaitons aussi recourir à un modèle animal dont les caractéristiques anatomiques et fonctionnelles de l'ouïe sont les plus proches de celles chez l'Homme pour tester et optimiser la spécificité et la sécurité des vecteurs qui ont donné des résultats prometteurs dans le modèle murin. Réduction : ce nombre a été réduit au minimum nécessaire pour garantir la validité statistique des résultats. Raffinement : toutes les interventions de chirurgie sur les animaux se feront sous anesthésie générale, renforcée par des compléments analgésiques et anti-inflammatoires appropriés. Ce projet s'appuie sur des études préalables in vitro, in vivo et ex vivo.

Les études in vitro ont permis de tester l'efficacité de transduction des AAV dans des cellules humaines de l'oreille interne. Les études in vivo ont permis de sélectionner le sérotype avec la meilleure affinité pour les cellules ciliées de l'oreille interne. Enfin, les études ex vivo, nous ont permis d'optimiser nos techniques de prélèvement et d'histologie afin de diminuer le nombre d'individus nécessaire pour répondre à nos questions. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions et des critères de points limites ont été prévus pour prendre en compte des effets inattendus. Si tel était le cas, le vétérinaire de l'installation serait alerté afin de mettre en oeuvre des traitements appropriés. Les animaux seront hébergés au minimum par paire et un programme d'enrichissement adapté sera mis en place tout au long de l'étude. Ce programme comprend la mise en place d'enrichissements permanents (aménagement structurels des cages, mise en place d'éléments en bois à mâchonner, miroirs), non alimentaires temporaires (jouets, éléments à manipuler par rotation chaque semaine) et alimentaires (friandises, boîtes surprise une fois/jour ou plusieurs fois par semaine).

18651 Les neurones du cerveau communiquent entre eux au niveau de contacts physiques appelés synapses. La force de la communication synaptique est renforcée lorsque des neurones sont activés ensemble, créant l'équivalent de carrefours reliant des routes les unes aux autres et permettant progressivement de créer des cartes de circulation de l'information au sein du cerveau qui permettent de mémoriser et donc de réutiliser à bon escient les trajectoires les plus utiles pour résoudre une tâche ou adapter notre comportement à la situation ou un événement extérieur. Ainsi, la plasticité cérébrale, est donc notre capacité cognitive, dépendant des mécanismes fondamentaux qui régissent la communication entre neurones.

Parmi les neurones, on distingue 2 grandes catégories : Les neurones GABAergiques qui inhibent l'activité des neurones qu'ils contactent, et sont donc essentiels pour permettre d'exercer un frein sur l'activité du cerveau et les neurones glutamatergiques qui activent ce frein. Pour des raisons morphologiques et moléculaires, les mécanismes de ces différents neurones sont différents et mal connus. Nous voulons donc mieux comprendre les règles qui régissent l'action des synapses glutamatergiques sur les cellules GABAergiques, et ainsi connaître le rôle qu'elles jouent dans

l'établissement des « carrefours » et « routes » permettant de mémoriser des tâches comportementales.

La nouvelle génération d'outils que nous avons généré, est basée sur une lignée de souris transgéniques permettant d'immobiliser les récepteurs AMPA à la surface de ces neurones et par conséquent d'inhiber leurs activités. L'objectif de ce projet est d'évaluer l'effet de l'immobilisation de récepteurs à la surface de ces neurones inhibiteurs, sur la plasticité synaptique et sur l'apprentissage chez la souris.

Notre plan expérimental sera donc le suivant :

Dans un premier temps, les lignées transgéniques utilisées dans ce projet effectueront une série de tests permettant de valider phénotypiquement la lignée et de confirmer son caractère non dommageable.

Dans un second temps, les animaux subiront une chirurgie cérébrale afin d'implanter soit des canules permettant l'injection de molécules pharmacologiques inhibant la mobilité des récepteurs neuronaux, soit des électrodes permettant de mesurer les courants électriques qui assurent la communication entre les neurones. Les animaux effectueront ensuite différentes tâches comportementales qui impliquent la mémoire de travail. Des mesures d'électrophysiologie seront faites durant ces protocoles expérimentaux.

Justification du respect de la règle des 3R.

Remplacer : Ce projet nécessite l'utilisation d'animaux. En effet, à ce jour il n'existe pas encore de méthodes alternatives. L'étude de l'effet de l'immobilisation des récepteurs dans la formation de mémoire nécessite l'utilisation d'un cerveau intact chez l'animal vigile. Des méthodes in vitro telles que la culture cellulaire ou bien les coupes de cerveau ne permettent pas l'observation d'un apprentissage.

Réduire : Le nombre d'animaux a été calculé par l'estimation de la variance observée avec ce type de données permettant d'atteindre une signification statistique. La réalisation de cette étude nécessite 1110 animaux sur 5 ans. Chaque groupe expérimental est accompagné d'un groupe contrôle.

Raffiner : A leur arrivée, les animaux sont hébergés en cages collectives, garnies de litières leur permettant de reproduire un comportement naturel de fouissage et d'un enrichissement constitué d'un nid végétal et de tubes de cartons, pour leur permettre d'explorer, de jouer et de ronger. Ces cages offrent aux animaux un espace important pour se redresser. Après un premier contrôle de leur état de santé, les animaux bénéficient d'une période d'acclimatation. L'ensemble des animaux est surveillé quotidiennement avec une surveillance renforcée lors de chirurgie, et au cours des étapes de comportement. Une surveillance accrue est mise en place dès qu'un signe de mal-être est constaté.

Les chirurgies sont réalisées sous anesthésie générale avec une couverture antalgique qui agira dès leur réveil et qui sera maintenue tant que l'animal montrera des signes de souffrance.

Au cours des étapes de l'apprentissage, les animaux sont placés en restriction alimentaire légère ; une surveillance accrue de leurs poids et de leur état général est mise en place. Des points limites suffisamment précoces seront définis pour éviter des souffrances aux animaux avec la mise en place de mesures pour les soulager comme une réhydratation, le réchauffement, une nourriture adaptée et des traitements vétérinaires si nécessaires.

18652 Les accidents vasculaire cérébraux (AVC), sont une cause majeure de handicap à long terme dont les séquelles peuvent être fonctionnelles (déficit moteur, trouble du langage...), cognitives (troubles de mémoire, ralentissement psychique...) et psychologiques (dépression, anxiété). Il est bien établi que le volume de l'infarctus cérébral ne prédit qu'imparfaitement les séquelles post-AVC, laissant penser que d'autres mécanismes survenant à distance de l'AVC pourraient jouer un rôle.

Une étude en imagerie par résonance magnétique (IRM), que nous avons récemment réalisée sur plus de 400 patients victimes d'un AVC, indique que du fer s'accumule dans des régions du cerveau, initialement épargnées par l'infarctus, comme le thalamus. Nos données suggèrent fortement que

l'excès de fer dans ces régions a un impact péjoratif sur l'évolution clinique à long terme, indépendamment des autres facteurs pronostiques. Autrement dit, plus l'accumulation de fer dans le thalamus est importante dans les suites d'un AVC et plus la récupération risque d'être mauvaise. Ces résultats ont été retrouvés lors d'une étude préclinique pilote qui a permis de prouver l'accumulation de fer dans le thalamus et le lien avec une activation inflammatoire locale pouvant être délétère. En se basant sur ces résultats préliminaires, nous faisons l'hypothèse, qu'éviter l'accumulation de fer par des traitements, notamment chélateurs du fer, pourrait protéger les régions cérébrales impactées par l'AVC (comme le thalamus) et ainsi avoir un effet bénéfique, notamment vis-à-vis de l'apparition de nouveaux symptômes après l'AVC.

Avant d'envisager un essai thérapeutique chez l'homme, il convient de confirmer chez l'animal que du fer s'accumule progressivement dans les régions déconnectées par l'AVC (comme le thalamus) et que celui-ci induit des dommages cellulaires. Il convient également d'apporter des premiers éléments sur l'effet possible du traitement. Ce projet vise donc à quantifier le fer et les dommages cellulaires induits par l'excès de fer au sein du thalamus sur un modèle murin d'AVC et à tester plusieurs médicaments visant à diminuer cette charge en fer et les effets sur les cellules du cerveau induits par son accumulation

Pour réaliser cette étude, 252 souris seront utilisées. L'AVC sera induit par la méthode de photothrombose chez la souris - qui est actuellement la méthode la moins invasive pour reproduire la pathologie humaine -. Elle consiste en une injection de rose bengale dans l'abdomen de la souris (un produit photosensible qui permet la formation d'un caillot lorsqu'il est soumis à la lumière) suivie d'une illumination du cortex cérébral dans une zone définie. Il n'existe actuellement pas de modèle in vitro et donc pas de méthode alternative permettant de REMPLACER les animaux. Aujourd'hui, le fer est quantifié au sein du cerveau des patients grâce à l'IRM. Nous utiliserons donc aussi cette méthode dans notre projet. Un des avantages majeurs de l'IRM est d'être non-invasive, ce qui permet de suivre un animal dans le temps. Afin de respecter la règle des 3R, nous avons REDUIT à 252 le nombre total d'animaux que nous prévoyons d'utiliser sur une période de 36 mois. Il s'agit du nombre minimal d'animaux nécessaire à l'obtention de données de qualité exploitables et permettant une analyse statistique fiable. Nous avons par ailleurs favorisé une étude longitudinale, permettant de suivre les souris régulièrement, notamment par IRM, réduisant ainsi le nombre de souris nécessaires pour évaluer les différents temps d'analyse de notre projet.

Des mesures de RAFFINEMENT seront mises en place durant toute la durée du projet. Les animaux seront hébergés au sein d'un établissement utilisateur agréé dans des conditions d'hébergement favorisant leur bien-être (enrichissement, suivi quotidien par du personnel qualifié). Enfin, des points-limites ont été établis entraînant une prise en charge de l'animal afin d'anticiper toute souffrance et réduire au mieux l'inconfort des animaux (anesthésie, analgésie, gel oculaire, tapis chauffant,...). Ce travail est le prérequis indispensable à la conduite ultérieure d'essai thérapeutique pour moduler la charge en fer chez l'homme dans les suites d'un AVC.

Ce projet est multi sites (3 établissements utilisateurs) et 2 autres demandes y seront rattachées.

18653 Dans le système nerveux central, le prolongement majeur des neurones que l'on appelle l'axone est entouré d'une gaine de lipides appelée 'myéline'. Celle-ci permet d'optimiser la réponse du neurone à une quelconque sollicitation et participe donc au fonctionnement correct des différents tissus et organes du corps humain. Plusieurs maladies entraînent une destruction de la myéline. On parle de maladies démyélinisantes parmi lesquelles la sclérose en plaques, la plus commune de ces maladies. La sclérose en plaques atteint une majorité d'adultes jeunes entre 20 et 40 ans, mais elle peut aussi apparaître soit chez l'enfant soit après 40 ans. Les troubles neurologiques associés à la maladie touchent diverses fonctions comme la motricité, la sensibilité, la vision. La destruction de la myéline est la conséquence d'un dysfonctionnement de notre système immunitaire (notre système de défense contre des éléments extérieurs à l'organisme) qui soudainement se met à ne plus reconnaître la myéline comme un élément normal de l'organisme et la considère donc comme étant une cible à détruire. Les premiers épisodes de destruction de la myéline régressent sur le plan clinique parce qu'une régénération spontanée existe. Cette régénération est appelée remyélinisation. Cependant la maladie évolue ensuite vers des formes sans phase de rémission

correspondant à l'échec du processus de réparation. En l'absence de myéline, les neurones dégénèrent conduisant à des handicaps irréversibles comme notamment la perte de motricité. Les traitements actuellement disponibles permettent de réduire l'inflammation associée à la maladie, mais aucun ne favorise la régénération de la myéline indispensable pour éviter une évolution dramatique. Une autre maladie aussi caractérisée par une destruction de la myéline est la maladie de Charcot. Il s'agit d'une pathologie dégénérative rare conduisant à une paralysie progressive qui peut être rapidement fatale lorsque les muscles de la respiration sont affectés. En effet, l'origine de la maladie est la dégénérescence d'une catégorie de neurones qui contrôlent les muscles des membres, de la face, de la respiration. La dégénérescence de la myéline a lieu dans des régions bien déterminées du cerveau et de la moelle épinière.

Pour pallier le défaut de réparation de la myéline dans les maladies où elle est détruite, il est primordial d'identifier les mécanismes qui contrôlent ce processus. Nous focalisons nos recherches sur différentes cibles que nous devons caractériser afin de savoir si elles sont ou non capables de constituer des pistes thérapeutiques intéressantes. La caractérisation des différentes cibles possibles commence toujours par des expériences *in vitro* c'est-à-dire des cultures de cellules qui seront systématiquement effectuées avant de passer chez l'animal. Cependant, les cultures ne permettent pas d'évaluer les cibles dans le contexte de ces pathologies complexes qui mettent en jeu, en plus des cellules qui synthétisent la myéline, des cellules qui participent à la réaction inflammatoire et sont présentes dans le système nerveux ou bien pénètrent dans celui-ci suite à une réaction inflammatoire dans les organes constituant notre système immunitaire. Nos cibles actuelles peuvent être classées en quatre groupes. Leur étude nécessite l'utilisation de souris génétiquement modifiées ou bien de souris génétiquement non modifiées chez lesquelles nous administrerons de petites molécules spécifiques de chaque cible afin de moduler leur activité. Nous utiliserons des modèles de démyélinisation qui miment soit la démyélinisation du cerveau et de la moelle épinière telle qu'observée dans la sclérose en plaques, soit la démyélinisation de la population de neurones impliqués spécifiquement dans la maladie de Charcot. Nous avons utilisé ces modèles dans les travaux que nous avons publiés au cours des dernières années. Ils sont par ailleurs utilisés dans de nombreux laboratoires à travers le monde et ont permis d'identifier les molécules chimiques qui sont à l'heure actuelle utilisées pour traiter les patients. Pour déterminer si les petites molécules que nous avons identifiées pourraient être à terme utiles chez l'humain, les souris recevront d'abord les agents qui induisent la démyélinisation, puis les petites molécules à tester. Nous réduisons au maximum le nombre d'animaux utilisés en regroupant toutes les analyses histologiques que nous devons réaliser afin d'obtenir un maximum de résultats sur chaque animal. De plus, nous raffinons au mieux les modèles notamment en utilisant des protocoles qui ont été préalablement optimisés et qui permettent d'induire des démyélinisations très reproductibles évitant d'avoir à augmenter le nombre d'animaux et ne produisant pas de trouble de la motricité ou alternativement un trouble modéré, mais toutefois suffisant pour pouvoir conclure sur l'effet des molécules à tester. Lorsque nécessaire, nous utilisons des aiguilles extrêmement fines et spécifiquement mises à disposition de la communauté scientifique pour réaliser des injections chez la souris. Des tapis chauffants permettent d'accompagner le réveil des animaux anesthésiés. Par ailleurs, les animaux sont placés sous surveillance étroite de leur poids et de leur comportement. Ils sont hébergés par groupes de 4 ou 5 dans un environnement enrichi. 956 souris seront utilisées au cours des 5 années nécessaires à la réalisation du projet.

18654 Le foie est un organe majeur dans la régulation du métabolisme. Chez l'Homme comme chez la souris, il stocke des nutriments sous diverses formes et joue un rôle de tampon dans la régulation de l'homéostasie énergétique. Les individus obèses ont tendance à développer un diabète de type II associé à une résistance à l'insuline. Le diabète et ses complications posent un problème majeur de santé publique. Afin de mieux comprendre les mécanismes liés au développement d'un diabète nous nous sommes intéressés à étudier les fonctions de la signalisation de l'insuline dans le foie chez des souris mâles. Pour cela, nous utiliserons des souris mutantes qui présentent une absence de la signalisation de l'insuline dans le foie suite à la délétion d'un gène en comparaison d'animaux contrôles ne présentant aucune mutation. Le phénotype des souris mutantes se traduit par une augmentation de glucose et d'insuline dans le sang, sans atteintes sévères vis-à-vis du

comportement et de la morphologie de l'animal. Il a été mis en évidence que le rythme circadien (horloge biologique de l'organisme) est primordial dans le maintien de l'équilibre du métabolisme énergétique, puisqu'un dérèglement chronique de cette horloge au niveau du foie peut entraîner le développement d'un diabète de type 2. Afin de déterminer l'importance de la voie de l'insuline dans ce processus, nous étudierons chez les souris mâles le rythme circadien hépatique en jouant sur les paramètres de prise alimentaire (régime sain ou riche en graisse), période à laquelle l'insuline est sécrétée dans l'organisme. L'évaluation de la tolérance au glucose (critère d'un désordre métabolique) sera évaluée par l'administration de glucose chez ces souris. Les animaux feront l'objet de procédures de degré modéré uniquement et cumuleront une procédure au maximum au cours de la période d'étude. L'utilisation de l'animal entier est incontournable car le projet porte sur le dialogue entre plusieurs organes dans la régulation des voies métaboliques. De plus, la souris est un modèle de choix car adapté aux mécanismes que nous étudions et qui nous permet de déléter une protéine d'intérêt dans un organe en particulier. Ainsi nous ne pouvons pas utiliser de méthodes alternatives de remplacement pour cette étude. Nous utiliserons uniquement des souris à l'âge adultes. Nous prévoyons d'utiliser, à raison de 12 animaux par groupe et au vu des deux études à mener, 840 animaux sur les 5 années du projet. Basé sur les données de la littérature et des expériences antérieures du laboratoire, ce nombre d'animaux est le nombre minimum nécessaire mais indispensable afin d'obtenir des résultats exploitables. Les souris sont élevées au sein de l'animalerie et nous veillerons à leur bien-être que ce soit avant et pendant les études expérimentales en leur assurant les meilleures conditions d'hébergement, dans un environnement contrôlé (luminosité, température, enrichissements (maisonnette, feuilles de celluloses). Une surveillance quotidienne par le personnel soignant et/ou l'expérimentateur sera effectuée tout au long de la vie des animaux. En situation de stress et de douleur, des critères d'arrêt (perte de poids, blessure) sont établis. Si un point limite est atteint (perte de poids, dépression, etc.), l'animal sera retiré de l'étude pour être soigné ou euthanasié si le retour à la normale n'est pas possible.

18655 La fibrillation atriale (FA) est la forme la plus fréquente des troubles du rythme cardiaque touchant 1 à 2 % de la population mondiale, 250 000 personnes supplémentaires chaque année en France. Son incidence augmentant avec l'âge, on estime que sa prévalence sera multipliée par 2,5 d'ici les 50 prochaines années du fait de l'allongement de la vie dans les pays industrialisés. Cette pathologie cardiaque représente donc un problème de santé publique majeur.

Elle est associée à un risque accru d'accidents vasculaires cérébraux, d'infarctus du myocarde et d'insuffisance cardiaque.

Les thérapies actuelles de la FA sont accompagnées de nombreux effets secondaires et sont souvent inefficaces dans les cas de FA persistante et permanente, lorsque le risque d'insuffisance cardiaque est le plus élevé, en raison d'un manque de connaissances des processus physiologiques liés à la pathologie.

Malgré des avancées importantes sur les connaissances des mécanismes cellulaires impliqués dans la FA, une meilleure compréhension des voies de signalisation moléculaires reste indispensable afin de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques dans le traitement de la FA. Dans ce contexte, l'objectif principal de ce projet de recherche est de mettre en évidence une nouvelle cible thérapeutique et de tester le potentiel thérapeutique d'un nouveau composé, l'AM-001.

Pour cela, nous utiliserons un modèle de brebis en FA persistante depuis 60 jours. Ces animaux permettront de réaliser une exploration fonctionnelle électrophysiologique cardiaque avant et après traitement à l'AM-001 ou à un traitement de référence utilisé en clinique, et d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires associés.

L'étude d'une nouvelle cible thérapeutique et du potentiel thérapeutique d'un nouveau composé nécessite l'utilisation d'organismes vivants dont la physiologie cardiaque est proche celle de l'homme et chez qui la pathologie étudiée, ici la FA, est reproductible.

La brebis réunis tous ces critères et représente un bon modèle dont le REMPLACEMENT n'est pas possible pour mener à bien cette étude.

Pour réaliser cette étude et dans le but de REDUIRE le nombre d'animaux utilisés, chaque animal sera son propre contrôle. Ainsi, l'exploration fonctionnelle réalisée sous anesthésie sera réalisée avant et après injection de l'AM-001, du véhicule ou du traitement de référence. Un nombre maximal d'animaux, fixé à 26 a été défini afin d'obtenir des résultats fiables.

Le RAFFINEMENT du projet et le respect du bien-être animal seront assurés en respectant les mesures suivantes :

- Avant l'expérimentation : les animaux seront hébergés dans des locaux agréés et bénéficieront de soins quotidiens dispensés par du personnel compétent et soucieux du bien-être animal. Ils seront habitués au personnel animalier afin de limiter tout stress et seront hébergés en groupes sociaux ce qui leur permettra d'exprimer des comportements naturels. Ils disposeront d'enrichissements adaptés (foin et pierre à sel)

- Toutes les procédures seront réalisées sous anesthésie générale (mise en œuvre et surveillée par du personnel dédié) et une analgésie adaptée sera systématiquement mise en place

- Au cours de la procédure d'expérimentation des critères d'alerte précis seront surveillés; si l'animal présente un signe d'appel, des mesures adaptées seront mises en place immédiatement (ajout d'analgésique par exemple).

18656 L'hypomagnésémie familiale avec hypercalciurie et néphrocalcinose est une maladie génétique rare due à des mutations des gènes CLDN16 ou CLDN19. La protéine codée par le gène CLDN16, membre de la famille des claudines, est une protéine membranaire impliquée dans les jonctions serrées. On la trouve principalement dans les reins, en particulier dans le membre ascendant épais de Henlé, où elle agit soit comme un pore intercellulaire soit comme un capteur de concentration ionique pour réguler la résorption paracellulaire des ions magnésium. Les patients porteurs de mutations CLDN16 présentent une tubulopathie entraînant une calcification rénale et une insuffisance rénale progressive. A ce jour, la maladie reste incurable et la physiopathologie reste insuffisamment comprise. Un modèle murin exprimant la mutation pathogène la plus fréquemment rencontrée chez l'Homme (L151F) a été créé pour mieux comprendre la physiopathologie de la maladie. Les animaux mâles et femelles ont subi un criblage phénotypique standardisé pour déterminer les effets de la mutation. Le phénotype de ces animaux, visible chez les mâles et les femelles, a montré certaines spécificités. Ainsi, les quantités de calcium et de magnésium sont plus élevées dans l'urine des souris CLDN16 mutante (mut) mais sans baisse des valeurs sanguines de ces mêmes ions. Chez les mâles uniquement, une différence de l'élimination urinaire de la créatinine entre les normaux et les porteurs de la mutation, pouvant refléter une différence de masse et/ou de métabolisme musculaire, a été observée.

Grâce à son caractère non-invasif et ses multiples contrastes qui permettent de bien quantifier la masse musculaire contractile, et d'identifier de processus nécrotiques et inflammatoires, l'imagerie par Résonance Magnétique Nucléaire (IRM) est devenu un outil incontournable dans les études cliniques et d'histoire naturelle dans le domaine des maladies neuromusculaires.

L'objectif de ce projet vise à réaliser une évaluation in vivo des animaux par IRM, méthode d'analyse non-invasive ce qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés, en les réutilisant pour d'autres évaluations, ce qui représente un raffinement dans l'expérimentation in vivo proche des évaluations cliniques. Malheureusement, à l'heure actuelle, il n'existe pas de modèles in vitro permettant de mimer la complexité des transports ioniques transépithéliaux et leurs effets systémiques, ce qui rend les modèles animaux indispensables dans l'étude proposé.

La réduction du nombre d'animaux est également assurée par la minimalisation de la variabilité entre individus : un fond génétique pour l'étude de la masse et tous les animaux d'une même lignée proviennent d'un même fournisseur pour minimiser les variations sanitaires.

Le bien-être animal avant l'expérimentation sera amélioré par l'enrichissement de l'environnement avec du papier absorbant ou des tubes en carton et par le maintien des souris en groupe.

Enfin toutes les expérimentations RMN se feront sous sédation anesthésique afin de maintenir les animaux immobiles durant les acquisitions. L'IRM étant atraumatique et indolore, et les animaux sédatisés tout au long de l'acquisition, aucune analgésie n'est indiquée.

Un total de 80 animaux est prévu pour ce projet pour une durée de 4 ans.

18657 La pollution atmosphérique est un problème majeur de santé publique dans les zones urbaines. Outre les conséquences directes de l'inhalation de polluants sur le système cardiorespiratoire et les décès prématurés, l'exposition prénatale à la pollution urbaine serait associée à une augmentation du risque de développer un autisme ou une schizophrénie.

Les dommages cérébraux liés à la pollution ont principalement été étudiés chez l'homme au travers d'études épidémiologiques. Ces dernières sont souvent limitées par des facteurs de confusion, qui résultent de l'histoire personnelle de l'individu et de l'évaluation rétrospective de l'exposition aux polluants. En outre, elles ne permettent généralement pas d'évaluer comment ces polluants affectent le système nerveux central.

Les modèles animaux apportent des solutions à ces limites. Ils permettent une maîtrise des conditions d'exposition et la reproductibilité des expériences. Notre projet, d'une durée de 5 ans, propose ainsi d'évaluer l'impact de l'exposition prénatale à des polluants atmosphériques sur le développement cérébral et le comportement. Pour ce projet, nous utiliserons au total 560 souris, correspondant au nombre minimum de souris nous permettant d'atteindre un effectif suffisant pour observer des différences significatives entre les groupes étudiés. Ainsi, 10 souris gestantes seront exposées au cours de leur dernière semaine de gestation à l'atmosphère rencontrée dans la ville de Paris, celle de Pékin, ou de leurs atmosphères filtrées, utilisées comme contrôle de l'expérience. Nous évaluerons l'impact de cette exposition sur le comportement des animaux issus des mères gestantes qui auront été exposées ou non aux atmosphères polluées, en nous intéressant en particulier à leurs interactions sociales, connues pour être altérées dans l'autisme et la schizophrénie. Nous étudierons également leur fonctionnement cérébral.

Les objectifs scientifiques de ce projet, ne sont envisageables que chez l'animal, car ils nécessitent le contrôle de l'environnement complet de l'animal, depuis son développement jusqu'à l'âge adulte. Les fonctions hautement intégratives telles que le comportement social ne peuvent, bien entendu, pas être remplacées par des cultures cellulaires, des tranches de cerveaux ou des animaux invertébrés chez qui les protocoles comportementaux n'existent pas et nécessitent l'existence d'un cortex préfrontal, structure cérébrale qui existe de façon homologue (projections neurochimiques identiques chez tous les mammifères, par exemple) chez la souris, notre modèle. Toutes les méthodes possibles sont utilisées pour limiter le nombre d'animaux et prendre en compte leur bien-être et leur potentielle souffrance. Le bien-être des animaux sera évalué chaque jour et quantifié selon une grille mesurant les variations du poids, de l'apparence physique et du comportement. Pour chaque procédure, nous avons fixé des points limites sur ces grilles d'évaluations au-delà desquels l'expérience sur l'individu sera arrêtée et tout sera mis en œuvre pour réduire et supprimer la douleur.

L'ambition de notre projet est de fournir des preuves des conséquences directes de l'exposition prénatale à la pollution atmosphérique sur les fonctions cérébrales et de découvrir des marqueurs biologiques et comportementaux prédictifs du développement des troubles cognitifs ou psychiatriques.

18658 L'endométriose est une pathologie gynécologique affectant 5 à 15% des femmes en âge de procréer. Elle se caractérise par la présence anormale de tissu endométrial (partie interne de l'utérus) dans la cavité péritonéale. Cette maladie est associée à des douleurs pelviennes chroniques (40-60% des cas) et à de l'infertilité (20-30% des cas). Sa physiopathologie reste évasive. La théorie la plus acceptée est qu'au cours des menstruations, des fragments de tissu endométrial vont dans la cavité péritonéale via un flux rétrograde (passage par les trompes) et vont adhérer et proliférer pour former les lésions d'endométriose. Ce flux rétrograde existant chez 90 % des femmes, les femmes qui développent une endométriose ont des caractéristiques spécifiques qui permettent aux cellules endométriales d'adhérer et de proliférer de façon ectopique (en position

anormale), formant des lésions d'endométriose, résistantes à une élimination par le système immunitaire. Cette maladie est également associée à des complications de la grossesse. Les cellules immunitaires ont un rôle très important dans l'établissement de la grossesse. L'objet du présent projet est de tester in vivo le rôle des agents immunomodulateurs sur le développement de l'endométriose et de la grossesse. Pour cela, nous utiliserons des modèles murins d'endométriose. Nous évaluerons la croissance des lésions d'endométriose (induites), le nombre de résorption embryonnaire par échographie et les variations de sensibilité tactile au niveau abdominal des souris. Ce projet s'inscrit dans un respect strict de la règle des 3R. Nous avons précédemment mené l'étude de ces molécules immunomodulatrices sur des cellules immunes en culture cellulaire in vitro (afin de Remplacer autant que possible l'utilisation de modèle animaux). Cependant, leur influence sur le développement de l'endométriose et dans le cadre d'une gestation nécessite une évaluation dans un organisme complet (pour évaluer les interactions entre les différents organes et types cellulaires impliqués dans un contexte physiopathologique). Une étude de puissance a été réalisée afin d'évaluer le nombre de souris nécessaire et ainsi de Réduire leur nombre au maximum. La chirurgie sera réalisée sous anesthésie générale. Les échographies également sous anesthésie nous permettront d'étudier les souris de manière longitudinale (Raffiner, Réduire) et de limiter le nombre de souris tout en étudiant la résorption embryonnaire à différents stades de la gestation. Ce projet nécessitera ainsi au maximum 880 souris et 1760 fœtus pour des procédures expérimentales qui s'étendront sur 5 ans, ce nombre pouvant être revu à la baisse en fonction des résultats obtenus avec les traitements par les molécules immunomodulatrices (seules les molécules les plus prometteuses seront utilisées dans les approches de thérapies cellulaires). Nous limiterons au maximum la douleur et la souffrance des animaux en utilisant des antalgiques après les procédures chirurgicales et en suivant la progression des grossesses et des lésions par échographie. Enfin des points limites ont été établis conduisant à une mise à mort de manière anticipée si nécessaire. Un contrôle quotidien du bien-être et de l'état général des souris sera réalisé, couplé à des mesures échographiques de croissance des lésions et du nombre de fœtus deux fois sur 3 semaines. De l'enrichissement sera placé dans chaque cage afin de ne pas perturber le comportement de nos souris. A terme, le but de ce projet est de pouvoir proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le cadre de l'endométriose, qui seraient compatibles avec la grossesse (les thérapies médicamenteuses actuelles étant contraceptives).

18659 L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie vasculaire pulmonaire rare et grave, caractérisée par l'augmentation des résistances artérielles pulmonaires, aboutissant à une insuffisance cardiaque droite. Cette maladie peut survenir de façon sporadique (HTAP idiopathique), dans un contexte familial (HTAP familiale) ou compliquer l'évolution de certaines pathologies (hypertension portale, infection par le VIH) ou être associée à certaines situations particulières (ex : prise d'anorexigènes).

Si l'HTAP reste une maladie relativement rare, sa prévalence minimale en France étant de 15 à 50 cas par million d'habitants, elle est mortelle à très courte échéance (2,8 ans) si elle n'est pas diagnostiquée et traitée. Les symptômes initiaux de l'HTAP sont légers et peu spécifiques de la maladie et sont responsables d'un diagnostic et d'une prise en charge tardive. Pourtant, en identifiant et en traitant les patients le plus tôt possible, il est possible de retarder la progression de l'HTAP. Sans traitement spécifique, les patients souffrant d'HTAP modérée peuvent voir leur état se détériorer rapidement et atteindre en 6 mois un stade d'HTAP sévère.

Les options thérapeutiques ont progressé de manière considérable ces dix dernières années, en particulier celles qui s'attaquent aux mécanismes sous-jacents de la maladie. Les principales voies métaboliques impliquées dans la physiopathologie de l'HTAP ont été identifiées et constituent les cibles des traitements spécifiques. En parallèle, la recherche de médicaments ciblant de nouveaux mécanismes physiopathologiques représente un enjeu majeur pour les années à venir. Les tests de nouvelles molécules doivent se réaliser sur des modèles animaux prédictifs de la maladie, afin d'optimiser la sélection des candidats médicaments qui entreront en phase clinique.

L'objectif de ces études consiste donc à évaluer, chez l'animal, l'efficacité de nouveaux candidats médicaments sur un modèle d'HTAP chez le rat induit par une administration unique de

monocrotaline (MCT). La MCT est une toxine extraite de plantes qui est responsable d'atteintes cardiaques et pulmonaires similaires à celles rencontrées chez l'Homme. L'efficacité de composés candidats médicaments donnés aux animaux suite à l'administration du MCT peut alors être évaluée tout au long du protocole à l'aide de mesures échocardiographiques, et/ou en fin de protocole par mesure des pressions systémique et ventriculaire droite et évaluation du niveau d'hypertrophie du ventricule droit. Les données obtenues pour chaque paramètre peuvent être comparées aux données obtenues sur des animaux ayant reçu un traitement de référence et permettre ainsi l'évaluation précise de l'efficacité de nouveaux candidats médicaments. Ce modèle d'HTAP réalisé chez le rat compte parmi les modèles les plus classiquement utilisés en recherche préclinique pour mettre en évidence l'efficacité de nouveaux composés médicaments. Sa robustesse est validée par l'efficacité de plusieurs molécules de références aujourd'hui utilisées chez les patients souffrants d'HTAP.

Ce projet respecte le règle des 3R :

-Raffiner : Les animaux seront hébergés dans des conditions optimales pour diminuer le stress provoqué par l'expérimentation. De plus, une attention particulière sera apportée à leur état général par un examen clinique quotidien et une pesée hebdomadaire. Un traitement analgésique sera administré (Buprénorphine 0.01 mg/kg, sous cutanée) en cas de signe de douleur. Enfin, l'ensemble des mesures de l'évolution de l'HTAP seront réalisées sous anesthésie générale adaptée.

-Réduire : Pour tester l'efficacité d'un candidat médicament sur une série expérimentale, incluant un groupe sain (contrôle négatif), un groupe HTAP traité avec le véhicule (contrôle positif), 3 groupes tests avec un composé testé à 3 doses ou 3 composés testés à une dose chacun, et un groupe incluant un composé de référence ; le nombre total d'animaux nécessaire pour une série expérimentale sera de 72 animaux. Pour un total de 20 séries sur 5 ans, cela représentera 1440 animaux. Une analyse statistique adaptée sera réalisée à la fin de chaque série expérimentale et contribue à réduire le nombre d'animaux utilisés. Enfin, l'utilisation de l'échographie, examen non-invasif, permettra d'étudier finement l'évolution de la pathologie et contribue aussi à réduire le nombre d'animaux utilisés.

-Remplacer : A ce jour, aucuns modèles in-vitro ou modèles in silico ne permettent de tester l'efficacité d'un candidat médicament sur l'évolution des paramètres cardiaques et pulmonaires associés à l'HTAP.

18660 Le paludisme, causé par un protozoaire du genre *Plasmodium* est une des plus importantes maladies parasitaires touchant 40% de la population humaine mondiale en zone à risque. Bien que le parasite agent causal de cette maladie soit transmis lors du repas sanguin d'un moustique hématophage du genre *Anopheles* qui l'héberge au sein de ses glandes salivaires, des études menées sur le terrain, en Afrique, ont montré qu'une proportion d'anophèles sauvages est naturellement résistante au parasite, et ne sont donc pas des insectes hôtes et vecteurs de ce parasite.

L'analyse de populations d'anophèles qui se perpétuent en Afrique sub-saharienne- Afrique de l'Ouest- qui ne sont ni hôtes ni donc vectrices de *Plasmodium* a permis d'identifier, chez l'insecte hématophage de ce genre *Anopheles*, un locus génétique portant un certain nombre de gènes du système immunitaire dits «candidats» qui pourraient rendre compte de leur résistance ou caractère réfractaire au développement de l'agent causal du paludisme humain ou d'un parasite du genre *Plasmodium*/P. et d'espèces -P. berghei et P. yoelii-, adaptées aux rongeurs de laboratoire.

Ce projet consiste à tester ces gènes candidats, en utilisant une technique d'atténuation/extinction de l'expression de gènes que nous pouvons identifier depuis qu'a été séquencé le génome d'*Anopheles gambiae*.

Dans le cas présent du couple moustique/parasite, la réalisation du cycle infectieux complet du parasite impose que soient respectées les conditions naturelles c'est-à-dire que le moustique s'infecte en prélevant des globules rouges d'un animal préalablement infecté par le parasite. Le recours à l'animal est donc indispensable. Nous réduirons le nombre d'animaux utilisés au strict

minimum, c'est-à-dire à 600 souris sur 5 ans pour 25 gènes candidats à tester. L'infection n'engendrera qu'un impact modéré sur le bien-être des animaux, qui seront toutefois observés quotidiennement pour détecter toute souffrance ou douleur (inattendue) qui conduirait à une mise à mort prématurée.

La seule procédure utilisée qui consiste à infecter des souris par le parasite Plasmodium, suivie du gorgement des insectes, et de leur mise à mort, est de niveau modérée.

Ce projet nous permettra d'identifier les gènes du moustique impliqué dans sa résistance au parasite de rongeur.

18661 Les Coronavirus sont des virus à ARN qui circulent dans un grand nombre d'espèces animales. Quatre coronavirus humains endémiques sont apparus depuis ces 18 dernières années provoquant des épidémies plus ou moins importantes. La plus récente due au SARS-COV-2 est devenue une pandémie provoquant une maladie COVID-19 aux symptômes très variés et pouvant mener à une détresse respiratoire grave. Bien que des vaccins soient disponibles, les mutations successives observées au sein de la population mondiale pourraient conduire à l'échappement de ces derniers. Ainsi pour éviter une évolution vers des cas graves de l'infection au SARS-Cov2, la recherche d'un médicament antiviral reste indispensable.

La culture cellulaire in vitro n'étant pas un modèle suffisamment proche de ce qui se passe au sein d'un individu infecté, le recours à l'expérimentation animale est nécessaire. Nous ne testerons in vivo que les principaux antiviraux qui auront déjà prouvé leur action in vitro.

Quatre procédures expérimentales de sévérité modérée seront nécessaires afin de déterminer les conditions de traitement optimales pour atteindre l'effet antiviral souhaité – la dose, la durée d'exposition incluant un prétraitement ou non et la voie d'administration optimale. Les expériences seront réalisées chez des hamsters syriens dorés mâles ou des souris K18-hACE2 mâles de 5-6 semaines, modèles reconnus pour ce genre d'étude car mimant l'infection SARS-COV2 chez l'homme et l'inflammation associée. Un maximum de 10 antiviraux par an sur 5 ans seront testés et nécessiteront un maximum de 1780 hamsters mâles et 1540 souris mâles de 5-6 semaines. Nos estimations statistiques nous ont permis de réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés. Nous surveillerons le poids et l'aspect physique des hamsters et des souris quotidiennement pendant 4 jours (24 heures pré-infection jusqu'à 72 h post-infection), et mettrons les animaux à mort si un point limite est atteint. Les animaux seront mis à mort avant le prélèvement des organes pour déterminer la charge virale. La toxicité des nouvelles molécules sera évaluée en amont par un prestataire de services. Pour les composés qui seraient des médicaments approuvés, les données de biodisponibilité et de toxicité émaneront de la littérature. Au final, ce projet permettra de déterminer les antiviraux les plus efficaces contre le SARS-CoV-2 qui menace la population mondiale.

18662 Le contexte scientifique : La maladie de Huntington (MH) est une maladie génétique neurodégénérative rare qui se caractérise par la mort de neurones du système nerveux central, provoquant d'importants problèmes moteurs, cognitifs et sensoriels chez les patients. Toute personne portant une mutation du gène codant pour la huntingtine développera les symptômes de la maladie. Elle apparaît le plus souvent à l'âge adulte, entre 30 et 50 ans. Les patients perdent progressivement leurs capacités physiques et mentales. Il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement efficace permettant de ralentir ou de stopper la MH. La prévalence de la MH est d'environ 5 cas pour 100 000 individus. Seuls des traitements symptomatiques, destinés à réduire certains signes cliniques de la maladie et à faciliter la vie des patients, sont actuellement disponibles.

La protéine huntingtine mutante (mut-HTT) est responsable d'un grand nombre d'événements pathologiques dont les contributions relatives à la maladie des patients sont difficiles à estimer. La réduction importante et si possible spécifique du niveau de mut-HTT est supposée pouvoir corriger tout ou partie des dysfonctionnements contribuant à la mort des neurones dans le cerveau des patients. Des essais de thérapie génique et des tests de petites molécules thérapeutiques sont en cours pour tenter de diminuer la quantité de la protéine mutante chez les patients.

Dans le cadre de ce projet, nous avons identifié plusieurs médicaments repositionnables, qui sont déjà utilisés ou en cours de test pour le traitement du diabète ou des tumeurs solides. Ces médicaments sont capables de réduire le niveau de mut-HTT mutée dans des neurones humains pathologiques mis en culture en boîte de pétri. Nous travaillons actuellement à comprendre le mécanisme d'action et à valider l'activité de deux médicaments candidats identifiés, dans un système plus complexe pouvant récapituler une partie des manifestations cliniques observées chez les malades.

Le projet : - L'objectif de ce projet est d'établir une preuve de principe in vivo de l'efficacité thérapeutique de l'un de ces deux médicaments. Pour cela nous effectuerons une étude de pharmacodynamie (PD) des deux molécules sur un modèle rongeur de la maladie d'Huntington afin d'évaluer les interactions de ces molécules sur un organisme entier. D'autre part, leurs actions sur les symptômes comportementaux et les marqueurs de la maladie dans ce modèle seront également analysés. L'administration du traitement variera suivant les étapes du projet : soit par voie intrapéritonéale (étude PD), soit par voie orale (eau de biberon) soit via une pompe osmotique installée par chirurgie sous la peau des animaux (étude d'efficacité thérapeutique). Le comportement moteur de certains groupes de souris traitées ou non sera évalué en utilisant une série de test comportementaux classiques et non invasifs (test d'exploration en champ ouvert, d'activité locomotrice, de force d'agrippement, de grimpe).

Pourquoi travailler chez l'animal?

Ni la modélisation informatique ni l'expérimentation, in vitro, sur cellules ne permettent encore d'appréhender des processus très complexes relevant du développement des maladies cérébrales, en particulier les processus moteurs et cognitifs. Les agences réglementaires du médicament (e. g EMA) exigent l'évaluation de la pharmacodynamie (PD) ainsi que de l'efficacité de candidat médicament chez l'animal avant d'être testé chez l'humain. Le modèle rongeur de la maladie utilisé pour cette étude présente des changements fins de leurs capacités motrices et cognitives et certaines altérations de marqueurs cellulaires caractéristiques de la maladie de Huntington.

Combien de souris pour quels résultats ?

Le projet suivra un processus séquentiel: certaines expériences ne seront commencées que si les précédentes sont validées avec succès. Le nombre de souris par groupe varie entre 9 (pour les premières expériences PD), 12 (pour les expériences PD dans les souris modèle MH) à 24 (pour le test d'efficacité thérapeutique et pour les expériences de comportement), ceci afin de s'assurer que les expériences soient interprétables statistiquement. Jusqu'à 255 souris seront utilisées sur une période de 5 ans. Les résultats attendus seront de plusieurs ordres : 1) Evaluer la pharmacodynamie de deux molécules en comparaison de conditions contrôles ou de références ; 2) Evaluer le potentiel thérapeutique de la meilleur des deux molécules contre la maladie de Huntington dans un modèle génétique chez la souris.

Les protocoles de chirurgie (installation de pompes osmotiques) prévus ont été mis au point de façon à réduire au maximum la douleur (sous anesthésie générale et utilisation systématique d'analgésiques per et post-opératoires), et le stress induit par cette étude (suivi journalier par les zootechniciens et hebdomadaire par les expérimentateurs). En outre, le bien-être des animaux reposera sur la présence d'accessoires d'enrichissement de leur milieu de vie.

18663 Les surexpositions accidentelles aux rayonnements ionisants concernent différentes catégories de personnes (travailleurs, patients, public). Ces expositions peuvent être individuelles lors d'accident radiologique ou au contraire de grande ampleur lors d'acte de malveillance.

L'exposition aux rayonnements ionisants à forte dose induit des dommages vasculaires qui à long terme conduit à de la nécrose tissulaire. Le traitement actuel repose sur la chirurgie et l'injection de MSC connues pour leur action anti-inflammatoire et leur potentiel pro-angiogénique. Cependant, l'utilisation des MSC présente des limites telle que : la durée des protocoles, la possibilité de non-qualification du greffon et surtout la transplantation autologue permettant de traiter qu'un faible nombre de patient.

Pour pallier ces limites, le développement de stratégie thérapeutique permettant de répondre à un nombre important de patients, tout en permettant des facilités de stockage et de transport est indispensable afin de limiter les effets délétères à court et long terme.

Nous avons démontré l'efficacité de l'injection d'exosomes issus de MSC pour améliorer la formation de nouveaux vaisseaux et la cicatrisation cutanée. Les exosomes sont des vésicules extracellulaires produits par les cellules lorsqu'elles sont activées et possèdent des capacités bio-actives. Dans le cas des accidents d'irradiation d'origine industriel ou médical, les patients présentent après plusieurs années une fonte musculaire sévère (rhabdomyolyse), associée à de la fibrose pouvant aller jusqu'à la nécrose à long terme au niveau du muscle sous-jacent pouvant mettre en jeu le pronostic vital du patient. Plusieurs équipes ont démontré après lésion musculaire, le rôle indispensable d'une sous-population de lymphocytes T, appelés T régulateurs au cours du processus de réparation du muscle. Les T régulateurs favorisent (1) la prolifération et l'assemblage des cellules satellites souches du muscle aux fibre musculaires existantes, (2) ils permettent le transfert des macrophages et des LT activés d'un phénotype pro-inflammatoire vers un phénotype anti-inflammatoire et ainsi régénérer le muscle.

Le but du projet est de proposer un traitement des brûlures radiologiques chez la souris basée sur l'injection des exosomes issus de cellules souches mésenchymateuses (MSC) améliorant la formation de nouveaux vaisseaux et la cicatrisation cutanée et de l'interleukine-2 (IL-2) pour favoriser la régénération musculaire afin d'obtenir un effet combinatoire.

Dans le cadre du respect de la règle des 3R, les protocoles expérimentaux sont établis avec un nombre d'animaux réduit mais suffisant pour obtenir des résultats pertinents.

Les animaux seront irradiés avec un accélérateur linéaire au niveau du membre inférieur gauche. Ils pourront recevoir des produits (IL-2, exosomes etc. .) par différentes voies. Les animaux seront euthanasiés à différents temps post-irradiation.

Les études moléculaires et cellulaires se feront sur des prélèvements réalisés sur un modèle murin anesthésié avant ou après euthanasie. Le nombre total d'animaux utilisés pour ce projet sera de 620.

18664 Les acides biliaires produits par les cellules du foie jouent un rôle important non seulement dans la digestion des aliments mais aussi dans la régulation des réactions chimiques permettant de synthétiser et/ou de dégrader les glucides (sucres) et les lipides (graisses), puis d'éliminer les déchets toxiques pour les cellules de l'organisme. A ce jour, deux molécules senseurs relaient l'action des acides biliaires avec des défauts d'activité qui mènent au développement de maladies comme la stéatose (foie gras), le diabète et l'obésité. Le récepteur nucléaire FXR α , exprimé dans les cellules de l'organisme dont le foie, agit comme l'un de ces senseurs chez l'homme et la souris avec quatre formes naturelles capables de diriger la transformation et l'élimination des glucides et des lipides en réglant l'activité d'une série de gènes spécifiques. L'objectif du projet vise à étudier les propriétés et les fonctions biologiques d'une nouvelle forme variante du récepteur FXR α récemment isolée par notre laboratoire en utilisant une approche physique de transfert de gènes par injection hydrodynamique chez la souris adulte. Il s'agit d'un procédé qui consiste à injecter rapidement dans la veine latérale de la queue de souris un grand volume de solution saline contenant l'ADN à intégrer dans les cellules de foie avec un pourcentage d'efficacité élevé chez cette espèce. Le projet prévoit l'utilisation de 144 souris sur 5 ans (12 lots de 4 souris à répéter 3 fois) avec une première série d'études préliminaires visant à valider la méthode d'administration par intégration d'un gène traceur codant une protéine fluorescente verte, puis à confirmer la bonne expression des gènes de FXR α et de sa forme variante dans les cellules de foie. L'analyse cellulaire et moléculaire des tissus prélevés chez l'animal mis à mort par une personne compétente 2 jours après injection autorisera des études complémentaires (histologiques, biologiques et génétiques) visant à définir les fonctions physiologiques remplies par ce nouveau variant de FXR α . L'intégrité des réactifs (solution saline, ADN) a été validé en système cellulaire avant injection chez l'animal afin de répondre à l'exigence de remplacement tout en assurant la fiabilité des résultats qui seront obtenus dans le respect des 3Rs. Le regroupement des expériences réduira le nombre de groupes témoins dans les lots d'animaux qui seront maintenus sous anesthésie gazeuse lors des injections

afin de raffiner notre procédure tout en réduisant le stress et la douleur induite par l'injection. Enfin, la mise en place d'une grille de suivi permettra de détecter des signes de mal-être chez les animaux depuis leur réveil jusqu'à leur mise à mort par les responsables du projet et le personnel chargé des soins aux animaux. Tous les animaux utilisés dans ce projet seront hébergés en groupe sociaux avec enrichissement du milieu afin de satisfaire aux exigences de l'arrêté du 1er février 2013 relatif à l'évaluation éthique et à l'autorisation des projets impliquant l'utilisation d'animaux dans des procédures expérimentales. Les données que nous collecterons éclaireront les fonctions biologiques de ce nouveau variant de FXR α et pourraient à terme permettre de comprendre comment son activité peut participer au métabolisme hépatique et au développement de maladies métaboliques (stéatose, diabète, obésité).

18665 L'élevage laitier doit actuellement répondre à des enjeux sociétaux, environnementaux et sanitaires, particulièrement prégnants pour les élevages engagés dans la production de fromage au lait cru. La mise en œuvre de pratiques agroécologiques se présente comme une des voies de renforcement des services écosystémiques rendus par les systèmes laitiers, ainsi que de leur durabilité et leur résilience. Ces pratiques modifient le fonctionnement technico-économique des exploitations, le travail qui s'y déploie ainsi que l'écologie et le fonctionnement des formes de vie co-existantes, dont dépend la production de fromages de qualité et différenciés. Elles influencent un ensemble d'écosystèmes interconnectés depuis le sol jusqu'au produit, impliquant une grande diversité d'holobiontes (biocénose prairiale, ruminant, consommateur) et de microbiotes environnementaux. Or, holobiontes et microbiotes renouvellent aujourd'hui la manière d'appréhender le statut des vivants dans le travail en élevage, questionnant la perception qu'ont les éleveurs de « ces formes de vie » et les relations et signes par lesquels ils interagissent. Dans ce contexte, l'ambition de l'expérimentation TANDEM est de caractériser les impacts de changements de pratiques agricoles en comparant des systèmes intensifs et agroécologiques, et les effets de perturbation au sein de ces systèmes.

Pour tester l'hypothèse selon laquelle l'intensification des modes d'élevage modifie à la fois le degré de transfert microbien entre les compartiments du système et la stabilité des transferts microbiens en réponse à une perturbation du système, une expérimentation de 4 mois sera mise en place pendant la saison de pâturage 2021 dans un système laitier de montagne, dont le but sera de comparer les effets de deux modes de conduite (intensif vs extensif) sur 4 lots de 10 vaches laitières (soit 40 animaux au total), et des perturbations visant à simuler un déficit fourrager esival qui seront appliquées à 2 de ces lots (1 intensif et un extensif). Le microbiote de plusieurs compartiments le long de la chaîne alimentaire sera caractérisé pendant l'expérience : sol, végétation, zones de couchage des animaux, trayons, lisier, fèces, liquide ruminal, lait et air. Des analyses à échelle fine sont essentielles pour une compréhension mécaniste de la performance du système dans son ensemble et pour la quantification des liens dynamiques entre les compartiments du système.

Cette expérimentation sera menée dans le respect de la règle des 3R. Il n'est pas envisageable de remplacer l'utilisation de vaches laitières pour cette expérimentation. Toutefois, le nombre d'animaux est réduit (10 par lot) au maximum, de manière à obtenir des données fiables et interprétables. Enfin, les conditions de logement des animaux, notamment en stabulation, répondent aux exigences réglementaires et vont même au-delà grâce à des équipements permettant un confort optimum des vaches (matelas, brosses. . .) et un suivi fin de leur santé et de leur bien-être (outils d'élevage de précision). Il a par ailleurs été choisi de les faire pâturer la journée l'été et de ne pas les laisser en bâtiment pour des raisons de bien-être. Les procédures non-invasives ont été privilégiées, de réduire la durée de l'étude et d'appliquer les points limites établis pour réduire la douleur et l'anxiété des animaux.

18666 La cartographie in vivo de l'irrigation sanguine du muscle cardiaque est d'un grand intérêt pour le diagnostic de la sévérité de la maladie coronarienne. En effet, la détection d'une zone du muscle du cœur faiblement irriguée mais toujours vivante permet de valider le recours à une intervention chirurgicale de revascularisation qui va permettre aux patients d'améliorer leur fonction systolique

et ainsi leur confort de vie. En revanche, pour les patients dont le muscle cardiaque n'est plus viable, l'opération chirurgicale n'apportera pas les bénéfices escomptés.

L'imagerie de l'irrigation sanguine est difficile à réaliser chez les patients car les principales modalités d'imagerie cardiaque telles que la tomodensitométrie (scanner) ou l'imagerie par résonance magnétique (IRM) ne le permettent pas directement.

La tomographie par émission monophotonique (TEMP) et la tomographie par émission de positrons (TEP) restent encore actuellement les méthodes de référence pour la définition de la viabilité du muscle cardiaque. Ces méthodes d'imagerie permettent de cartographier directement l'absorption de différents traceurs métaboliques radioactifs. Cependant, ces méthodes d'imagerie utilisent des traceurs radioactifs, coûteux et peu disponibles, ce qui limitent énormément l'accès des patients à ce diagnostic.

En 2018, une étude pionnière a montré que l'imagerie métabolique du glucose peut aussi être réalisée par IRM au deutérium et produire des images présentant le même contraste que le PET. Le marquage au deutérium n'induit aucune toxicité ni radiation et est relativement bon marché comparé au PET. L'utilisation de cette technique chez l'homme a déjà montré son grand potentiel pour l'imagerie et la caractérisation des tumeurs cérébrales.

Le but de ce projet est de démontrer les potentialités de l'IRM du deutérium pour la caractérisation de l'état de santé du muscle cardiaque en suivant la captation du glucose ou de l'eau enrichis en deutérium dans le myocarde du rat. Le principal défi de l'étude sera d'imager le métabolite à haute résolution spatiale dans un organe en mouvement (le cœur).

La règle des 3R est particulièrement respectée dans ce projet :

-REPLACEMENT : La majorité des développements méthodologique (développements et tests des séquences) ont pu être réalisés ex vivo. Cependant il n'existe pas de méthode alternative à l'expérimentation animale pour l'évaluation de cette d'imagerie métabolique cardiaque permettant de prendre en compte tous les paramètres physiologiques.

-REDUCTION. Le projet requiert l'utilisation d'un nombre minimal d'animaux (10 au total) pour valider cette imagerie métabolique en conditions physiologiques. Etant donné que le projet n'est pas invasif et est de sévérité dite légère, l'équipe projet mettra tout en œuvre pour réutiliser par la suite ces animaux dans d'autres protocoles.

-RAFFINEMENT : les animaux sont hébergés dans des locaux agréés et bénéficient d'une surveillance et de soins quotidiens dispensés par du personnel compétent et soucieux du bien-être animal. Ils disposent d'enrichissements adaptés (litière, nid de cellulose), des points limites précis sont définis et suivis tout au long du projet.

18667 Chlamydia trachomatis est une bactérie responsable d'infections oculaires, notamment le trachome, et génitales, qui représentent un problème majeur de santé publique. En effet, le trachome touche, par exemple, près de 84 millions de personnes dans le monde dont environ 8 millions ont une déficience visuelle. À l'échelle mondiale, on estime que le trachome cécitant est endémique dans 53 pays, dans les zones où l'hygiène personnelle et communautaire est insuffisante. Les infections génitales causées par Chlamydia trachomatis constituent, quant à elles, la première infection sexuellement transmissible (IST) dans le monde. L'OMS estime à 131 millions le nombre de personnes contractant une infection génitale à Chlamydia trachomatis chaque année et reconnaît l'importance de cette infection ainsi que le taux d'infection croissant chez l'adolescent(e).

Le trachome, l'une des maladies oculaires infectieuses les plus anciennement connues, reste une cause majeure de cécité irréversible dans le monde (en particulier dans les pays non industrialisés). Chlamydia trachomatis, bactérie responsable de cette infection, se transmet par contact direct avec les écoulements oculaires des sujets infectés ou avec divers objets contaminés (serviettes, gants de toilette), et également par les mouches « ophthalmotropes », vecteurs de la bactérie. L'infection débute durant l'enfance : après des années de réinfections répétées et en l'absence de traitement, l'intérieur de la paupière se retourne vers l'intérieur (entropion) et les cils viennent frotter le globe oculaire (trichiasis), en particulier la cornée (membrane transparente de l'œil). Si cet entropion-

trichiasis n'est pas traité chirurgicalement, ces lésions entraînent une opacification cornéenne, responsable d'une cécité irréversible.

De la même façon, les infections génitales causées par *Chlamydia trachomatis* sont souvent répétées et mal traitées, responsables de complications et de séquelles graves (infection de l'utérus, des trompes, stérilité).

Les souches de *Chlamydia trachomatis* impliquées dans les IST sont très proches de celles responsables du trachome, et bien qu'elles soient distinctes, les souches « génitales » ont une pathogénicité oculaire, et réciproquement, les souches « oculaires » ont une pathogénicité génitale. La solution pour la prévention des infections à *C. trachomatis* serait un vaccin qui, idéalement, devrait induire une immunité systémique et aux niveaux des muqueuses oculaires et vaginales. Malgré plusieurs décennies d'essais, un vaccin satisfaisant n'a pas encore été développé. Ceci est dû aux connaissances limitées des mécanismes par lesquels *C. trachomatis* est reconnu par le système immunitaire.

L'objectif de ce projet est d'étudier et de caractériser la physiopathologie de l'infection oculaire mais aussi vaginale par la bactérie *Chlamydia trachomatis* et d'évaluer l'immunogénicité et l'efficacité de nouvelles stratégies vaccinales chez un modèle de primate non humain. L'efficacité préventive de ces nouvelles stratégies sera évaluée sur des modèles expérimentaux d'infections oculaires et vaginales à *Chlamydia trachomatis* utilisant des souches bactériennes impliquées en pathologie humaine. Ce projet s'inscrit dans le cadre d'un programme de recherche européen dont l'objectif est d'améliorer les connaissances scientifiques dans le domaine de la vaccinologie pour développer une nouvelle génération de vaccins plus efficaces. Ses résultats pourraient conduire à la mise en place d'essais cliniques.

Il est aujourd'hui impossible de reproduire *in vitro* la complexité d'une infection bactérienne et de la réponse immunitaire de l'organisme. Le recours à un modèle animal est donc nécessaire pour apporter un maximum d'informations avant la réalisation d'essais cliniques chez l'humain, et ne peut être remplacé par tout autre modèle ne représentant que partiellement un organisme. Le primate non humain choisi pour ce projet est le modèle le plus pertinent pour corrélérer les données de physiopathologie, d'immunogénicité et d'efficacité à ceux qui seront obtenus chez l'humain de par leur proximité génétique.

Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux a été réduit au minimum nécessaire tout en restant compatible avec l'utilisation de tests statistiques pour permettre l'interprétation des résultats. Le projet prévoit d'utiliser au maximum 66 animaux nés et élevés en captivité dans un établissement agréé. 18 animaux au maximum permettront l'étude et la caractérisation physiopathologique du modèle d'infection par *Chlamydia trachomatis* (oculaire et vaginale). 48 animaux au maximum permettront de comparer l'efficacité et l'immunogénicité de nouveaux vaccins candidats contre les infections à *Chlamydia trachomatis*.

Les méthodes expérimentales (prélèvements sanguins et tissulaires) ont été définies de manière à limiter la souffrance lors des interventions (limitation des volumes sanguins prélevés ; imagerie *in vivo* afin de limiter le plus possible le recours à des biopsies tissulaires ; administration vaccinale et médicamenteuse et inoculation bactérienne réalisées sous anesthésie générale). Les critères d'arrêt sont prévus dans le projet en cas de progression de la maladie ou d'éventuels effets inattendus du vaccin et des adjuvants. Les vétérinaires de l'installation seront alertés et mettront en œuvre des traitements en adéquation avec l'expérience. Les animaux seront hébergés en groupe lors des phases d'immunisation et en individuel dans des modules contigus permettant des interactions sociales lors de la phase d'infection (10 semaines). Ils bénéficieront d'un programme défini par la cellule « bien-être animal » de l'établissement pour l'enrichissement de leur milieu de vie et qui sera renforcé lors des phases d'hébergement individuel.

18668 L'ischémie critique des membres inférieurs (CLI pour critical limb ischemia) est la forme la plus avancée de maladie artérielle périphérique. La CLI est le plus souvent définie comme un syndrome clinique comprenant une douleur ischémique au repos, une ulcération non cicatrisante et une gangrène. C'est une maladie chronique évolutive qui nécessite une prise en charge lourde et

prolongée des patients. Les premiers soins sont médicamenteux et tournés vers le traitement des plaies, et de la douleur si elle est présente. La guérison des plaies est impossible chez la plupart des patients atteints de CLI qui ont un flux sanguin réduit dans la peau ; par conséquent, même avec un traitement local agressif des plaies, les patients souffrant d'ischémie grave des membres et d'ulcération chronique qui ne subissent pas ou ne peuvent pas subir de revascularisation sont souvent amputés.

Les populations de CLI sont difficiles à étudier et de nombreux ensembles de données sont incomplets en raison de l'importance des pertes de suivi et des décès dans les études longitudinales, mais on prévoit qu'il y aura environ 500 à 1000 nouveaux cas de CLI par million chaque année.

Le système de reconstruction vasculaire testé dans le présent projet crée une "nouvelle artère" à partir d'une veine.

Chez les patients souffrant d'ischémie critique affectant le pied, l'option thérapeutique actuellement la plus fréquemment utilisée consiste à créer une fistule entre l'artère et la veine tibiales. Une fois cette fistule créée, une endoprothèse couverte (stent graft), c'est à dire un tube biocompatible maintenant les vaisseaux ouverts, est déployée à travers la fistule et le long de la veine pour diriger le sang vers le pied. En rétablissant la circulation de sang oxygéné dans le pied ischémique, la douleur est réduite, la cicatrisation des plaies est favorisée, et le nombre d'amputation peut être réduit. Le rôle de ces stents est de maximiser l'écoulement du sang vers le pied en maintenant les valves du mollet ouverts, tout en empêchant les petites veines de reprendre le flux vers le cœur.

Le présent projet évalue l'intérêt de stent dit « fenestré » permettant de faire passer le sang dans la veine, tout en préservant le flux dans l'artère, ouvrant ainsi la procédure à des patients à un stade moins avancé de la maladie.

Dans cette étude, l'objectif sera donc de tester plusieurs nouveaux concepts de stents grafts chez le porc, et pour chacun d'évaluer : la facilité et la précision de la mise en place des stents, le flux à travers les vaisseaux principaux et bifurqués, la viabilité de l'implantation à court terme. Compte tenu de la complexité de l'affection considérée et du caractère intégratif des critères étudiés, cette étude ne peut pas être mimée in vitro (absence de Remplacement possible).

Les premières études étant principalement des essais de faisabilité avec preuve de concept, il est prudent de commencer avec un nombre très réduit d'animaux (2) pour chaque étude. Le nombre total d'étude à réaliser pour atteindre notre preuve de concept sera lui aussi réduit au maximum, nous n'envisageons pas plus de 5 études, soit un total maximum de 10 animaux.

La phase Chirurgicale sera réalisée sur des animaux anesthésiés avec une administration d'antalgique, pour prévenir toute souffrance de l'animal. Au delà du réveil, des analgésiques sont administrés et adaptés à d'éventuelles manifestations de douleur. Un enrichissement du milieu et la distribution de friandises sont destinés à réduire le stress ressenti par les animaux (Raffinement).

18669 La dégénérescence fronto-temporale (DFT) est une maladie neurodégénérative irréversible qui touche principalement le lobe frontal et temporal du cerveau. Elle représente 20% des démences dégénératives, soit l'une des plus fréquentes après la maladie d'Alzheimer. Les patients atteints de cette maladie présentent des déficits amnésiques, des troubles du comportement, de la personnalité, des mouvements et du langage. La prévalence de la DFT varie entre 1 sur 6000 personnes et 1 sur 30000 selon l'âge. La maladie atteint aussi bien les hommes que les femmes. Malgré les avancées scientifiques importantes dans ce domaine, les causes exactes de cette maladie restent inconnues mais dans certains cas des mutations génétiques sont mises en cause. Il n'y a aujourd'hui aucune thérapie réellement efficace contre cette maladie, d'où la nécessité de continuer la recherche pour mieux comprendre la physiopathologie de ces troubles et trouver une pharmacothérapie plus efficace.

Une des mutations génétiques qui seraient impliquées dans cette maladie est celle du gène de la progranuline (GRN). La fréquence des mutations de ce gène varie de 5 à 22% chez les patients souffrant des DFT. La progranuline est une protéine qui joue un rôle important dans la réponse inflammatoire, la croissance et la survie cellulaire. Une mutation du gène GRN conduira à une

diminution de la production de cette protéine et par conséquent à l'altération de ses fonctions et en particulier de ses propriétés neurotrophiques.

Les modèles animaux des maladies neurodégénératives demeurent des éléments critiques dans la compréhension de la physiopathologie de ces maladies, l'identification des nouvelles cibles et de nouveaux candidats médicamenteux ainsi que la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents. Ce projet vise à caractériser les troubles comportementaux d'une souris transgénique déficiente du gène de progranuline. Quatre tests comportementaux seront réalisés à l'âge de 12 mois couvrant des mesures comportementales équivalentes aux symptômes observés chez les patients atteints des FDT. Les procédures élaborées dans ce projet ont été étudiées attentivement et caractérisées de façon extensive par une bibliographie approfondie. Ainsi, les techniques utilisées dans ce projet ont été optimisées, afin d'assurer un maximum de bien-être pour l'animal dans le strict respect des 3Rs.

Un soin particulier dans le raffinement des méthodes est assuré et garantit l'utilisation systématique du modèle apportant le maximum de réponses scientifiques et le minimum de souffrance pour l'animal. En particulier, des points limites clairs sont établis (incluant une surveillance quotidienne de l'aspect général, l'aspect du pelage, des yeux, la posture, les réactions de l'animal quand il est approché ou stimulé, la respiration, l'appétit, le poids, l'état d'hydratation, les tremblements ou convulsions), afin d'assurer d'une part, un bon suivi des animaux et d'autre part, une fin sans souffrance ou angoisse. Les méthodes d'euthanasie choisies sont sélectionnées pour supprimer toute forme d'angoisse, de stress ou de douleur.

De leur arrivée au laboratoire jusqu'à leur sacrifice, les animaux sont manipulés avec soin, habitués à l'humain, manipulés fréquemment et leurs conditions de vie sont constamment améliorées pour garantir un environnement de vie enrichi (tunnels, matériels de nidation et matériels à ronger). Les souris de souche C57BL/6 mâle sont connues par leur agressivité à partir de l'âge de 6 semaines. Des observations au sein de notre laboratoire ont confirmé cette agressivité chez ces souris. Les souris transgéniques utilisées dans le cadre de ce projet ont été créées sur un fond génétique C57BL/6. Pour cette raison, les souris mâles utilisées dans ce projet seront hébergées individuellement pour éviter des blessures aboutissant parfois à la mort des souris agressées par leurs congénères. L'hébergement individuel sera mis en place dès la réception à l'âge de 6 mois et ce, jusqu'à la fin de l'étude comportementale réalisée à l'âge de 12 mois. La durée d'hébergement individuel ne peut pas être réduite car l'étude comportementale doit être réalisée à un âge suffisamment avancé pour garantir l'observation des déficits comportementaux liés à la maladie qui est progressive et qui survient chez l'homme autour de l'âge de 45-65 ans.

En fin des expériences comportementales, tous les prélèvements nécessaires (histologie, prélèvements de sang, de structures cérébrales etc...) seront réalisés de façon à pouvoir effectuer l'ensemble des analyses nécessaires sur les mêmes lots. Cela permet de réduire significativement le nombre d'études. L'ensemble de ces mesures permet de réduire le nombre d'animaux inclus dans les expériences, de façon à optimiser les réponses scientifiques tout en garantissant une puissance statistique suffisante pour interpréter les résultats de façon correcte, évitant ainsi une répétition des tests. 90 souris seront utilisées dans ce projet (3 souris Grn-/-, 30 WT et 30 souris C57BL/6 pour être utilisées comme souris étrangère dans le test de sociabilité).

18670 Les infections mammaires des bovins sont fréquentes en élevage, elles sont responsables de pertes économiques qui fragilisent les exploitations agricoles et impactent le bien-être des animaux. Le développement des connaissances sur l'immunologie des bovins est nécessaire pour améliorer les moyens d'intervention, notamment les approches vaccinales, permettant de réduire la fréquence et la sévérité des infections.

Le premier objectif du projet est d'acquérir de nouvelles connaissances sur les cellules immunitaires sanguines (lymphocytes, monocytes, neutrophiles) des bovins laitiers par l'étude de leurs caractéristiques et de leur réponse à des infections bactériennes (Tâche 1). Nous chercherons également à développer un protocole pour caractériser la diversité des réponses de ces cellules sanguines à une infection par des bactéries (Tâche 2). Un troisième objectif sera de tester la

capacité de nouveaux vecteurs vaccinaux à stimuler la réponse lymphocytaire chez le bovin (Tâche 3).

Pour les deux premiers objectifs aucun traitement ne sera administré aux animaux. Il s'agira de prélever du sang sur des vaches laitières élevées en conditions conventionnelles. Un nombre de donneurs de sang suffisant pour la réalisation des travaux tout en évitant une fréquence élevée de prises de sang sera prévu. Pour ces deux objectifs, un maximum de 150 animaux seront concernés sur la période de 5 ans.

Pour le troisième objectif 10 animaux seront immunisés par voie intramusculaire avec un antigène modèle (ovalbumine, protéine majoritaire du blanc d'oeuf) dilué dans un adjuvant commercial spécifiquement conçu pour l'usage chez le bovin. L'ovalbumine, antigène modèle amplement utilisé dans le domaine de l'immunologie, est exempt de risque infectieux pour l'homme et pour les animaux.

Le projet est conçu pour être en conformité avec les exigences 3R :

Remplacement : Comme chez l'homme, le prélèvement de sang est une méthode courante et peu invasive qui permet de ne pas porter atteinte à l'intégrité de l'animal. Les cellules du sang de bovin ne peuvent pas être remplacées par celles d'une autre espèce. La démarche de caractérisation in vitro de la diversité des réponses de ces cellules sanguines à une infection par des bactéries a pour but de caractériser la capacité d'un animal à répondre à une infection tout en limitant le recours à des infections expérimentales sur animal vivant.

Réduction : Le nombre d'animaux est calculé pour l'obtention de résultats statistiquement exploitables sans imposer une répétition excessive des prises à chaque animal donneur.

Raffinement : Les prises de sang réalisées à la veine jugulaire ne nécessitent qu'une contention minimale, les animaux étant habitués à être pris au cornadis pour la distribution des aliments. La douleur causée par l'aiguille ne nécessite pas d'anesthésie. Les animaux sont maintenus dans leur environnement habituel.

18671 Le sepsis humain est caractérisé par un dysfonction d'organe menaçant le pronostic vital et causé par une réponse inappropriée de l'hôte à une infection. Actuellement, la septicémie se classe parmi les dix premières causes de mortalité dans les unités de soins intensifs.

Le modèle animal expérimental le plus largement utilisé est la ligature caecale et perforation (CLP) permettant la libération de matières fécales dans la cavité péritonéale pour générer une réponse immunitaire exacerbée induite par une infection polymicrobienne. Ce modèle permet d'induire un sepsis de gravité approprié, contrôlé et générant des résultats constants et reproductibles, proche de ceux observés chez l'homme.

La phase préclinique qui consiste à l'étude de l'action des agents pharmacologiques in vivo chez le rongeur est une étape essentielle dans le développement de médicaments. Ce projet a pour but de tester de nouveaux médicaments antibiotiques et/ou anti-inflammatoires dans un modèle animal de sepsis. Les animaux vont être anesthésiés et une partie de leur caecum va être ligaturé et perforé avec une aiguille. Les animaux seront ensuite mis à mort au bout de 1 (dans le cas d'un traitement préventif) ou 6 jours (dans le cas d'un traitement curatif) afin d'analyser différents paramètres immunologiques. Ceci permettra d'étudier l'efficacité des molécules testées sur le développement de la maladie. Une grille de scoring très précise sera utilisée afin de suivre les dommages liés à la pathologie comprenant: l'apparence des animaux, l'activité de la souris, la réponse à un stimulus, l'aspect des yeux (sécrétions, ouverts/fermés), la respiration et le poids. Ces paramètres seront évalués 1 fois par jour et les animaux seront observés 2 fois par jour.

L'animal utilisé est la souris C57BL/6 ou BALB/c. La ligature et la perforation du caecum se fait sous anesthésie générale afin de minimiser les situations douloureuses et stressantes. Une surveillance quotidienne des animaux est effectuée pendant la période d'acclimatation et d'expérimentation. Les conditions d'hébergement sont celles requises par l'annexe II de l'arrêté relatif à l'agrément des EU. Les animaux seront mis à mort selon la réglementation en vigueur.

Le projet représente un ensemble d'études types. Le nombre d'études réalisées durant la période de validité de l'autorisation va dépendre des résultats obtenus et du nombre de molécules à tester. Le projet pourra comporter jusqu'à 10 études, incluant au maximum 180 animaux, soit 1800 souris au total. A ce jour, l'animal de laboratoire reste le seul recours fiable et pertinent permettant d'étudier les mécanismes d'inflammation et de régulation. Ce projet sera réalisé en respectant les principes fondamentaux de l'expérimentation animale :

-Remplacement : le modèle animal est fondamental dans notre cas, puisque l'étude de l'inflammation et de la pathologie ne peut se faire que sur un organisme vivant entier.

-Raffinement : La partie chirurgie (ligature et perforation du caecum) sera effectuée sous anesthésie générale xylazine/kétamine. Les animaux sont observés quotidiennement pour s'assurer du bien-être des animaux et éviter au maximum la douleur au moment de l'expérimentation. Si des animaux montrent des signes de souffrance (points limites: décrit dans la procédure), ils seront mis à mort. Enfin, les souris seront hébergées dans des cages en portoir ventilé enrichies avec du Celuron. Elles auront un accès à l'eau et la nourriture ad libitum et un cycle jour/nuit 12h/12h pendant toute la durée de l'expérimentation.

-Réduction : Le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats pertinents et reproductibles, évitant ainsi de refaire plusieurs fois les mêmes expérimentations.

18672 La cowdriose est une maladie des ruminants transmise par les tiques du genre *Amblyomma*.

Elle est présente sur toute l'Afrique sub-saharienne et en Guadeloupe et Antigua. Elle a un impact économique fort avec une forte mortalité sur les petits ruminants, les chèvres et moutons étant beaucoup plus sensibles à la maladie que les bovins. En Afrique, les communautés les plus touchées par la perte de production dans les petits élevages sont les femmes et les enfants qui sont détenteurs de moutons et chèvres.

Afin d'améliorer le contrôle de la cowdriose, plusieurs vaccins expérimentaux ont été développés dont le vaccin inactivé qui semble le plus prometteur. Les objectifs du projet sont l'évaluation d'un vaccin multivalent intégrant plusieurs souches de la bactérie causant la maladie, en limitant le nombre d'injection (une au lieu de deux par rapport au vaccin conventionnel, et en testant un adjuvant de nouvelle génération. Cette démarche devrait permettre de couvrir la diversité antigénique des souches et de rendre ainsi le vaccin inactivé plus efficace sur le terrain. Une fois les conditions d'utilisation du vaccin multivalent précisées (une seule injection à la dose optimale) grâce aux essais en conditions contrôlées, il sera ensuite testé sur le terrain au Burkina Faso et au Kenya, voir même en Afrique du Sud. Les analyses réalisées lors des essais vaccinaux notamment sur la réponse immunitaire devraient permettre d'identifier des biomarqueurs de vaccination ou de protection qui seront essentiels pour limiter les interventions sur les animaux vaccinés lors des campagnes de vaccination ou les essais expérimentaux futurs.

Deux types d'expérience seront réalisés en conditions contrôlées : un test de vaccination avec une souche vaccinale unique émulsionnée avec le nouvel adjuvant et administré en une ou deux injections.

Dans un deuxième temps, une deuxième expérience consistera à évaluer l'efficacité d'un vaccin contenant quatre souches de géotypes différents dans les conditions fixées lors de la première expérience (nombre d'injection et dose vaccinale).

Ces essais seront effectués sur 49 chèvres qui n'ont jamais été en contact avec la maladie (naïves). Nous avons limité le nombre de chèvres utilisées pour ces expériences à 5 par groupe. Il n'est pas possible de diminuer plus le nombre d'animaux car il existe une variabilité importante entre individus et dont il faut tenir compte dans l'étude de l'efficacité du vaccin. L'utilisation de doses calibrées pour infecter les animaux permet aussi de réduire le nombre d'animaux du groupe contrôle lors de la deuxième expérience (3 animaux par souche utilisée). Etant donné que l'effet lors de l'infection est conséquent et que la morbidité sur les animaux est de 80 à 100%, il n'est pas nécessaire d'avoir un grand nombre d'animaux pour démontrer un effet de la vaccination sur les animaux. Les chèvres utilisées seront en bonne santé avant l'expérimentation maintenues en conditions d'élevage hors

sol et elles seront suivies de manière journalière avant et pendant leur mise en expérimentation pour évaluer tout signe d'inconfort qu'elles pourraient avoir. Lors de la vaccination, les chèvres pourront avoir une légère douleur avec le développement d'une induration au niveau de la piqûre mais cette douleur et induration devraient être limitées à 24h00 par l'utilisation des nouveaux adjuvants contenus dans le vaccin. La douleur induite est estimée inférieure à celle d'une injection avec aiguille pratiquée par un vétérinaire et ne nécessite pas l'administration supplémentaire d'antidouleurs. Il n'y a pas d'autres effets secondaires associés à la vaccination.

Les groupes contrôles non vaccinés seront affectés par la maladie mais traités aux antibiotiques pour éviter toute mortalité. Les animaux vaccinés et infectés vont aussi développer des signes cliniques importants, mais ne devraient mourir. Il a été montré pour le vaccin conventionnel contenant l'antigène Gardel et l'adjuvant ISA70 ou ISA70M (35µg d'antigène et 2 injections), une protection de 80 à 100% pour les animaux vaccinés. Les animaux ayant 3 jours consécutifs de fièvre seront traités aux antibiotiques.

Il n'existe pas de moyen alternatif pour évaluer l'efficacité vaccinale, notamment, il n'existe jusqu'à présent aucun test ou marqueurs biologique de prédiction de la vaccination ou de la protection. D'autre part, l'utilisation du modèle souris pour faire des essais de vaccination ne sont pas possibles car les résultats obtenus sur modèle souris ne sont pas transposables au modèle ruminant pour cette maladie.

18673 Le projet vise à étudier le rôle de la protéine Klotho dans le système nerveux central des primates et son potentiel thérapeutique pour le traitement des pathologies associées au vieillissement et à la neurodégénérescence chez l'homme. En effet, les niveaux de Klotho diminuent avec l'âge, mais aussi dans des pathologies telles que la maladie d'Alzheimer. Ces données suggèrent qu'il pourrait être très utile de prévenir des maladies telles que la démence, et de promouvoir un vieillissement meilleur et plus sain. Après des résultats préliminaires chez les rongeurs qui montrent un vieillissement en meilleure santé et une augmentation de l'espérance de vie des souris, nous souhaitons vérifier si l'augmentation de la production de la protéine Klotho dans le cerveau a des effets similaires chez des microcèbes vieillissants pour confirmer le potentiel thérapeutique en vue d'une utilisation future chez l'homme.

Nous prévoyons de traiter 15 microcèbes âgés de 6 ans. Les animaux seront soumis à plusieurs tests de mémoire et qui nous permettront de quantifier l'évolution de la mémoire au cours du projet et évaluer l'efficacité du traitement au niveau cognitif et cérébral.

Nous appliquerons la règle des 3R de la façon suivante:

Remplacement: l'étude de l'effet du traitement sur la mémoire ne peut être remplacé par d'autres méthodes n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants

Réduire: en se basant sur l'expérience acquise, nous avons limité le nombre d'animaux en réalisant un suivi individuel (avant et après traitement). Chaque animal est son propre contrôle, cela permet de tenir compte la variabilité interindividuelle et ainsi réduire le nombre d'animaux dans les groupes sans compromettre les objectifs du projet

Raffiner: le projet s'appuie sur des méthodologies respectueuses du bien être des animaux mise en oeuvre par du personnel formé et qualifié. Le bien-être des animaux est un facteur clé pour la réussite du projet et des points limites en adéquation avec les besoins expérimentaux ont été déterminés pour éviter toute détresse des animaux.

Une analyse rétrospective sera réalisée.

18674 L'une des étapes indispensables dans l'étude de l'inocuité d'un candidat-médicament consiste en l'analyse de ses effets potentiels sur le système cardiovasculaire. La télémétrie permet de mesurer différents paramètres physiologiques, dont les paramètres cardiovasculaires (ex: pression artérielle, fréquence cardiaque, activité électrique du coeur (ECG)) chez l'animal vigile non contraint en implantant un émetteur de télémétrie sous anesthésie. Cet émetteur permet de mesurer les signaux cardiovasculaires et de les envoyer sous forme d'ondes radios vers un récepteur. Le signal est ensuite analysé de façon informatique après conversion.

Ce projet consiste à évaluer les effets de candidats-médicaments sur les paramètres cardiovasculaires chez la souris vigile en utilisant la télémétrie.

Pour ce projet, il est prévu un nombre maximum de 600 animaux sur 5 ans.

La conception de ce projet prend en compte la règle des 3 R: remplacement, réduction et raffinement

- Remplacement : Dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez la souris car il n'existe pas de méthode de substitution (in vitro ou in silico) pour évaluer les effets d'une nouvelle molécule sur la fonction cardiovasculaire. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité, la toxicité et la pharmacocinétique d'un candidat médicament. A ce jour, la souris est une des espèces rongeurs recommandées pour ce type de modèle d'étude.

- Réduction : Un nombre minimal et homogène d'animaux par groupe est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique. Et généralement, lors d'études de télémétrie, les animaux reçoivent tous les traitements (il n'y a pas un groupe d'animaux par traitement), ce qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés.

- Raffinement : dans ce projet, le raffinement est obtenu par :

- des animaux libres de tous mouvements pendant les phases d'enregistrement
- un protocole analgésique adapté pour la chirurgie et la période post-opératoire et un suivi post-opératoire de l'état de santé des animaux avec des soins et un enrichissement adaptés afin de permettre une bonne récupération des animaux
- la validation du système de télémétrie et la validation pharmacologique du modèle
- le suivi d'éventuels signes cliniques
- la détermination des points limites
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

18675 Les produits laitiers issus de lait de vache ou de chèvre contiennent de nombreux composants dont l'effet bénéfique sur la santé n'est pas encore bien établi. La caractérisation de ces effets permettrait de proposer des produits alimentaires plus sains. L'objectif de ce projet est d'évaluer chez la souris l'index glycémique de 5 produits laitiers d'une part et les effets sur le microbiote intestinal, le poids corporel et la prise alimentaire de la consommation de ces différents produits laitiers pendant 21 jours d'autre part. Quarante-quatre souris C57Bl/6N âgées de 4 semaines seront élevées en cages individuelles et recevront un aliment adapté aux besoins de croissance des animaux tout au long de l'expérimentation. A l'âge de 6 semaines, les souris commenceront à recevoir, tous les jours et pendant 21 jours, un des 5 produits laitiers ou de l'eau. Pendant ces 21 jours, la consommation en aliment des souris et leur poids corporel seront mesurés régulièrement. Un test d'index glycémique sera réalisé par mesure des concentrations en glucose et insuline dans le sang dans les 2h qui suivent l'ingestion d'un des 5 produits laitiers au milieu de cette période de 21 jours. A l'issue de cette période, les souris seront euthanasiées pour prélever des tissus.

Ce projet suit la règle des 3R. Remplacement: le recours à l'expérimentation animale est justifié par l'impossibilité de modéliser in vitro ou in silico les liens entre les différents paramètres mesurés. Réduction: l'utilisation du modèle souris permet de bénéficier des nombreuses données et méthodologies existantes sur ce modèle. Le nombre d'animaux prévu a été calculé en fonction de la variabilité des paramètres mesurés et permettra d'effectuer des tests statistiques pour mettre en évidence ou non des différences significatives induites par les traitements. Raffinement: l'anxiété liée à l'isolement en cages individuelles des souris sera minimisée par un enrichissement du milieu. Les procédures nécessitant une contention ou un gavage seront précédées d'une habituation des animaux à ces gestes. Un anesthésique local sera utilisé pour minimiser la douleur.

18676 Les dispositifs médicaux implantables sont de petits appareils dont on équipe certains patients atteints de maladies diverses. Ils permettent par exemple de prévenir des problèmes

cardiovasculaires, de surveiller et de réduire les complications chez les diabétiques, ou encore de ralentir la progression de la maladie de Parkinson. En effet, chez des rats parkinsoniens un tel dispositif a permis un ralentissement de la dégénérescence neuronale.

Cependant, l'utilisation des implants médicaux chez les patients pose des problèmes à court et à long terme (réaction de rejet) conduisant à une diminution de la durée de vie et de la sensibilité des implants.

Ce projet vise à évaluer les réactions de l'organisme-hôte et leurs traitements après implantation de dispositifs médicaux.

Pour pouvoir suivre dans un organisme les réactions cellulaires autour d'un implant, un modèle de souris transgéniques saines est utilisé. 120 animaux seront nécessaires pour la réalisation de ce projet qui comprend l'étude de deux dispositifs médicaux utilisant deux technologies différentes rendant le dispositif plus bio-compatible.

Les résultats obtenus seront analysés en utilisant la technologie d'imagerie de la microscopie intra-vitale : en effet, les souris implantées seront imagées sous anesthésie générale durant quelques séances réparties sur plusieurs semaines.

RÉDUCTION

Pour réduire le nombre d'animaux, nous utilisons une fenêtre dorsale qui permet de suivre les processus d'inflammation dans le temps chez une même souris.

RAFFINEMENT :

Le projet est mis en œuvre dans un établissement utilisateur agréé. Tous les personnels impliqués ont des compétences validées pour les manipulations des animaux. La fenêtre dorsale a été réduite en taille et en poids pour être mieux acceptée par la souris. Les dispositifs médicaux sont dimensionnés pour cette espèce animale. Les animaux seront hébergés dans un environnement enrichi et contrôlé (cage connectées) et observés régulièrement afin d'anticiper l'apparition des points-limites fixés. La fréquence de surveillance des animaux sera adaptée à la cinétique expérimentale, impliquant si nécessaire l'arrêt des expérimentations. Les différents gestes sont réalisés sous anesthésie générale pendant lesquelles un gel oculaire sera appliqué pour le confort de l'animal. Un traitement antalgique est prévu tant que nécessaire et possible.

REMPACEMENT : Aucun modèle in vitro ne permet d'atteindre les objectifs fixés. Pour atteindre les objectifs, la souris est un modèle approprié et bien validé. Les souris, très petits mammifères, ont une taille très adaptée pour les études en microscopie intra-vitale avec un positionnement sous l'objectif d'un microscope facilité.

18677 Les spondyloarthrites sont des rhumatismes inflammatoires fréquents (0,3% de la population française) touchant les articulations, les tendons mais aussi d'autres organes (inflammation des yeux, de la peau et du tube digestif). La fréquence des infarctus du myocarde et insuffisance cardiaque est augmentée dans cette maladie entraînant une surmortalité. Les raisons du déclenchement de cette maladie sont à ce jour mal comprises. Il y a parfois l'association d'une susceptibilité génétique et d'un environnement déclencheur comme une infection (exemple Chlamydia). Une prise en charge globale des patients pour dépister les maladies associées notamment cardio-vasculaire est actuellement admise en rhumatologie. Néanmoins les mécanismes aboutissant à l'augmentation du risque cardiovasculaire dans ce rhumatisme est encore imparfaitement connu.

Pour mieux comprendre le rôle de l'environnement (bactéries pathogènes ou non) dans les spondyloarthrites, nous disposons de souris qui peuvent développer plusieurs formes de spondyloarthrites en fonction de l'agent déclenchant l'arthrite utilisé : infection avec une Chlamydia spécifique des souris pour l'arthrite réactionnelle et injection de sucres dérivés de levure comme le curdlane pour la spondylarthrite ankylosante. La grande force de ce modèle est de reproduire assez fidèlement les inflammations articulaires mais aussi les manifestations associées (inflammation digestive et cutanée) correspondantes chez l'homme. La description d'une éventuelle atteinte cardio-vasculaire n'a jamais été publiée à notre connaissance dans ce modèle.

L'objectif de cette étude est d'appliquer des technologies d'imagerie du petit animal pour mieux caractériser le développement des spondyloarthrites et des manifestations associées dans nos modèles souris d'arthrite réactionnelle et de spondylarthrite ankylosante. Nous souhaitons démontrer que ces souris prédisposées à l'arthrite seraient un modèle intéressant pour mieux comprendre les atteintes cardio-vasculaires observés chez l'homme. Nous avons des recherches dans un autre établissement utilisateur qui étudient le rôle des bactéries de la flore intestinale (microbiote) et des molécules que ces bactéries produisent sur le développement des spondyloarthrites, ainsi que l'impact de traitements possible de la maladie. Ces études comportent des séances d'imagerie que nous voulons substituer par d'autres techniques dont les appareils sont dans l'établissement utilisateur d'animaux de laboratoire à l'origine de cette demande : nous voulons évaluer par tomographie à rayons X en 3 dimension (scanner) les dommages osseux, utiliser des marqueurs d'imagerie nucléaire pour mieux évaluer des atteintes articulaires et enfin réaliser des échographies pour mesurer la fonction cardiaque. Concrètement, pour nos souris, l'apparition de la maladie sera évaluée cliniquement au niveau des articulations et des autres organes atteints, par de l'imagerie, et par histologie après la fin des expériences.

Ce projet s'inscrit dans la règle des 3R : Remplacer : Le développement de cette pathologie est complexe et donc son étude nécessite l'intervention d'un système immunitaire et cardio-vasculaire complet et d'articulations fonctionnelles afin de pouvoir évaluer la réponse aux traitements dans cette maladie. Des études in vitro ne sont donc pas envisageables.

Réduire : Le projet nécessitera jusqu'à 200 souris sur une période de 5 ans. 10 individus par groupe sont nécessaires pour détecter une différence statistique du score clinique. Nous commencerons avec des effectifs inférieurs lors des phases exploratoires et ne poursuivrons pas les imageries qui ne donneront pas de résultats exploitables. Une partie de ces animaux est déjà comptabilisée dans nos recherches dans un autre établissement, mais une autre sera propre à ce projet car l'imagerie nucléaire impose, chez les animaux de laboratoire, des mesures de confinement plus strict que ce qui est pratiqué en clinique humaine.

Raffiner : Une surveillance quotidienne des souris sera réalisée avec calcul d'un index de score clinique. Au-delà d'un score prédéfini les souris seront retirées de l'étude et mises à mort. La durée maximale des expérimentations est limitée à 10 semaines ce qui permet aux souris de développer une spondyloarthrite sans atteindre un stade avancé de la maladie. Les imageries se font sous anesthésie générale. Pour les animaux qui sont inclus dans un autre projet, les techniques d'imagerie du présent projet n'induiront aucune douleur ou souffrance supplémentaire, juste le stress d'un très court trajet entre les deux animaleries dont nous tiendrons compte par une période d'acclimatation.

18678 La maladie de Parkinson (MP) est caractérisée par une dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques situés dans la substance noire pars compacta (SNc). La maladie est classiquement associée à des symptômes moteurs, mais il est de plus en plus reconnu que les symptômes non moteurs, y compris la douleur, sont très courants. La douleur, présente chez jusqu'à 85% des patients atteints de MP, est un symptôme très courant et gênant, mais mal compris. Il existe plusieurs types de douleur affectant les patients atteints de MP: douleurs musculo-squelettiques (~ 58,5%), neuropathiques radiculaires (~ 38%), neuropathiques centrales (~ 8,5 - 27%) et douleurs induites par des mouvements anormaux (dystonie, dyskinésie) , ~ 33,5%). De plus, la sensibilité à la douleur est perturbée chez les patients atteints de MP, présentant ou non des symptômes de douleur. La littérature scientifique reste cependant contradictoire concernant cette altération.

Les douleurs neuropathiques centrales dans la MP sont souvent décrites par les patients comme des sensations douloureuses bizarres et inexplicables telles que des sensations de brûlure douloureuse, de coup de couteau, de démangeaison ou de picotement sans origine apparente, principalement du côté le plus affecté. Elle est associée négativement à la qualité de vie dans la MP, avec un impact plus important que la déficience motrice. Cela en fait donc une préoccupation importante dans la prise en charge de la maladie.

Il a été montré que la stimulation profonde à haute fréquence du noyau subthalamique (NST, structure appartenant aux ganglions de la base) améliore les douleurs neuropathiques centrales. Cela suggère que ces douleurs, sur lesquelles portent ce projet, pourraient être dues à un dysfonctionnement des réseaux cérébraux impliqués dans la MP, permettant de percevoir et d'analyser l'information douloureuse mais ces réseaux n'ont encore jamais été étudiés dans ce contexte.

Bien qu'une mauvaise interprétation de la douleur ait déjà été rapportée dans certaines structures corticales impliquées dans la douleur, il n'existe à ce jour aucun mécanisme physiopathologique clair pour expliquer ces symptômes spécifiques. De plus, la raison pour laquelle la stimulation profonde du NST aide à les soulager reste incertaine. Les données préliminaires de nos collaborateurs suggèrent que le NST et le réseau nociceptif auquel cette structure est liée sont dysfonctionnels, ce qui pourrait contribuer à certains symptômes de douleur neuropathique centrale. Ce projet a ainsi pour but d'évaluer l'implication de ce réseau nociceptif dans les symptômes de la douleur neuropathique centrale dans la MP ainsi que d'élucider l'effet de la stimulation profonde du NST sur ce réseau.

Pour répondre à notre problématique, le projet utilise une approche préclinique impliquant un modèle rongeur de la MP et sera composé de plusieurs procédures expérimentales combinant de l'enregistrement électrophysiologique (enregistrement de l'activité des neurones in vivo), de la stimulation à haute fréquence (technique de modulation de l'activité cérébrale par l'envoi d'impulsions électriques) ainsi que de l'optogénétique (modulation de l'activité cérébrale par la lumière). Nous nous attendons à ce que ces approches techniques complémentaires abordent une lacune critique dans les connaissances existantes sur les mécanismes sous-jacents de la douleur en tant que l'un des symptômes non moteurs les plus gênants de la MP et nous permettent de déterminer si l'action de la stimulation profonde du NST est due à son action propre ou bien à l'ensemble de son réseau.

Dans ce projet, 52 rats seront nécessaires à la bonne réalisation des expérimentations sur une durée de 5 ans.

Ce projet est conçu pour respecter au mieux la règle des 3R:

Réduction: Le nombre d'animaux a été déterminé de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité des expériences menées. Les expériences sont également planifiées de telle sorte que chaque animal peut-être son propre contrôle afin de réduire le nombre d'animaux nécessaire.

Remplacement: ce projet a pour but d'étudier l'état fonctionnel d'un réseau cérébral, il est, à l'heure d'aujourd'hui, impossible de remplacer notre modèle in vivo.

Raffinement: Tous les animaux seront hébergés par 2 dans leur cage à l'animalerie, avec accès ad libitum à l'eau et la nourriture. De plus, les cages sont enrichies grâce à la présence d'objets divers et variés (changés régulièrement afin de diversifier au maximum l'environnement des animaux). La gestion de la douleur pendant et après les procédures douloureuses et les expérimentations est toujours prise en compte par des personnels compétents et sera améliorée si besoin par injection d'analgésiques spécifiques. L'état de santé général de tous les animaux de l'étude est suivi quotidiennement, ce qui nous permet de réagir immédiatement et de manière appropriée en cas de besoin. De plus, les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale.

18679 Le processus de réparation spontané et naturel du tissu osseux n'est pas assuré lors de défauts osseux consécutifs aux pseudarthroses (non consolidation de fracture), fractures complexes, reprises de prothèses et résections de tumeurs. Dans ces situations, l'autogreffe osseuse est le traitement de référence mais présente des inconvénients, notamment de morbidité liée au site de prélèvement et de faible disponibilité et/ou qualité de l'os prélevé. Pour pallier à ces limitations, la greffe de substituts osseux d'origine naturelle ou synthétique est en plein essor. Avec 1,5 million de procédures chirurgicales nécessitant une greffe en Europe en 2010 et une croissance de 12% par an, la problématique de la reconstruction osseuse est un véritable enjeu de Santé Publique. Ces

substituts osseux doivent permettre de combler le défaut, permettre l'invasion cellulaire et vasculaire ou encore stimuler la réparation osseuse.

Ce projet se propose de développer une alternative aux autogreffes osseuses pour la prise en charge chirurgicale des grandes pertes de substance osseuse grâce à une nouvelle génération de substituts osseux à base de céramique de phosphate de calcium, composé minéral équivalent à celui de la matrice osseuse. L'objectif de cette étude est d'évaluer *in vivo* le potentiel ostéoformateur de quatre substituts osseux conçus par la société pharmaceutique SEPTODONT. Le modèle animal choisi est un modèle de défaut osseux de taille critique (ne pouvant pas réparer spontanément) de 6 mm de diamètre au niveau de la calvaria chez le rat. Cette étude doit permettre une évaluation de l'efficacité thérapeutique des formulations proposées par la société SEPTODONT afin de déterminer la formulation optimale pour une utilisation chez l'Homme et, à terme, la mise en place d'un essai clinique.

Cette étude comprend 6 groupes expérimentaux de 10 rats chacun: un groupe pour chacun des quatre substituts osseux conçus par SEPTODONT (respectivement nommés SO1, SO2, SO3 et SO4) ; un groupe contrôle négatif (défaut osseux laissé vide) ; et un groupe contrôle positif (défaut osseux comblé avec de l'os bovin déprotéinisé). Tous les groupes sont doublés pour une analyse histologique à deux temps (15 et 60 jours après implantation, pour une analyse précoce et une analyse tardive, respectivement), pour un total de 120 rats de type Wistar.

REPLACEMENT : Compte tenu de la complexité du processus de réparation osseuse faisant intervenir plusieurs systèmes (vasculaire, nerveux, etc. .), il est difficile d'étudier la réponse tissulaire et le potentiel ostéoformateur d'un substitut osseux par un modèle "in vitro" ou "in silico", d'où la nécessité d'une étude chez l'animal.

REDUCTION : Afin de réduire le nombre d'animaux il sera réalisé, (i) un minimum d'échantillons (10 par groupe) qui permet, compte tenu des écarts constatés pour les différents paramètres de la réparation osseuse étudiés, d'avoir une analyse statistique significative, (ii) un suivi longitudinal de la formation osseuse sur le même animal à l'aide d'un CT-scan *in vivo* et (iii) une réduction des temps d'analyse à deux temps (J15 et J60).

RAFFINEMENT : Une période d'acclimatation d'une semaine avant l'entrée dans le protocole est accordée aux animaux. De plus, une analgésie sera effectuée en pré- et post-opératoire, associée à une observation régulière de l'animal jusqu'à la fin de l'expérimentation (15 et 60 jours après implantation). Des points critiques précis seront surveillés permettant d'objectiver la douleur ou la gêne éventuellement ressentie par l'animal (grille scorée). Au cas où des douleurs ou souffrances persistent en dépit des traitements entrepris, la décision de mise à mort sera prise selon des critères préétablis. Afin de favoriser l'environnement social, les animaux seront hébergés par groupe de 3 dans les conditions standards d'hébergement : eau et nourriture *ad libitum* ; température entre 20 et 22°C avec un cycle jour/nuit de 12h/12h. Chaque cage sera identifiée, et les rats resteront dans la même cage du début à la fin du protocole. Enfin, un environnement enrichi et adapté sera fourni, contribuant entre autre à l'usure des dents et au foussement des animaux.

Les résultats de cette étude contribueront à plus long terme à la mise au point de traitements des grandes pertes de substance osseuse chez l'Homme.

18680 L'élimination de certains organismes étrangers ou des tumeurs repose sur les interactions coordonnées de sous-types de globules blancs (lymphocytes, macrophages, cellules dendritiques) au sein des organes du système immunitaire de l'hôte comme la rate ou les ganglions lymphatiques. Alors que l'activation des lymphocytes par les cellules dendritiques est bien documentée, les fonctions des macrophages de la rate restent inconnues, du fait de la difficulté technique de les isoler.

Notre hypothèse de travail est que certains macrophages de la rate sont capables d'activer des lymphocytes spécifiques d'organismes étrangers et ainsi conférer une immunité protectrice. Nous avons développé une stratégie pour extraire les sous-types de macrophages de la rate de souris. Nous avons pu vérifier *in vitro* notre hypothèse et montré que ces macrophages sont au moins aussi efficaces que les cellules dendritiques. La relevance de ces observations doit cependant être testée

dans un modèle physiologique in vivo, tenant compte de l'organisation anatomique et cellulaire de la rate, bien plus complexe qu'un modèle cellulaire.

Nos objectifs principaux sont de 1) montrer le rôle direct et protecteur de ce sous-type de macrophages dans un modèle de mélanome métastatique ; 2) d'en comprendre les mécanismes.

Le recours au modèle animal se justifie car aucun outil ne permet de tester cette hypothèse chez l'homme ; un simple modèle cellulaire est insuffisant pour récapituler toutes les étapes de la tumorigénèse ; des modèles tumoraux pertinents et bien caractérisés existent chez la souris dont la rate présente de nombreuses similitudes avec l'homme.

Le projet regroupe 12 procédures qui comportent l'utilisation de souris transgéniques déjà existantes, des injections de cellules (lymphocytes, macrophages, cellules dendritiques, mélanome) par voie intraveineuse, des administrations de substances pour moduler les réponses immunitaires par voie intraveineuse ou intrapéritonéale, une irradiation de certains animaux, une observation du comportement des macrophages en temps réel dans la rate sur quelques heures par microscopie après volet chirurgical abdominal de petite taille, en l'absence de méthodes substitutives existantes.

Ce projet d'une durée de 5 ans a été conçu en respectant la règle des 3R. Les différentes procédures expérimentales ont été élaborées pour prévenir et réduire au maximum la souffrance animale (anesthésie, analgésie, enrichissement du milieu de vie). L'état général, la perte de poids, l'apparence et le comportement de l'animal seront suivis régulièrement après les traitements ou pendant la procédure de chirurgie pour définir des points limites pouvant justifier l'arrêt prématuré de la procédure. A la fin programmée des procédures ou lors de l'atteinte de certaines points limites, les animaux seront mis à mort selon les méthodes autorisées dans l'annexe IV de l'arrêté relatif à l'agrément des établissements du 01/02/2013.

Le nombre total minimal d'animaux nécessaires pour répondre aux objectifs (n= 3 259) avec une puissance suffisante repose sur un calcul statistique, tenant compte des données scientifiques publiées ou obtenues par nos études in vitro, du type et du nombre simultané de données collectées et de l'expérience des expérimentateurs.

Ce projet permettra d'obtenir un rationnel pour développer des traitements basés sur l'utilisation ou la modulation des fonctions des sous-types de macrophages de la rate, notamment pour améliorer la survie ou la qualité de vie des patients atteints de tumeurs métastatiques.

18681 La sclérodémie systémique (SSc) est une maladie fibrosante et auto-immune rare (12 000 cas en France), parfois mortelle et très invalidante pour laquelle il n'existe pas de traitement curatif actuellement. Les causes de la SSc sont inconnues mais l'inhalation de poussière de pierre appelée silice cristalline, notamment rencontrée en milieu professionnel (tailleur de pierre, BTP), est un facteur de risque reconnu de développer cette pathologie et/ou d'aggraver sa sévérité. Le poumon pourrait constituer le point de départ de maladies auto-immunes systémiques, c'est à dire des pathologies où le système immunitaire s'attaque à l'individu qu'il est supposé protéger. Toutefois les mécanismes impliqués restent à préciser.

Afin de mieux étudier les mécanismes à l'origine de la SSc, des modèles murins ont été développés. Ainsi, un modèle de souris sclérodermiques induit par une injection sous-cutanée de bléomycine ou d'acide hypochloreux (HOCl), reproduit à la fois les caractéristiques fibrosantes c'est à dire le durcissement de la peau ou du poumon liée à une accumulation de collagène, et auto-immunes (production d'auto-anticorps) de la pathologie après 3 ou 6 semaines d'exposition minimum respectivement.

Le projet a pour objectifs de caractériser les effets pulmonaires, cutanés et sur le système immunitaire d'une exposition à la silice cristalline dans le modèle de souris sclérodermiques précédemment décrit et, d'étudier le rôle de certaines cellules de l'immunité, les macrophages, dans les effets inflammatoires, fibrosants et auto-immuns. Nous étudierons en particulier la capacité des macrophages à phagocyter des cellules apoptotiques (ou efferocytose) car cette fonction participe à la résolution de l'inflammation mais aussi à la tolérance immunitaire. Sur la base de travaux personnels, nous émettons l'hypothèse qu'un défaut d'efferocytose induit par une exposition à la silice cristalline pourrait aggraver et/ou chroniciser le phénotype sclérodermique. Par ailleurs, nous

évaluerons les effets de molécules susceptibles d'augmenter l'efferocytose et donc de limiter la sévérité du phénotype sclérodermique (fibrose et auto-immunité).

Le nombre de souris nécessaires à la réalisation de l'étude est évalué au nombre de 460, nous avons pensé ce protocole en suivant la règle des 3 R « Remplacer, Réduire, Raffiner » :

-Nous avons réduit le nombre de souris à celui requis pour obtenir une validation statistique des résultats et nous avons envisagé plusieurs mesures sur les échantillons prélevés au niveau des organes touchés (poumons, peau, sang). Toujours dans l'objectif de limiter le nombre d'animaux, les effets de médicaments améliorant ce "nettoyage des déchets de cellules" seront testés sur deux lots de souris mais au cours d'une même expérience ce qui permettra d'avoir le même lot de souris sans médicament.

-Il faut noter qu'il n'existe aucun moyen de remplacer de telles études qui englobent l'ensemble de l'organisme et que seule, l'expérimentation animale permet un suivi complet du développement de la maladie et permet d'étudier la réponse à des médicaments d'intérêt.

-En terme de raffinement, la procédure a été travaillée pour limiter le stress des animaux (traitement dans une salle de contention dédiée) et pour empêcher la douleur par l'administration de sédatif et d'antidouleur adaptés aux comportements de l'animal. Par ailleurs, les souris seront quotidiennement observées (apparence physique, signes physiologiques et comportementaux) et pesées 2 fois/semaine afin d'évaluer le degré de sévérité de la douleur des procédures appliquées aux animaux, que nous prévoyons faible à modérée.

Au total, ce travail permettra d'une part de préciser les mécanismes responsables de l'autoimmunité dans la sclérodermie systémique et l'impact de la silice cristalline sur l'évolution et sévérité de cette pathologie systémique chez la souris et d'autre part de tester l'effet de médicaments pour cette pathologie rare mais mortelle chez l'homme.

18682 Les reins assurent l'élimination des déchets de l'organisme en assurant la filtration du sang. Ils peuvent être affectés par de nombreuses maladies très différentes mais qui entraînent généralement une perte de filtration rénale, conduisant à l'apparition de protéines dans les urines (protéinurie) normalement absentes en cas de bon fonctionnement de l'organe. Dans les cas extrêmes, cette protéinurie peut aggraver les lésions rénales et aboutir à la destruction de l'ensemble du rein.

Les mécanismes d'apparition de la protéinurie sont nombreux et encore imparfaitement connus. Une protéine a été identifiée, la vasorine, dont l'absence entrainerait une protéinurie massive et des lésions rénales. Afin de mieux comprendre le rôle de cette protéine dans le fonctionnement du rein, nous utiliserons différentes lignées de souris mutantes.

Un premier modèle dans lequel on empêchera l'expression de la vasorine par injection de tamoxifène sera élaboré, afin de visualiser l'impact d'un manque de vasorine sur l'organisme. A partir de ce modèle d'étude, la relation entre l'effet de la vasorine et la voie du TGF β (rare ligand décrit de la vasorine, capable de l'inhiber) sera étudiée. Les souris adultes seront sacrifiées à différents temps après délétion de la vasorine. L'urine des animaux sera collectée une fois par semaine afin d'évaluer la fonction rénale de manière non invasive. De même, leur tension sera prise de façon hebdomadaire, et le sang sera prélevé lors du sacrifice des animaux ce qui permettra de doser plusieurs paramètres biologiques reflétant également la fonction rénale.

Un second modèle sera étudié, dans lequel la vasorine ne sera absente que dans certaines cellules rénales appelées podocytes, qui sont des éléments clés de la filtration du sang. Ces souris seront sacrifiées à différents âges après naissance, allant de 4 jours à 22 jours, pour établir une chronologie des lésions attendues. Des variants de cette lignée, n'ayant ni la vasorine ni le TGF β 1, seront également étudiés pour voir s'il y a une corrélation entre la voie du TGF β 1 et la vasorine dans le phénotype rénal.

Cette lignée de souris servira également à apprécier le rôle de la vasorine dans des modèles de néphropathies. Les souris hétérozygotes, n'étant pas totalement dépourvues de vasorine, seront ainsi intégrées à plusieurs protocoles d'induction de pathologies. Elles seront rendues hypertendues, malades au niveau des reins de manière chronique par administration d'un produit

chimique, ou recevront par injection un sérum détruisant les reins pour mimer les pathologies humaines.

L'urine et la pression artérielle de ces souris seront prises régulièrement, jusqu'au sacrifice des animaux, lors duquel le sang sera prélevé. Les actes chirurgicaux nécessaires à l'implantation d'une mini-pompe osmotique pour établir le modèle d'hypertension seront réalisés sous anesthésie générale.

Nous effectuerons également des échographies vasculaires, qui permettent d'obtenir de manière non invasive, sans souffrance, de nombreuses informations en cinétique sur les animaux sans avoir à les sacrifier.

Enfin, des souris rapportrices dont le profil d'expression de la vasorine sera visible par fluorescence seront aussi utilisées dans les modèles de néphropathie suscités afin d'y visualiser les éventuelles variations d'expression de la vasorine, car nous ne disposons pas d'anticorps fiable permettant sa détection. La fonction rénale de ces souris sera évaluée de la même façon.

L'insuffisance rénale est une maladie complexe et seule l'expérimentation animale, résumant l'ensemble des interactions cellulaires au sein du rein, dans un organisme vivant, permettra d'étudier les mécanismes impliqués dans la protéinurie et la destruction rénale. La souris est un modèle de choix car son architecture et sa physiologie rénale sont proches de celles de l'homme. Nous tirerons parti de la transgénèse, c'est à dire le fait de pouvoir modifier les gènes des souris, pour confirmer l'importance de la vasorine dans l'organisme. Les cibles identifiées grâce aux modèles murins seront étudiées dans des cultures cellulaires en parallèle afin d'affiner nos résultats et de limiter le nombre d'animaux utilisés.

Ce projet s'inscrit sur une durée de 5 ans et un nombre maximal de 910 souris sera utilisé dans ce projet. Afin de prévenir toutes formes de souffrance et d'angoisse, ce projet sera mené dans le respect des 3R:

Remplacer : L'utilisation d'un modèle animal est une nécessité car il n'y a pas de méthode alternative pour l'étude de l'importance de la Vasorine sur le rein et sur l'organisme de façon générale

Réduction : Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est le minimum nécessaire permettant une analyse statistique robuste des résultats grâce aux données collectées au cours d'expériences précédentes.

Raffinement : Pour éviter toute souffrance, les procédures de chirurgie se feront sous analgésie et anesthésie générale. Les souris seront observées régulièrement et une grille précise d'évaluation des points limites sera utilisée. Tout signe de douleur, souffrance, angoisse ou stress chez les animaux sera soulagé avec des analgésiques.

L'environnement des animaux sera enrichi par du coton de nidation, des bâtonnets à ronger. A terme, les résultats de ce projet permettront de comprendre plus précisément le rôle de la vasorine dans le fonctionnement rénal. Ils pourraient permettre l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et aboutir à une meilleure prise en charge des patients atteints de maladies du rein.

18683 Les reins assurent l'homéostasie de l'organisme, en épurant le sang de ses déchets et en régulant le niveau d'eau et d'électrolytes du corps. Ils peuvent être fréquemment affectés par différentes maladies aboutissant à une fuite massive de protéines du sang dans les urines (protéinurie), et à une dysfonction chronique de l'organe (insuffisance rénale chronique) mettant en jeu le pronostic vital en l'absence de traitement. La protéinurie elle-même entraîne des complications majeures telles qu'une rétention d'eau, des thromboses veineuses, ou encore un déficit immunitaire. La protéinurie peut aussi elle-même aggraver l'insuffisance rénale. Les mécanismes d'apparition de cette protéinurie sont encore imparfaitement connus. La protéine vasorine semble liée à la perte de la fonction rénale, car son absence totale entraîne une protéinurie massive, une insuffisance rénale rapide, et une destruction des cellules indispensables au fonctionnement du rein: les podocytes. En revanche, une perte partielle de la vasorine n'entraîne pas de pathologie chez la souris. Dans ce contexte, nous souhaitons déterminer si la déficience partielle en vasorine peut entraîner une susceptibilité accrue à certaines maladies rénales fréquentes associées à une déplétion

podocytaire, comme la néphropathie hypertensive, la hyalinose segmentaire et focale (HSF), ou le diabète.

Seule l'expérimentation animale permet actuellement d'étudier les mécanismes physiopathologiques des maladies rénales, en reproduisant fidèlement l'ensemble des interactions cellulaires existant au sein du rein dans un organisme vivant.

La souris est un modèle de choix car son architecture et sa physiologie rénales sont proches de celles connues chez l'homme. Nous tirerons parti de la transgénèse, en étudiant deux lignées de souris mutantes pour cette protéine: une lignée qui n'exprime que partiellement la Vasorine dans les podocytes (PodoCre-Vasn), et une lignée exprimant la protéine rapportrice fluorescente Venus, dont la modulation d'expression reflète la modulation de la Vasorine.

Nous utiliserons deux modèles murins d'HSF, l'un grâce à l'implantation en sous-cutané d'une pastille DOCA-salt (deoxycorticostérone acetate) couplée à une uni-néphrectomie, et l'autre grâce à l'injection de la molécule doxorubicine. Ce dernier modèle ne sera cependant effectué que sur des souris différentes des mutantes citées précédemment, car ces dernières sont connues pour y être résistantes. De plus, nous souhaitons effectuer un modèle de diabète, entraînant également un stress pour les podocytes et des lésions du rein, grâce à l'injection de la molécule streptozotocine.

Durant ces expériences, la fonction rénale sera suivie grâce à des collectes d'urines régulières jusqu'au sacrifice des animaux, lors duquel le sang sera prélevé. De plus, nous prendrons la pression artérielle à la queue de nos animaux, pour voir l'évolution de l'hypertension attendue. Dans le cas du modèle diabète, nous mesurerons également la glycémie de nos souris, grâce à une goutte de sang prélevée à la queue. Enfin, des échographies vasculaires seront réalisées dans les modèles DOCA et de diabète afin d'affiner nos observations grâce aux données que peut générer cet outil (débit sanguin, taille des compartiments du cœur, etc).

Les actes chirurgicaux nécessaires à l'implantation du DOCA pour établir le modèle d'hypertension seront réalisés sous anesthésie générale. Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum. Afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, les procédures se dérouleront avec une surveillance régulière et des antalgiques sont prévus en cas de nécessité. Enfin, des points-limites ont été établis, permettant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire. L'environnement des animaux sera enrichi par du coton de nidation, des bâtonnets à ronger.

Ce projet s'inscrit sur une durée de 5 ans. Le nombre de souris utilisées sera de maximum 280.

A terme, les résultats de ce projet permettront de comprendre plus précisément le rôle de la vasorine dans différentes conditions pathologiques, en révélant son rôle potentiel dans la résistance à la mise en place des symptômes rénaux. Ils pourraient notamment aboutir au développement de stratégies thérapeutiques axées sur le renforcement ou la restauration de sa fonction chez les patients atteints de maladies rénales chroniques les plus fréquentes.

18684 Un enjeu majeur des neurosciences est de comprendre comment le système nerveux organise des fonctions cognitives qui régissent le comportement des animaux.

À cette fin, nous utilisons la larve de poisson zèbre comme modèle animal, et une approche multidisciplinaire combinant l'imagerie optique de l'activité des circuits neuronaux du cerveau entier à une résolution cellulaire, des tests comportementaux, des méthodes d'analyse des données ainsi que des techniques d'optogénétique pour manipuler l'activité neuronale. Les larves du poisson zèbre et d'*A. Mexicanus* permettent de combiner ces techniques chez un animal intact grâce à leur peau transparente, leur petite taille, leur génome connu et la vaste librairie de lignées mutantes et transgéniques disponibles.

Ce projet nous permettra de mieux comprendre la façon dont l'information circule à travers le système nerveux. Comment les stimuli sensoriels sont-ils détectés, intégrés et transformés aux commandes motrices?

Pour l'ensemble des expérimentations nous prévoyons l'utilisation de 3870 animaux : 2900 larves de poissons zèbre et 970 larves d'*Astyanax mexicanus*.

Ce projet prévu pour cinq ans impliquera 6 chercheurs. Nous prévoyons l'utilisation de 2900 larves, pour le poisson zèbre, âgées de 2 à 9 jours, pour les expériences. Les larves deviennent autonomes à l'âge de 5 jours, capables d'éviter les prédateurs et de chasser des proies pour se nourrir.

Les poissons adultes ne sont utilisés que pour la production d'embryons. Cette population de poissons adultes est composée de 24 lots de mutants (*nacre* et *mecp2*) et de 82 lots de différentes lignées transgéniques exprimant en majorité des outils optogénétiques. Chaque lot (aquarium de 10 litres) est composé d'environ 10 à 20 poissons. La colonie adulte correspond à 1600 poissons.

Les changements environnementaux entraînent souvent des changements évolutifs drastiques dans le comportement et les fonctions cérébrales. Si les études de génétique ont permis de mieux comprendre les bases génétiques de l'évolution du comportement, on en connaît beaucoup moins sur l'évolution de la dynamique des circuits neuronaux et les processus cérébraux qui sont à l'origine de ce changement comportemental. Les écosystèmes des grottes offrent la possibilité d'examiner comment le changement environnemental influe sur l'évolution de la morphologie, du développement et du comportement. Le tétra mexicain, *Astyanax mexicanus*, est un modèle de premier plan pour l'étude des mécanismes génétiques qui sous-tendent l'évolution des traits. *A. mexicanus* est constitué d'une population de surface (rivière) et de plusieurs populations de grottes qui ont évolué indépendamment dans ces grottes largement isolées, ce qui permet d'utiliser des approches comparatives pour identifier les variantes génétiques et neurales associées à l'évolution du comportement. Les populations des grottes d'*A. mexicanus* présentent des changements importants dans les systèmes sensoriels, notamment la perte de la vision et l'amélioration de l'odorat, du goût, de la mécanosensation et de la sensibilité de la ligne latérale. Malgré les changements importants de comportement et de morphologie, les changements dans le traitement des informations sensorielles dans le cerveau ont été inexplorés.

Ce projet nous permettra de mieux comprendre la façon dont les processus neuronaux et la connectivité fonctionnelle ont changé pour s'adapter aux changements environnementales au cours de l'évolution.

Ce projet prévu pour cinq ans impliquera 2 chercheurs. Nous prévoyons l'utilisation de 1000 larves d'*A. mexicanus*, âgées de 3 à 9 jours, pour les expériences. Les poissons adultes ne sont utilisés que pour la production d'embryons. Cette population de poissons adultes est composée de 10 lots de différentes lignées transgéniques exprimant en majorité des outils optogénétiques. Chaque lot (aquarium de 40 litres) est composé d'environ 10 à 20 poissons. La colonie adulte correspond à 400 poissons.

Pour diminuer les souffrances subies par les animaux en expérimentation, nous prenons les mesures suivantes pour respecter la règle des 3Rs (remplacer, réduire, raffiner) :

Malheureusement, la complexité fonctionnelle du cerveau ne nous permet pas l'utilisation des modèles *in silico*. De plus, notre projet implique l'analyse des liens existant entre des stimuli sensoriels, l'activité neuronale et le comportement. L'utilisation de modèles *in vitro* ne peut donc pas être envisagée. Ainsi, les larves des poissons zèbre et *Astyanax* sont les seuls modèles vertébrés qui nous permettent de répondre aux questions scientifiques du projet, en utilisant majoritairement des techniques non-invasives qui nous permettent de réduire au maximum le stress ou les souffrances sur les animaux. En effet, nous utilisons des techniques d'imagerie, méthode non invasive, sur des larves intactes de poisson zèbre ou *Astyanax*. En effet, à la fin des expériences les larves sont en très bon état de santé peuvent continuer à se développer jusqu'à devenir adultes.

Afin de réduire le nombre de larves produites, les pontes générant un grand nombre d'embryons, Nous éliminons les œufs surnuméraires immédiatement après fécondation pour n'élever que le nombre minimal d'embryons nécessaires aux expériences. Afin de réduire encore le nombre d'animaux utilisés, quand cela est possible, nous utilisons les embryons d'une même ponte pour plusieurs expériences. De plus, quand cela est également possible, nous utilisons les mêmes expériences, mais analysées d'une manière différente pour répondre aux questions différentes des

projets. De plus, nous manipulons avec extrême précaution les larves, car nos projets (analyse de l'activité cérébrale) demandent le minimum de perturbation possible pour récolter des données fiables.

18685 Les patients hypertendus et diabétiques présentent des lésions des microvaisseaux qui causent la dégénérescence de certains organes comme les yeux ou les reins. L'hypertension artérielle est la plus fréquente des affections cardiovasculaires, touchant environ 20 % de la population adulte. L'hypertension artérielle est d'ailleurs la deuxième cause de mise sous dialyse en Europe, derrière le diabète.

Nous utiliserons différentes lignées de souris génétiquement modifiées pour étudier les mécanismes de survie et de mort des cellules vasculaires rénales au cours de l'hypertension artérielle et du diabète. Nous cherchons ainsi à valider *in vivo* des cibles thérapeutiques préalablement identifiées par des études *in vitro*.

En premier lieu, nous induirons une hypertension artérielle chez les souris et nous analyserons la fonction cardiaque et rénale en réalisant des prélèvements sanguins, urinaires et par échographie. L'hypertension artérielle sera induite par l'implantation sous-cutanée d'une mini-pompe osmotique délivrant de l'angiotensine 2 associée à une régime riche en sel. La pression artérielle sera également mesurée tout au long de la procédure. Après 6 semaines maximum, les souris seront euthanasiées pour prélèvement d'organes afin d'étudier les lésions vasculaires. Nous traiterons également des souris à la streptozotocine afin de les rendre diabétiques et nous analyserons la fonction cardiaque et rénale en réalisant des prélèvements sanguins, urinaires et par échographie. Après 10 semaines de diabète, les souris seront euthanasiées pour prélèvement d'organes afin d'étudier les lésions vasculaires.

Dans certains cas, nous délivrerons aux souris des molécules que nous avons identifiées comme cibles thérapeutiques potentielles, par l'implantation sous-cutanée de mini-pompes osmotiques.

L'hypertension artérielle et le diabète sont des maladies complexes et seule l'expérimentation animale, mimant le plus fidèlement possible le microenvironnement hypertensif, permettra d'étudier les mécanismes impliqués dans les lésions vasculaires rénales. La souris est un modèle de choix car elle développe des complications vasculaires hypertensives et diabétiques proches de celles de l'homme.

De plus, nous tirerons parti de la transgénèse, c'est à dire le fait de pouvoir modifier les gènes des souris, afin d'étudier les cibles identifiées *in vitro*.

Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum. De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'anxiété infligée aux animaux, les procédures se dérouleront avec une surveillance journalière et une grille de souffrance a été établie, permettant d'évaluer finement la souffrance des animaux et de pouvoir délivrer des analgésiques en cas de besoin. Les procédures douloureuses ou stressantes seront réalisées sous anesthésie générale gazeuse en présence d'analgésiques. Enfin, des points-limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

Ce projet s'inscrit sur une durée de 5 ans. Le nombre de souris utilisées sera de maximum 2200.

A terme, les résultats de ce projet permettront de comprendre plus précisément les mécanismes impliqués dans le développement des lésions microvasculaires au cours du diabète. Ils pourraient permettre le développement de nouveaux médicaments ciblant les voies mises en causes, permettant ainsi de prévenir ou freiner le développement des maladies vasculaires chez les patients hypertendus ou diabétiques.

18686 Le but de la dosimétrie est d'évaluer quantitativement l'énergie déposée dans la matière. La grandeur physique de base de la dosimétrie est la dose absorbée qui exprime la partie de l'énergie transportée par les rayonnements qui est déposée dans la matière dans laquelle ils interagissent et induisent des effets. Elle correspond à l'énergie moyenne cédée par le rayonnement par unité de masse. La dose absorbée est une grandeur fondamentale qui permet de faire une mesure macroscopique pouvant être corrélée aux effets des rayonnements de tout système biologique.

Ainsi la dosimétrie est un aspect essentiel pour le développement et le bon déroulement des projets de recherche utilisant des rayonnements ionisants.

L'objectif de ce projet est d'effectuer une caractérisation dosimétrique des modèles d'irradiation à la patte développés sur nos installations d'irradiation dans les conditions d'exposition de la radiologie interventionnelle, permettant ainsi de mimer les brûlures radiologiques pouvant survenir dans un contexte de surexposition médicale ou accidentelle par exemple.

L'objectif de ce projet sera double car nous souhaitons d'une part connaître avec précision la dose réellement absorbée par l'os lors de l'irradiation et d'autre part quantifier et suivre l'évolution de la dose à l'os au cours du temps. En effet, pour tous les projets de recherche utilisant ces modèles d'irradiation, des analyses sont réalisées à différents temps post-irradiation et nous souhaitons caractériser les modèles dans leurs intégralités.

Pour ce projet, nous projetons d'utiliser 40 souris. Le nombre de souris utilisées dans le cadre de ce projet a été réduit autant que possible tout en permettant d'avoir des résultats statistiquement représentatifs. L'utilisation des animaux est nécessaire pour ce projet afin d'avoir une estimation précise de la dose absorbée par l'os mais l'objectif à long terme est de valider ces protocoles d'irradiation et ainsi ne plus utiliser d'animaux pour les mesures dosimétriques. Les mesures de raffinement mises en place dans le cadre de ce projet prennent en compte les conditions de soins et d'hébergement des animaux sont adaptés aux procédures réalisées afin de limiter le plus possible la souffrance de l'animal (utilisation d'anesthésique pendant les irradiations, surveillance des animaux après irradiation et scoring lésionnel).

18687 La malaria (paludisme) demeure l'une des parasitoses les plus importantes dans le monde, infectant non seulement l'homme (avec plus de 200 millions de cas par an, Rapport OMS 2018) mais aussi d'autres mammifères (primates, souris, chauve-souris), des reptiles et de nombreux oiseaux. La malaria est provoquée par des parasites du genre Plasmodium et est transmise par des moustiques. Pendant longtemps ces moustiques ont été considérés comme des véhicules passifs transmettant le paludisme d'un hôte vertébré à un autre sans affecter ou être affectés par le parasite (des « seringues volantes »). Pourtant, l'interaction entre le moustique et le parasite est souvent bien plus complexe.

L'immunologie, la physiologie et le comportement des moustiques modifient le développement de Plasmodium et sa probabilité de transmission. Réciproquement, Plasmodium peut modifier de manière importante les traits d'histoire de vie (fécondité, survie, comportement de nourrissage) des moustiques afin de maximiser sa transmission. Pour mieux comprendre la transmission du paludisme (et espérer le contrôler un jour) il est donc nécessaire d'étudier l'interaction entre Plasmodium et ses vecteurs moustiques.

La possibilité de travailler à la fois sur le terrain et en laboratoire fait du paludisme aviaire (des oiseaux) un modèle idéal pour étudier l'écologie, l'évolution et l'épidémiologie des maladies transmises par les vecteurs. La grande diversité génétique (nombre d'espèces) du paludisme aviaire offre de nombreuses possibilités d'explorer les pressions sélectives sous lesquelles les hôtes et les parasites évoluent. Une des priorités de notre projet est de comprendre comment la diversité génétique sur le terrain se traduit en diversité phénotypique (différences observées) chez les oiseaux et les moustiques vecteurs infectés (virulence, dynamique intra-hôte, capacité de compétition dans les co-infections). Les infections expérimentales en laboratoire constituent un outil supplémentaire puissant pour explorer la diversité phénotypique dans des conditions contrôlées. Cela nous permettra de répondre à des questions pertinentes sur le plan épidémiologique et évolutif, comme par exemple pourquoi certaines lignées sont plus omniprésentes (en termes de gamme d'hôtes, de prévalence et/ou de distribution géographique) que d'autres, et qu'est-ce qui empêche la propagation de certaines lignées dans de nouvelles régions géographiques ?

Pour ce projet nous utiliserons 730 canaris domestiques (*Serinus canaria*) sur 5 ans. Le nombre des canaris utilisés est réduit au maximum tout en ayant une puissance statistique suffisante. Les méthodes utilisées sont raffinées au maximum afin de maximiser le bien-être des canaris. Malheureusement il n'existe de modèle expérimental alternatif qui permet de s'affranchir du canari.

18688 L'une des étapes indispensables dans l'étude de l'inocuité d'un candidat-médicament consiste en l'analyse de son effet potentiel sur le système cardiovasculaire (pression artérielle, fréquence cardiaque, contractilité cardiaque, étude de l'activité électrique du cœur (ECG)). La télémétrie permet de mesurer différents paramètres physiologiques, dont les paramètres cardiovasculaires chez l'animal vigile non contraint en implantant un émetteur de télémétrie sous anesthésie. Cet émetteur permet de mesurer les signaux cardiovasculaires et de les envoyer sous forme d'ondes radio vers un récepteur. Le signal est ensuite analysé de façon informatique après conversion.

Ce projet consiste à évaluer les effets de différents produits sur les paramètres cardio-vasculaires chez le rat vigile en utilisant la télémétrie.

Pour ce projet, il est prévu un nombre maximal de 500 animaux sur 5 ans.

Règle des 3 R: remplacement, réduction et raffinement

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

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

- Raffinement : dans ce projet, le raffinement est obtenu par :

- l'utilisation d'animaux libres de leurs mouvements pendant les enregistrements
- la mise au point de procédures rigoureuses
- la formation du personnel
- un suivi quotidien de l'état de santé des animaux
- la validation du système de télémétrie et validation pharmacologique du modèle
- le suivi des signes cliniques et des points limites
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.
- le suivi post-opératoire de l'état de santé des animaux ainsi que des soins adaptés afin de permettre une bonne récupération des animaux

18689 Une trop forte infestation par les parasites intestinaux peut représenter un danger pour la santé du cheval. L'utilisation de vermifuges chimiques est aujourd'hui la méthode la plus couramment utilisée pour lutter contre ces parasites. Cependant leur faible diversité, et leur utilisation trop automatique a conduit au développement de résistances des parasites intestinaux équins. De plus, l'administration de vermifuges chimiques entraîne une perturbation importante du microbiote intestinal des chevaux. Or celui-ci joue un rôle central dans le maintien d'une bonne santé digestive de cet animal. Il paraît donc essentiel de trouver des alternatives pour réduire les niveaux d'infestations parasitaires tout en maintenant une bonne santé intestinale.

Certaines études évoquent une potentielle activité antiparasitaire du sainfoin, une légumineuse fourragère. En effet, l'alimentation de l'animal pourrait moduler le parasitisme de manière directe ou indirecte en ayant un effet sur l'écosystème intestinal ou l'immunité de l'hôte. Cependant les mécanismes sous-jacents de l'effet antiparasitaire du sainfoin chez le cheval ne sont pas connus et pourrait dépendre de sa ration globale et notamment du ratio fourrage/céréales.

L'objectif de cet essai sera donc d'évaluer l'effet de l'alimentation (ratio céréales/fourrage et ajout de sainfoin) sur le parasitisme dans le gros intestin du cheval et les interactions avec le microbiote et l'immunité.

Les chevaux inclus dans l'étude sont douze hongres Trotteur Français adultes répartis en quatre groupes de trois individus afin de tester quatre rations : riche en fourrages ou riche en céréales avec substitution d'une partie de la ration par du sainfoin ou non. L'étude est composée de quatre

périodes de trois semaines, séparée par trois semaines de repos. Dans le schéma expérimental utilisé, chaque cheval est son propre témoin puisque chaque lot teste les quatre régimes dans un ordre différent. Ce dispositif permet d'utiliser un nombre minimal d'animaux tout en ayant la puissance statistique nécessaire à l'étude. En effet, les chevaux sont conduits en conditions contrôlées et uniformes afin de minimiser les variations liées à l'environnement. Cela permet de répondre au principe de réduction du nombre d'individus utilisés. Il n'existe actuellement pas de modèle permettant de reproduire la complexité des interactions entre parasite, microbiote et immunité chez le cheval. Il n'est donc pas possible de remplacer l'utilisation d'animaux vivants dans cette étude.

Afin de suivre le niveau d'infestation parasitaire des chevaux, un prélèvement de fèces est effectuée le premier jour de chaque période expérimentale et le dernier jour de chaque semaine de ces périodes (J0, J7, J14, J21). Le dernier jour (J21), l'analyse des fèces porte aussi sur l'évaluation des paramètres de l'écosystème microbien fécal. De plus, ce jour-là, un prélèvement sanguin permet le suivi des marqueurs immunitaires du cheval.

Dans une optique de raffinement, les chevaux sont manipulés dans un travail adapté à leur contention pour éviter tout risque de blessure. De plus, durant tout l'essai les chevaux vont au paddock en groupe. Ceci permet de respecter leur bien-être. Au quotidien, le personnel animalier observe le comportement de chaque cheval matin et soir au moment de la distribution des repas afin de repérer les signes de mal-être ou de souffrance. Ces signes inhabituels sont immédiatement signalés au responsable de l'expérimentation.

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

18690 La forme la plus sévère d'une infection s'appelle un choc septique. Ce choc septique est associé à une dysfonction du cœur et des vaisseaux ainsi qu'à une augmentation des globules blancs dans les organes. Les globules blancs participent à l'augmentation de l'inflammation chez les patients. Bien que l'inflammation soit bénéfique pour combattre une infection, sa persistance dans le temps peut devenir nocive et conduire à une perte d'efficacité de la réponse de l'organisme contre l'infection.

Le système nerveux joue un rôle important dans la régulation de cette inflammation. Modifier l'activation du système nerveux lors du choc septique pourrait, grâce à une régulation de l'inflammation, améliorer la fonction du cœur et des vaisseaux.

L'hypothèse de ce travail est qu'en agissant sur le système nerveux, l'inflammation des patients en choc septique ainsi que leurs fonctions cardiaque et vasculaire pourraient être améliorées.

Pour réaliser ce travail, nous avons évalué les fonctions cardiaque et vasculaire, ainsi que le profil inflammatoire de souris en choc septique chez lesquels nous avons partiellement bloqué ou non le système nerveux.

Pour répondre à notre hypothèse, trois groupes d'expérience ont été définis. Les deux premières ont été réalisées et nous ont permis de soumettre un article scientifique. Cependant, afin de publier cet article, il est nécessaire de refaire une troisième série d'expériences qui nous permettra de valider l'effet de l'activation du système nerveux sur l'inflammation lors du choc septique.

Pour cette troisième expérience cinq groupes de six souris seront prévus (30 animaux). Le calcul du nombre d'animaux a été le plus strict possible. Le type d'animal utilisé est en parfaite adéquation avec l'objectif d'analyse de l'inflammation. Pour chaque procédure expérimentale, des points limites ont été définis à priori, et la prise en charge de la douleur est prise en compte à chaque stade de chaque procédure. Nous maîtrisons bien les paramètres de milieu de vie, ceci permettant une acclimatation optimale à l'animalerie.

Dans le cadre du respect de la règle des 3R :

-Afin de réduire le nombre d'animaux, les mâles et les femelles seront utilisés. Plusieurs types de mesures seront effectués sur un même animal en traitant la douleur induite par la chirurgie par injection sous-cutanée d'analgésique (buprénorphine) toutes les 6 heures. Les chirurgies se feront

sous anesthésie gazeuse (isoflurane). Six animaux par groupe sont nécessaires afin de ne pas compromettre les objectifs du projet et de pouvoir réaliser de bonnes analyses statistiques. Des tests statistiques adaptés pour des petits effectifs seront utilisés pour analyser les données.

-Ce modèle murin ne peut être remplacé et a été choisi par rapport à sa proximité avec les situations cliniques humaines. On ne peut pas modéliser le choc septique avec d'autres types de modèles, par exemple in vitro, parce que nous étudions plusieurs fonctions et leurs interactions : fonction cardiaque, fonction vasculaire, et immunitaire. Enfin, ce modèle est le plus utilisé dans la littérature.

- Pour le raffinement, les animaux ne seront pas manipulés dans la même pièce que celle où ils sont hébergés. Les souris seront hébergées de 2 à 3 par cages individuellement ventilées. Elles seront nourries à volonté avec des croquettes. La litière sera changée une fois par semaine. L'enrichissement du milieu se fera avec du papier plissé des bâtonnets de bois et des maisonnettes en carton.

18691 Des données de plus en plus nombreuses indiquent que des acteurs clés du développement tumoral sont également des régulateurs importants du métabolisme de la cellule. Notre laboratoire s'intéresse à un régulateur important de la balance entre la prolifération et la survie des cellules: la protéine E4F1. Nos données récentes ont permis de mettre en évidence un lien entre E4F1 et le métabolisme. Cette notion est renforcée par l'identification de mutations dans le gène E4F1 chez des patients atteints du syndrome de Leigh, une maladie neurologique due à des perturbations du métabolisme. Ces patients présentent de nombreux symptômes cliniques incluant des symptômes neuronaux et musculaires. Sur la base de ces résultats, l'objectif de notre projet est de développer un modèle murin qui récapitule les symptômes neuronaux associés au syndrome de Leigh. Pour atteindre cet objectif, nous développerons des souris génétiquement modifiées nous permettant d'éliminer le gène E4f1 spécifiquement dans les neurones et d'évaluer les conséquences sur le développement du cerveau et la survie neuronale. Les différentes analyses réalisées sur ces animaux seront faites dans un souci du respect de la règle des 3R:

- « Réduire » le nombre d'animaux en expérimentation. Nous avons prévu d'utiliser un nombre minimum d'animaux mais néanmoins suffisant pour garantir la puissance statistique de nos résultats expérimentaux.

- « Raffiner » la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites (critères d'interruption): le bien-être de nos animaux est suivi de façon quotidienne et nos animaux seront élevés dans un milieu enrichi (litière mélangée à des copeaux et briques de peuplier). Une attention particulière sera portée aux animaux qui seront prédisposés au développement tumoral du fait de la manipulation génétique subie.

- « Remplacer » les modèles animaux: Il n'existe à ce jour aucun modèle d'étude in vitro permettant de modéliser la complexité des interactions métaboliques à distance entre tissus. De fait, cette étude doit obligatoirement être réalisée in vivo chez l'animal.

Pour l'ensemble de ce projet nous avons prévu d'analyser au maximum 240 souris adultes, 40 nouveaux-nés et 200 embryons, sur une durée de 5 ans.

18692 Les leucémies sont des cancers qui touchent les cellules précurseurs des cellules du sang. De nombreuses mutations (le plus souvent acquises) en sont à l'origine. La biologie moléculaire a permis d'identifier des anomalies génétiques très rares, qui peuvent être responsables de formes de leucémie très agressives et résistantes aux traitements conventionnels. Ces anomalies sont communes à d'autres pathologies sanguines qui sont traitées avec des molécules spécifiques. Notre projet vise à tester la possibilité de l'utilisation de ces molécules dans le traitement des leucémies résistantes. Pour ce faire, le recours à l'animal est indispensable car il n'est pas possible de suivre les effets d'un médicament dans un organisme vivant in vitro. Le choix de l'animal s'est porté sur la souris à qui l'on peut greffer des cellules leucémiques humaines et qui constitue actuellement le modèle le plus proche des leucémies humaines. Dans notre étude, des souris seront greffées avec les cellules leucémiques de 3 patients et l'efficacité thérapeutique de plusieurs

molécules d'intérêt thérapeutique, utilisées seules ou en association, sera testée. Ces tests sont basés sur des protocoles développés précédemment par une équipe de collaborateurs.

Pour chacune des expériences de souris greffées avec les cellules leucémiques de chacun des 10 donateurs, 4 conditions seront testées (aucun traitement/contrôle, chacune des molécules d'intérêt seules ou en combinaison). Au total, nous utiliserons 480 souris immunodéficientes, qui acceptent la greffe de cellules humaines. nombre suffisant pour un traitement statistique des données et pouvoir affiner le traitement donné aux souris développant la leucémie.

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

18693 L'utilisation de sang et/ou de sécrétions corporelles est routinière dans les laboratoires développeurs de vaccins d'utilisation vétérinaire et/ou de techniques de diagnostic de maladies animales. Ces produits organiques constituent des réactifs nécessaires pour l'évaluation de l'efficacité de vaccins, le développement de tests de diagnostic de maladies et l'établissement et/ou maintien de nouvelles lignées animales modèles pour les maladies animales étudiées. Dans ce cadre, ce projet vise à réaliser des prélèvements sanguins et des écouvillonnages tous types confondus utilisés de façon routinière dans un laboratoire de recherche et diagnostic de maladies animales.

Les espèces animales choisies pour ce projet sont les espèces cibles ou les modèles animaux des maladies étudiées.

Le nombre d'animaux utilisés sera adapté à l'activité (projets, nombre de personnels) et à la capacité d'hébergement de l'établissement utilisateur. Afin de respecter au mieux la règle des 3R, comme il n'est pas possible d'acheter directement du sang chez un fournisseur agréé, nous réduirons le nombre d'animaux au minimum. C'est pourquoi, un maximum de 250 souris, 25 rats et 10 lapins sera utilisé pour les prélèvements de routine pendant la durée de ce projet (5 ans).

Le volume et fréquence des prélèvements sanguins seront également le plus petit possible et dans les limites recommandées pour chaque espèce. Toutes les procédures seront adaptées à l'espèce animale choisie et réalisées par du personnel expérimenté.

Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de leur hébergement. Par exemple, pour réduire le stress, les souris et les rats seront hébergés en groupe et leur milieu enrichi par l'ajout de tunnel et/ou carré de cellulose ; celui des lapins sera enrichi par des bûchettes de bois à ronger (par exemple briquettes de peuplier).

18694 Les maladies du retard mental sont parmi les maladies les plus souvent rencontrées dans les services de génétique médicale, et représentent 5 à 10% des coûts de santé publique. Un des objectifs principaux des laboratoires de diagnostic génétique est d'identifier les gènes associés aux anomalies du développement. Pourtant, près de 50% des patients dont l'ADN est séquencé et analysé se retrouveront dans une impasse diagnostique à l'issue de ces analyses lorsque les mutations sont retrouvées dans des gènes dont la fonction est peu connue par exemple. Ainsi, nous nous intéressons au modèle murin pour explorer la fonction des gènes dans le développement.

Le premier axe de recherche porte sur l'analyse systématique de l'impact des 20000 gènes du génome de la souris sur la morphologie cérébrale. A cette fin, les cerveaux de souris « KO » issues d'un consortium international (indépendant de cette demande) sont traités selon un protocole histologique à haut débit. A l'heure actuelle, nous disposons de plus de 200 gènes candidats pour lesquels des études ultérieures seront à considérer et qui feront l'objet de demandes de DAP indépendantes et ciblées.

Ainsi, au cours de notre étude sur la morphologie cérébrale à haut-débit, nous avons identifié Wdr47, un gène pour lequel nous disposons aujourd'hui de plusieurs patients présentant des mutations mais dont les mécanismes physiopathologiques ne sont pas complètement élucidés. Notre demande vise à poursuivre ces études, notamment par l'exploration du comportement animal de plusieurs modèles animaux Wdr47 (anxiété, mémoire, stress, reconnaissance spatiale, et sociale,...) et par l'utilisation de composés pharmacologique qui viserait à rétablir le phénotype sauvage, c'est-à-dire améliorer les désordres du système nerveux central (de la structure du cerveau ou du comportement) observé chez l'animal malade dans lequel Wdr47 est inactivé.

Il est important de noter que l'étude fonctionnelle poussée des maladies du retard mental ne peut être réalisée que sur animaux vivants puisqu'il s'agit ici de modéliser des maladies humaines affectant l'organe dont la structure anatomique est la plus complexe du corps humain: le cerveau. Pour ces raisons, le REMPLACEMENT par d'autres modèles nous est impossible. Le nombre d'animaux sera REDUIT au minimum pour atteindre un pouvoir de détection statistique de 80% entre différents groupes d'animaux. Et enfin, toutes les précautions possibles seront prises pour RAFFINER nos procédures et réduire au mieux l'inconfort des animaux en les habituer aux tests et/ou en utiliser anesthésique et antalgique.

Pour atteindre notre objectif scientifique, l'expérimentation animale in vivo sera utilisée sur un maximum de 864 souris sur fond génétique C57BL6J pendant une période de 5 années. Le nombre de souris se décline en plusieurs groupes :

2 cohortes de 12 animaux, 2 sexes, 3 génotypes (WT, Het et Hom), 2 traitements, 3 lignées de souris Wdr47 (KO hypomorphe, KO total, KO conditionnel).

18695 La thérapie génique est une stratégie innovante de médecine moléculaire consistant à transférer un acide nucléique thérapeutique dans des cellules malades pour améliorer l'état clinique d'un patient. Pour véhiculer ce produit thérapeutique, les vecteurs viraux, et en particulier les vecteurs recombinants dérivés des virus adéno-associés (AAVr) constituent des outils de choix. Il a été montré qu'une seule injection avec un AAVr peut permettre une expression à long terme du gène thérapeutique transféré, aussi bien dans des modèles animaux que chez l'homme. Les vecteurs viraux dérivés de l'AAV sont en passe de devenir des produits thérapeutiques et plusieurs de ces vecteurs viennent d'obtenir récemment une autorisation de mise sur le marché. Néanmoins, malgré des succès récents, plusieurs facteurs majeurs limitant l'efficacité du transfert de gène in vivo à l'aide d'AAVr dans les essais cliniques proviennent de la large biodistribution des AAV après injection mais également de la réponse immunitaire dirigée contre la capsid du vecteur ou du transgène. Ces limites nécessitent d'injecter de fortes doses chez le patient, et concernant la réponse immunitaire cela peut engendrer la destruction des cellules transduites, annihilant de fait tout bénéfice de la thérapie génique. L'occurrence de cette réponse immune délétère s'explique par le fait que les hommes sont naturellement infectés au cours de leur vie par des virus AAV sauvages (virus qui ne sont par ailleurs à ce jour associés à aucune pathologie chez l'homme).

L'objectif de ce projet repose sur le potentiel de la chimie organique pour améliorer l'« activité spécifique » et l'« index thérapeutique » d'une particule AAV recombinante choisie. Ces améliorations, non explorées jusqu'à présent, vont être obtenues par l'emploi de ligands ayant des propriétés de ciblage, couplés à la capsid d'un AAV. Ces modifications chimiques accentueront le ciblage vers un organe ou un tissu spécifique, comme le foie, la rétine ou le muscle squelettique, ce qui en retour permettra une réduction de la quantité d'AAV à administrer au patient.

Au-delà de l'augmentation du tropisme cellulaire, ces capsides modifiées chimiquement pourraient également échapper en partie au moins à des facteurs naturellement neutralisants et donc diminuer l'effet de la réponse immunitaire.

Pour cela, les praticiens et concepteurs en recherche sur la cécité doivent acquérir les compétences nécessaires à la réalisation de leurs projets de recherche impliquant des animaux selon la Directive Européenne (arrêté du 1er février 2013 relatif à l'acquisition et à la validation des compétences des personnels des établissements utilisateurs, éleveurs et fournisseurs d'animaux utilisés à des fins

scientifiques). C'est dans ce cadre que nous souhaitons mettre au point les techniques d'injection sous rétinienne et intravitréenne sur le modèle souris.

Dans un premier temps, nous souhaitons pour cette mise au point tester des lots de vecteurs AAV encapsidant la GFP pour lesquels nous connaissons déjà les résultats. Nous pourrions effectuer un suivi longitudinal de l'état de la rétine, en effectuant des imageries du fond d'œil et des différentes couches de la rétine par Tomographie par cohérence optique (OCT). Ces imageries seront faites sous anesthésie générale maximum une fois par mois. Puis, 1 à 3 mois après l'injection, nous récupérerons les yeux lors de l'euthanasie des animaux, afin d'analyser l'état de la rétine et le niveau d'expression de la GFP.

Dans un second temps, nous souhaitons comparer différents sérotypes d'AAV modifiés chimiquement ou non (AAV2 et AAV8) par injection sous rétinienne ou intravitréenne.

Au vue des gestes réalisés il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par un autre modèle. Un maximum de 588 souris sera utilisé sur une période de 5 ans, ce nombre sera réduit au minimum nécessaire en fonction du nombre de formations à mener et de lots de vecteurs à tester. Avec le mouvement de personnels, nous aurons besoin de former de temps en temps d'autres personnels de recherche. Les animaux sont nés et élevés dans des élevages agréés.

L'application de la règle des 3R au cours de ce projet sera effectuée de la façon suivante :

1/ Remplacer :

Des premiers tests seront effectués sur différents types de cellules en culture pour évaluer l'effet de la modification chimique sur le vecteur. Cependant, les modèles in vitro ne peuvent s'approcher de la complexité des interactions entre le vecteur et l'environnement biologique in vivo et rendent donc difficile la reproductibilité de ces résultats in vivo. Il est également impossible de vérifier la biodistribution ou encore l'index thérapeutique de ces particules modifiées sur des cellules en culture. De plus, la rétine, structure complexe composée de multiples couches de neurones et cellules nourricières, ne peut être reconstituée parfaitement in vitro. L'utilisation de modèles animaux est donc indispensable pour étudier le transfert de gènes dans la rétine

2/ Réduire :

La détermination du nombre d'animaux a été réalisée par approche statistique et sur la base de l'expérience d'études similaires en thérapie génique des maladies de la vision.

3/ Raffiner :

Les études antérieures de notre équipe ont été faites sur d'autres modèles pour des études précliniques. Pour l'étude de certaines pathologies de la rétine et pour des études de recherches fondamentales nous serons amenés à travailler sur le modèle souris avant de pouvoir passer à une plus grosse espèce

Toutes les interventions sur animaux se feront sous anesthésie générale et locale renforcée si nécessaire par des compléments analgésiques et anti-inflammatoires appropriés, pour réduire la contrainte imposée aux animaux.

L'état de santé des animaux est surveillé tout au long des expériences afin d'éviter l'apparition éventuelle d'une souffrance. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum. Pour leur bien-être, les animaux sont hébergés à plusieurs par cage (dans la limite réglementaire) dans un milieu enrichi comprenant des frisottis de papier, buchettes de bois et l'enrichissement serait renforcé par des tunnels ou dômes si un animal se retrouvait en hébergement seul. L'application de critères d'arrêts nous permettra d'intervenir immédiatement dès le moindre signe de souffrance en utilisant des traitements antalgiques appropriés ou de décider d'une euthanasie.

18696 Les études épidémiologiques mettent en évidence un lien entre l'exposition aux rayonnements ionisants à des doses fortes à modérées (> 500m Gy) et le développement de pathologies cardiovasculaires notamment les pathologies cardiovasculaires.

Les études expérimentales ne montrent pas de lien entre exposition chronique à très faibles doses de rayonnements ionisants et le développement de l'athérosclérose.

Le stress est un des premiers facteurs de risque cardiovasculaire. Il a été montré qu'un stress psychosocial est associé à un état pro-oxydant associé à une augmentation de l'oxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL) mais également des cytokines pro-inflammatoires induisant une aggravation de la pathologie athéromateuse et entrainer des ruptures de plaques d'athérome entraînant des accidents vasculaires cérébraux (AVC) et des infarctus.

Aucune étude n'a cependant mis en évidence la réponse d'une co-exposition associant rayonnements ionisants et co-facteur de risque tel que le stress sur les maladies cardiovasculaires et plus précisément la pathologie athéromateuse et la vascularisation cérébrale. Ainsi dans un contexte de situation post-accidentelle et d'un point de vue de radioprotection, il est indispensable de prendre en compte un facteur de risque aussi important que le stress dans le développement des maladies cardio ou cérébrovasculaires suite à une exposition chronique à des rayonnements ionisants.

Par une approche in vivo nous allons exposer durant 2 à 6 mois des souris ApoE^{-/-} (qui développent spontanément des plaques d'athérosclérose, ce qui n'est pas le cas des souris sauvages) aux rayonnements ionisants gamma à faibles doses par ajout de Cesium 137 dans l'eau de boisson aux concentrations de 0, 20, 100 ou 500 KBq/L et induire dans le même temps un stress (dans ce projet, le stress est l'exposition à la litière sale de rat). A l'issue de cette co-exposition l'objectif sera d'évaluer :

- Le phénotype de plaques d'athérome (taille, nombre, composition)
- Le profil moléculaire des vaisseaux et du sang (approches métabolomique, inflammation)
- La vascularisation cérébrale (densité vasculaire et l'inflammation cérébrale).

Ce projet prévoit l'utilisation de 360 souris sur 5 ans, représentant un nombre de souris nécessaire afin d'avoir une puissance statistique suffisante et des résultats exploitables.

Afin de réaliser ce travail, l'utilisation d'animaux est nécessaire car nous voulons connaître l'effet de rayonnements ionisants sur une pathologie à l'échelle de l'organisme entier. Dans ce cas, l'étude sur les cellules n'est pas suffisamment représentative d'un organisme intégré et ne peut mimer une pathologie globale.

Les procédures utilisées suivent la réglementation afin de limiter l'impact sur le bien-être des animaux : suivi des animaux, enrichissement adapté et hébergement en groupes réduits pour limiter agressions entre congénères, raffinement de la méthode de prélèvement de sang.

18697 L'activation organisée des neurones dans l'hippocampe et le néocortex est impliquée dans des fonctions cognitives importantes telles que la perception, la navigation spatiale, la formation de la mémoire, la récupération de la mémoire et la planification. Notre question principale est de comprendre comment ces réseaux neuronaux s'organisent pour assurer ces fonctions cognitives. Nous étudierons, en particulier, le rôle d'une sous-population de neurones, les neurones « hubs ». Ces neurones, GABAergiques inhibiteurs et/ou neurones glutamatergiques excitateurs, sont des neurones pionniers générés à des stades embryonnaires précoces, capables d'influencer et d'organiser les activités neuronales non seulement au cours du développement mais aussi chez l'adulte. Ce projet a pour objectif principal d'étudier les caractéristiques morfo-fonctionnelles des neurones GABAergiques et glutamatergiques en fonction de leur origine spatio-temporelle embryonnaire, dans l'hippocampe et le néocortex chez l'adulte en condition normale ou pathologique (épilepsie).

Cette étude s'effectuera sur des souris (*Mus Musculus*). Le modèle murin permet de tirer des conclusions générales sur l'organisation corticale des mammifères, y compris chez l'homme. Nous utiliserons une méthodologie pluridisciplinaire que nous avons développée au sein de l'équipe depuis plusieurs années et regroupant : 1) l'imagerie bi-photon calcique chronique in vivo à grande échelle permettant l'enregistrement simultané de l'activité de plusieurs centaines de neurones sur la souris éveillée libre de courir sur un tapis roulant non motorisé ; 2) la stimulation optique (optogénétique) permettant d'établir des relations causales entre l'activité de neurones spécifiques et la dynamique du réseau neuronal; 3) des enregistrements électrophysiologiques in vivo et un suivi vidéo du comportement de l'animal vigile ou dans différents stades de sommeil naturel ; 4)

l'analyse computationnelle de la dynamique des activités neuronales ; 5) l'étude des connexions anatomiques (connectome) des neurones en fonction de leur origine spatio-temporelle embryonnaire ; 6) l'utilisation de lignées de souris transgéniques permettant d'identifier différentes sous-populations neuronales neurones.

Cette pluridisciplinarité technique et méthodologique permet d'optimiser le nombre d'animaux engagés (N=2776) tout en améliorant la qualité des données complexes extraites des expériences, de générer des résultats statistiquement significatifs et renforcer le pouvoir prédictif des conclusions scientifiques. La conception de ce projet a été articulée pour appliquer au mieux les principes de réduction et de raffinement. 1) Remplacement : il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode de substitution in vitro ou en culture cellulaire pour étudier l'activité des réseaux neuronaux en fonction des informations externes (informations allothétiques) et internes (informations idiothétiques) que reçoivent les structures corticales. 2) Réduire : Les expériences seront réalisées avec un souci permanent de réduction du nombre d'animaux. La méthode utilisée d'imagerie calcium in vivo ou d'électrophysiologie permet l'enregistrement d'un très grand nombre de neurones (plusieurs centaines) par animal, et donc de diminuer le nombre d'animaux utilisés. De plus, il ne sera pas tenu compte du sexe des animaux, permettant ainsi de réduire le nombre d'animaux non utilisés et euthanasiés. 3) Raffinement : tout est mis en oeuvre pour réduire le stress au minimum ; les souris seront maintenues en hébergement isolé du fait des différents protocoles chirurgicaux et expérimentaux utilisés mais avec des contacts visuels et olfactifs et en milieu enrichi (bâtonnets de bois, maison et/ou tunnel en carton, matériel pour le nid). De plus, les souris seront habituées progressivement aux protocoles comportementaux et aux manipulateurs. Les chirurgies seront réalisées en anesthésie profonde et les douleurs post-opératoires seront traitées par l'utilisation d'anti-inflammatoires et d'antalgiques adaptés. Un suivi du bien-être de l'animal sera quotidiennement évalué, et l'animal sera sur le champ euthanasié si les points limites sont atteints.

18698 De nombreuses interventions chirurgicales du colon, le plus souvent en urgence, peuvent nécessiter la réalisation d'une stomie temporaire (abouchement du colon à la peau avec poche) avant rétablissement de la continuité. Ces interventions peuvent être nécessaires chez des patients présentant de lourdes comorbidités et des antécédents de chirurgie abdominale.

Pour retirer cette poche et rétablir la continuité digestive, une nouvelle chirurgie invasive est nécessaire. Les raccordements (anastomoses) entre le colon et le rectum peuvent se compliquer de rétrécissements (sténoses) du diamètre (parfois complet ne laissant plus passer les selles) ou de fuites (fistules) vers la cavité abdominale. En pratique clinique humaine, environ 50% des patients opérés en urgence ne retrouvent jamais une fonction digestive normale et gardent leur dérivation. Pour les patients candidats à un rétablissement de continuité colorectale, il s'agit d'une intervention lourde à l'origine de 2% de mortalité et 30% de morbidité.

L'écho-endoscopie thérapeutique et des prothèses d'apposition tissulaire permettent de relier deux segments ou cavités qui ne communiquent pas.

Plusieurs publications ont également montré la faisabilité de raccordements colorectaux ou iléorectaux par écho-endoscopie après fermeture complète de la suture chirurgicale. Ces procédures moins invasives que les procédures chirurgicales présentent de très faibles taux de complications, permettant une réelle alternative pour les patients, notamment présentant d'importantes comorbidités ou de multiples antécédents chirurgicaux.

Le but de cette étude est de créer un modèle expérimental animal afin d'évaluer la faisabilité, l'efficacité et la sécurité de la remise en continuité digestive après chirurgie colique d'urgence et réalisation d'une stomie temporaire par technique micro-invasive endoscopique, afin de permettre ensuite la fermeture de stomie par abord local simple. Cette première phase de validation sur animal aura des impacts attendus et perspectives multiples : il s'agit de pouvoir proposer aux patients une prise en charge moins invasive, et de limiter le risque de réintervention pour complication.

Objectifs :

-Créer un modèle expérimental animal de colostomie temporaire avec fermeture du rectum d'aval.

-Étudier la faisabilité d'anastomoses colorectales par double guidage endoscopique et écho-endoscopique

-Définir les modalités de suivi et de retrait de la prothèse métallique d'apposition tissulaire

Méthodologie :

Le modèle animal porcin est utilisé pour sa similitude anatomique avec l'homme ainsi que son gabarit permettant d'utiliser du matériel similaire à celui utilisé en pratique clinique (modèles d'endoscope et de prothèses équivalents, dédiés à un usage animal).

Les modèles d'études seront 6 cochons, de 35 à 45 kg.

La première étape sera la réalisation d'une résection du colon sigmoïde par un chirurgien digestif avec mise en stomie du colon gauche et fermeture du moignon rectal.

Deux semaines plus tard, une nouvelle intervention sera programmée pour réalisation du raccordement colorectal par abord endoscopique, par un endoscopiste interventionnel expérimenté, suivie de la fermeture de stomie par abord local, par un chirurgien digestif.

Les cochons seront, en l'absence de complication, gardés en vie pendant 2 semaines afin d'évaluer le profil de tolérance et la perméabilité du raccordement après fermeture de stomie. En fin d'étude, une endoscopie post mortem sera réalisée afin de contrôler la perméabilité de l'anastomose et des prélèvements seront effectués pour une étude anatomopathologique.

Nous avons établis des points limites (complication à la chirurgie, échec du raccordement, . . .), suffisamment prédictifs pour éviter toute souffrance inutile à l'animal. En cas d'atteinte d'un de ces points limites, l'animal sera anesthésié et mis à mort sans souffrance.

Raffinement des méthodes : l'ensemble des procédures du protocole sera réalisé sous anesthésie générale, avec un niveau de sédation comparable à celui utilisé en clinique chirurgicale chez l'homme. L'anesthésie et l'analgésie chez le modèle porcin sont déjà en place et maîtrisées dans notre structure. Durant toute l'étude, un examen clinique sera effectué régulièrement et des points limites sont établis afin d'assurer le bien être animal et d'éviter une souffrance non nécessaire.

Les impacts attendus et les perspectives sont multiples : il s'agit de pouvoir proposer, après réalisation d'une expérimentation prospective chez l'homme en cas de succès, aux patients une prise en charge moins invasive, et de limiter le risque de réintervention pour complication.

18699 Le neurone est une cellule excitable en raison d'une différence de potentiel entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule : le compartiment intracellulaire est chargé négativement, tandis que le compartiment extracellulaire est chargé positivement. Cette différence de potentiel appelée potentiel de repos est due à une inégale répartition des ions de part et d'autre de la membrane cellulaire. Il a déjà été montré que les concentrations ioniques intracellulaires étaient modifiées durant la période périnatale et changeaient la polarité de la réponse au principal neurotransmetteur inhibiteur du cerveau, le GABA. De plus cette inversion de la réponse au GABA est abolie dans différentes pathologies neurodéveloppementales dont les troubles du spectre autistique (TSA). Or pour comprendre de telles altérations neurodéveloppementales, il est crucial de comprendre comment les réseaux neuronaux se développent avant et après la naissance. Ce projet vise désormais à étendre ces observations par enregistrements électrophysiologiques avant et après la naissance. Il nécessitera l'utilisation de 27 souris.

Ce projet a été planifié pour appliquer au mieux la règle des 3R :

-Remplacement. A notre connaissance, aucun modèle expérimental autre que les préparations ex vivo, ne permet l'étude détaillée et mécanistique des réseaux neuronaux.

-Réduction. Nous analyserons nos données au fur et à mesure des expériences, permettant d'éviter les expériences inutiles. Si possible, nous appliquerons plusieurs protocoles par expérience, pour minimiser le nombre d'animaux utilisés.

-Raffinement. Les animaux seront hébergés dans des cages avec environnement enrichi (maison en carton pour rongeurs qui permet aux animaux de dormir et de se reposer, en plus de participer à leur exercice physique : grimper et explorer) et de matériaux de nidification, avec accès à l'eau et la nourriture ad libitum, dans des pièces à atmosphère contrôlée (température et hygrométrie) et au

cycle jour/nuit en 12h/12h. L'aspect général, le comportement et la locomotion des animaux seront observés quotidiennement pour déceler d'éventuels signes de souffrance, de détresse ou de douleur liés à la procédure expérimentale. Si nécessaire, des mesures seront prises pour réduire leur stress et leur douleur.

18700 Le développement et la réalisation des études de comportement nécessaires aux projets de recherche dans une nouvelle structure d'hébergement et d'expériences mutualisées nécessitent au préalable de valider chacun des tests qui y seront menés. Dans le domaine de l'éthologie appliquée, la maîtrise de l'environnement expérimental est primordiale, et certaines conditions spécifiques devront être mises en place, vérifiées et calibrées afin de pouvoir valider la réalisation de ces tests et permettre leur bonne réplication. Dans ce but, un premier ensemble de tests comportementaux « classiques » doit être mené chez la souris et constitue donc le cœur de ce projet. 52 souris ainsi que 4 rats seront nécessaires à la réalisation de ce projet. L'analyse globale et détaillée des réponses expérimentales obtenues permettra de valider la possibilité de réalisation locale de ce type d'études, ou au contraire de mettre en évidence l'existence de facteurs impactants qu'il conviendra alors d'éliminer.

Ce projet comporte six procédures au total, dont quatre de classe « légère » et deux de classe « modérée », incluant les principaux tests utilisés en éthologie appliquée sur le modèle souris, et qui seront réalisés selon leurs modalités classiques. Ainsi ce travail devrait permettre de garantir aux utilisateurs de la plate-forme comportementale la bonne capacité d'investigation de celle-ci pour chacun des futurs tests qui y seront menés, aussi bien en termes de détection que de caractérisation des effets induits par de futurs traitements d'intérêt.

1. Remplacement : La vocation de ce projet étant la validation de tests comportementaux menés chez la souris, une stratégie de remplacement ne peut être envisagée car, dans le domaine du comportement, les modèles *in vitro* ou *in silico* ne peuvent se substituer à un modèle intégratif tel que celui représenté par les rongeurs.

2. Réduction : L'effectif minimum nécessaire a été calculé afin de garantir une exploitation statistique conforme aux objectifs scientifiques attendus. Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés, sans toutefois entraver les attendus du projet, chaque souris participera à 5 procédures, dont 4 de classe légère puis une de classe modérée et pourront ensuite être utilisés à d'autres fins (formation, mises au point...). Les rats participeront à une seule procédure de classe modérée.

3. Raffinement :

Les animaux seront placés et maintenus à 3 ou 4 par cages sur toute la durée du projet afin de préserver les interactions sociales. De plus, les cages d'hébergement seront munies d'éléments d'enrichissement (buchettes, matériel de nidification) permettant d'offrir aux souris la possibilité d'évoluer en espaces clos, type de milieu préférentiel chez des rongeurs. Le bien-être des animaux sera évalué quotidiennement par observation de tout comportement pouvant suggérer un inconfort ou une diminution du bien-être animal (Raffinement).

A cet effet, plusieurs signes seront recherchés :

- Une hypoactivité (immobilité) en parallèle avec un positionnement de l'animal dans un coin de cage
- Une posture voutée avec apparence de la fourrure de type « hérissée » (pilo-érection)
- Des vocalisations

Si un de ces éléments est retrouvé sur 3 jours consécutifs, ou si deux de ces éléments sont retrouvés simultanément, l'animal sera immédiatement retiré du projet, surveillé et affecté à d'autres projets de formation si évolution positive.

18701 De nombreuses interventions chirurgicales du colon, le plus souvent en urgence, peuvent nécessiter la réalisation d'une stomie temporaire (abouchement du colon à la peau avec poche) avant rétablissement de la continuité. Ces interventions peuvent être nécessaires chez des patients présentant de lourdes comorbidités et des antécédents de chirurgie abdominale.

Pour retirer cette poche et rétablir la continuité digestive, une nouvelle chirurgie invasive est nécessaire. Les raccords (anastomoses) entre le colon et le rectum peuvent se compliquer de rétrécissements (sténoses) du diamètre (parfois complet ne laissant plus passer les selles) ou de fuites (fistules) vers la cavité abdominale. En pratique clinique humaine, environ 50% des patients opérés en urgence ne retrouvent jamais une fonction digestive normale et gardent leur dérivation. Pour les patients candidats à un rétablissement de continuité colorectale, il s'agit d'une intervention lourde à l'origine de 2% de mortalité et 30% de morbidité.

L'écho-endoscopie thérapeutique et des prothèses d'apposition tissulaire permettent de relier deux segments ou cavités qui ne communiquent pas.

Plusieurs publications ont également montré la faisabilité de raccords colorectaux ou iléorectaux par écho-endoscopie après fermeture complète de la suture chirurgicale. Ces procédures moins invasives que les procédures chirurgicales présentent de très faibles taux de complications, permettant une réelle alternative pour les patients, notamment présentant d'importantes comorbidités ou de multiples antécédents chirurgicaux.

Le but de cette étude est de créer un modèle expérimental animal afin d'évaluer la faisabilité, l'efficacité et la sécurité de la remise en continuité digestive après chirurgie colique d'urgence et réalisation d'une stomie temporaire par technique micro-invasive endoscopique, afin de permettre ensuite la fermeture de stomie par abord local simple. Cette première phase de validation sur animal aura des impacts attendus et perspectives multiples : il s'agit de pouvoir proposer aux patients une prise en charge moins invasive, et de limiter le risque de réintervention pour complication.

Objectifs :

- Créer un modèle expérimental animal de colostomie temporaire avec fermeture du rectum d'aval.
- Étudier la faisabilité d'anastomoses colorectales par double guidage endoscopique et écho-endoscopique
- Définir les modalités de suivi et de retrait de la prothèse métallique d'apposition tissulaire

Méthodologie :

Le modèle animal porcin est utilisé pour sa similitude anatomique avec l'homme ainsi que son gabarit permettant d'utiliser du matériel similaire à celui utilisé en pratique clinique (modèles d'endoscope et de prothèses équivalents, dédiés à un usage animal).

Les modèles d'études seront 6 cochons, de 35 à 45 kg.

La première étape sera la réalisation d'une résection du colon sigmoïde par un chirurgien digestif avec mise en stomie du colon gauche et fermeture du moignon rectal.

Deux semaines plus tard, une nouvelle intervention sera programmée pour réalisation du raccordement colorectal par abord endoscopique, par un endoscopiste interventionnel expérimenté, suivie de la fermeture de stomie par abord local, par un chirurgien digestif.

Les cochons seront, en l'absence de complication, gardés en vie pendant 2 semaines afin d'évaluer le profil de tolérance et la perméabilité du raccordement après fermeture de stomie. En fin d'étude, une endoscopie post mortem sera réalisée afin de contrôler la perméabilité de l'anastomose et des prélèvements seront effectués pour une étude anatomopathologique.

Nous avons établis des points limites (complication à la chirurgie, échec du raccordement, . . .), suffisamment prédictifs pour éviter toute souffrance inutile à l'animal. En cas d'atteinte d'un de ces points limites, l'animal sera anesthésié et mis à mort sans souffrance.

Raffinement des méthodes : l'ensemble des procédures du protocole sera réalisé sous anesthésie générale, avec un niveau de sédation comparable à celui utilisé en clinique chirurgicale chez l'homme. L'anesthésie et l'analgésie chez le modèle porcin sont déjà en place et maîtrisées dans notre structure. Durant toute l'étude, un examen clinique sera effectué régulièrement et des points limites sont établis afin d'assurer le bien être animal et d'éviter une souffrance non nécessaire.

Les impacts attendus et les perspectives sont multiples : il s'agit de pouvoir proposer, après réalisation d'une expérimentation prospective chez l'homme en cas de succès, aux patients une prise en charge moins invasive, et de limiter le risque de réintervention pour complication.

18702 Les produits de santé (médicaments, dispositifs médicaux, etc.) constituent un élément clé dans la dispensation de soins de qualité aux patients. En alliant innovation et santé, la recherche et le développement de ces produits s'avèrent indispensables pour favoriser le progrès et l'accès aux meilleurs soins, dans le domaine de la santé humaine ou vétérinaire.

La réglementation exige de prouver l'efficacité et l'innocuité des produits de santé avant leur mise sur le marché

Dans ce projet, il s'agit principalement d'évaluer des produits de santé à l'aide de la technologie IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) permettant ainsi de limiter les actes techniques invasifs, sur des animaux venant de différents établissements utilisateurs, et ainsi de réduire le nombre d'animaux utilisés.

Toutes les espèces pouvant être hébergées dans nos locaux (rongeurs, lagomorphes, chiens, porcs, petits ruminants) sont susceptibles d'être inclus dans ce projet.

Les animaux venant d'autres établissements utilisateurs, des transports seront nécessaires entre nos locaux et l'établissement utilisateur d'origine: un temps suffisant sera assuré avant et après les examens d'imagerie, afin d'assurer un retour à un état physiologique stable.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est basé sur les recommandations des textes de référence et sur les contraintes scientifiques (nombre suffisant d'animaux pour assurer la validation scientifique des études). Les examens d'imagerie tels que l'IRM sont des méthodes qui permettent la réduction du nombre d'animaux inclus dans une expérimentation, améliorent le confort de ces derniers (procédure non invasive) et induisent une réduction des biais expérimentaux (suivi longitudinal d'un même animal).

Le nombre prévisionnel d'animaux utilisés dans le cadre de ce projet, sur 5 ans, est estimé à :

- 300 Souris
- 100 Hamsters
- 300 Rats
- 100 Cobayes
- 300 Lapins
- 100 Furets
- 100 Chiens
- 100 Porcs
- 100 Moutons
- 100 Chèvres

Ce nombre pourra être inférieur en fonction des études réellement effectuées. Par ailleurs, ces animaux sont déjà comptabilisés dans les demandes d'autorisation de projet de leur établissement utilisateur d'origine.

Chaque animal bénéficiera d'une attention et de soins de qualité pendant les examens d'imagerie, mais aussi en dehors de ceux-ci, afin d'assurer un bien-être optimal.

Notre projet porte sur des procédures d'imagerie non douloureuses, mais si une procédure mise en œuvre devait provoquer une douleur chez les animaux concernés, une analgésie sera automatiquement mise en place (selon les bonnes pratiques vétérinaires et en accord avec le protocole d'étude).

Les animaux seront hébergés en groupes sociaux harmonieux sauf lorsque les contraintes de l'étude l'empêchent. Dans tous les cas, pour toutes les espèces sociales, l'hébergement individuel devra être justifié et validé par la structure du bien-être animal.

Des enrichissements standards spécifiques à chaque espèce (produits de nidification, cachettes, jouets) seront systématiquement mis à disposition des animaux.

18703 L'état de choc hémorragique est l'une des principales causes de décès des patients traumatisés graves. Il résulte d'une hémorragie qui a pour conséquence directe le manque de volume sanguin

et le manque d'hémoglobine principalement. Les conséquences indirectes sont la mauvaise perfusion des organes vitaux et la mauvaise oxygénation des cellules. L'ensemble aboutit à un mauvais fonctionnement des cellules appelé état de choc.

En médecine d'urgence, la reconnaissance de l'hémorragie et de l'état de choc permet la mise en place d'une réponse thérapeutique adaptée. La base du traitement est d'apporter de l'oxygène aux tissus et aux cellules. Elle passe par la restauration d'un bon débit cardiaque et la reprise d'un fonctionnement normal de la cellule. Nos travaux précédents sur un modèle de choc hémorragique contrôlé chez des porcelets anesthésiés et ventilés ont explorés l'efficacité thérapeutique de solutés de remplissages, les méthodes d'évaluation du débit cardiaque et l'intérêt de l'analyse de la déformation myocardique par échographie (Strain).

En restant dans une dynamique expérimentale à mi-chemin entre la recherche et la clinique, nous voulons étudier la capacité de l'échographie (examen non invasif et disponible en médecine d'urgence pré et intrahospitalière) à évaluer la perte sanguine (déplétion) dans ce modèle. En effet, plusieurs techniques d'échographie cardiaques permettent d'évaluer les pressions intra-cardiaques qui sont corrélés au volume de sang circulant dans l'organisme (volémie). Le modèle utilisé nous permettant de contrôler le volume perdu, nous voulons connaître la pertinence des plusieurs techniques d'échographie existantes ou en développement pour évaluer la déplétion sanguine.

L'objectif est de trouver des indices échographiques que nous pourrions étudier chez l'homme afin de fournir aux médecins urgentistes un outil supplémentaire pour l'évaluation de la déplétion sanguine chez les patients hémorragiques. Nous voulons également continuer à travailler sur la compréhension du dysfonctionnement des vaisseaux et des cellules dans les états de chocs hémorragiques en fonction des traitements associés. L'évaluation de la porosité des vaisseaux se fera à l'aide de technique de microscopie. Le dysfonctionnement des cellules sera analysé par le dosage de l'acide lactique dans le sang et directement dans le muscle.

Cette étude sera réalisée sur modèle porcin car son système cardiovasculaire est proche de la physiologie humaine. Les animaux ne seront soumis qu'à une seule procédure sans réveil qui consistera dans un premier temps à induire un choc hémorragique, puis ensuite de traiter les animaux par deux techniques de remplissage vasculaire différentes, soient deux groupes d'étude. Tout au long de la procédure les animaux resteront anesthésiés et ventilés mécaniquement, leur évitant ainsi stress et douleur liée au choc hémorragique induit. Pour prouver qu'un indice échographique permet de dépister une quantité de saignement (10% de la volémie par exemple) en considérant les contraintes de faisabilité avec une spécificité, une précision et une puissance acceptables, nous prévoyons l'utilisation de 200 porcelets en 5 ans incluant une marge de sécurité en cas de perte due au modèle de choc hémorragique.

Dans le cadre de ce projet, tout sera mis en oeuvre pour appliquer le principe des 3R :

(Remplacer) Il s'agit d'une étude translationnelle qui a pour objectif de vérifier la pertinence de l'utilisation d'une technique d'échographie dans un contexte précis de choc hémorragique. Il n'existe pas de méthode alternative permettant d'atteindre cet objectif dans des conditions les plus proches possibles des cas cliniques.

(Réduire) Non seulement le nombre d'animaux sera réduit en utilisant des analyses statistiques se basant sur les résultats obtenus par chaque expérimentation pour calculer le nombre d'animal nécessaire le plus faible possible, mais un même animal permettra de tester notre hypothèse sur la pertinence de plusieurs indices échographiques. Enfin, les animaux de ce projet permettront en parallèle de former les médecins urgentistes à la réalisation de gestes indispensables à leur pratique professionnelle évitant ainsi la mise en place d'autres sessions de formation.

(Raffiner) Nous attacherons une importance majeure au raffinement des conditions d'hébergement et d'enrichissement pendant la période d'acclimatation d'une semaine. L'ensemble de la procédure sera réalisée sous anesthésie générale par des médecins urgentistes formés à l'évaluation de la profondeur de l'endormissement et de la douleur. Ainsi les points limites au cours de l'expérimentation qui ont été fixés sont une tachycardie >230 BPM/min et une pression artérielle moyenne > 180 mmHg. Dans tous les cas, aucun animal ne sera réveillé, la mise à mort étant réalisée sous anesthésie générale.

18704 Pour les deux espèces les pathologies bactériennes sont responsables de pertes économiques importantes en élevage de carpes et tilapias. Aucun vaccin n'est disponible et ces maladies sont plus ou moins maîtrisées par les antibiotiques.

Or l'intensification des élevages et l'usage des antibiotiques est responsable du développement de de résistance des bactéries qui impacte fortement la santé du poisson et de l'écosystème aquacole.

Ce projet a pour objectifs de :

- Promouvoir le recours à la prévention des maladies infectieuses et à l'amélioration des conditions d'élevage
- Poursuivre la recherche de traitements alternatifs aux antibiotiques
- Poursuivre les recherches, les études et le développement de méthodes relatives aux mesures de prévention sanitaire et zootechnique (solutions non médicamenteuses)

Au cours de ce projet, qui portera sur la carpe et le tilapia, plusieurs huiles essentielles ou poudres de plantes actives inscrites à la pharmacopée française et sénégalaise seront testées. Ces plantes ont été sélectionnées sur la base des données bibliographiques existantes. L'efficacité in-vivo de l'association plante/antibiotique (tétracyclines ou autre) après infection expérimentale du poisson par une souche modèle *Aeromonas hydrophila* résistante aux antibiotiques sera testée, ainsi que l'impact d'une alimentation enrichie en plante avant le challenge (c'est à dire l'infection expérimentale des individus, traités par la plante ou non, par la souche bactérienne choisie).

Ce projet suit au mieux possible les règles des 3R :

- Remplacement : ce projet donne une large place aux études in vitro en explorant les activités antimicrobiennes de ces huiles essentielles et poudres de plantes pour démontrer la modulation de la résistance aux antibiotiques de la bactérie modèle *Aeromonas hydrophila*.
- Raffinement : les poissons sont élevés en groupe pour éviter le stress, en condition de luminosité faible à l'écart d'activités humaines dérangementes (bruit, luminosité excessive, passage)
- Réduction : 3150 carpes et 1800 tilapias (soit un total de 4950 poissons) seront étudiés au cours de ce projet, ce qui est le nombre le plus petit possible permettant d'avoir des résultats significatifs.

18705 La greffe de peau ou transplantation cutanée est l'utilisation d'un morceau de peau pour recouvrir une plaie, soit dans un but de cicatrisation par le tissu apporté, soit comme pansement. Suivant l'origine du greffon on parle de prélèvement autologue (fait sur le receveur lui-même) ou de prélèvement hétérologue (fait sur une autre personne que le receveur). La xénogreffe désigne la transplantation d'un greffon où le donneur est d'une espèce biologique différente de celle du receveur. Elle s'oppose ainsi à l'allogreffe où le greffon vient de la même espèce que le receveur.

Les substituts cutanés ou dermes artificiels, sont des biomatériaux capables de remplacer une partie de la peau ou de permettre sa régénération, et constituent une alternative précieuse pour la gestion des plaies lorsque les thérapies standards sont un échec. Cependant, sélectionner le bon substitut n'est pas une décision thérapeutique aisée. Aujourd'hui, si les greffes autologues sont les greffes de première intention pour la couverture des plaies, elles se heurtent à l'écueil d'une disponibilité limitée de peau, en particulier dans la prise en charge des grandes brûlures et les procédures restent invasives et douloureuses. Des allogreffes et des xénogreffes peuvent pourvoir au remplacement temporaire de la peau, avant de laisser la place à une autogreffe. Subsiste évidemment les risques de rejet, douleurs et infection, et la formation de cicatrices.

Restaurer par exemple la fonction d'une main ou d'un pied gravement brûlé demeure un véritable challenge chirurgical. Le recouvrement d'une élasticité et d'une souplesse cutanée de qualité est indispensable pour obtenir un résultat fonctionnel et esthétique optimal. Les substituts dermiques ont été développés et sont utilisés dans cette indication depuis plusieurs années. Ce sont des matrices acellulaires constituées de fibres de collagène et d'élastine généralement d'origine bovine, pouvant donc induire un rejet chez l'Homme. Après mise en place du substitut dermique, une greffe de peau mince (épiderme) ou demi-épaisse (épiderme et partie du derme) autologue ou hétérologue est réalisée par-dessus, le substitut dermique devant favoriser la prise de la greffe ainsi réalisée.

Il est donc important de tester de nouveaux substituts dermiques biosynthétiques (biomimétiques) sur des modèles de plaies représentatifs chez l'animal qui pourront être utilisés par la suite chez l'Homme et ainsi permettre d'améliorer la régénération et la fonction de la peau, tout en évitant un éventuel rejet.

L'objectif de notre projet est donc d'évaluer 2 nouveaux substituts dermiques biosynthétiques en comparaison avec un substitut cutané du marché (Matriderm®), afin de sélectionner celui qui permettra de favoriser la régénération et la fonction du tissu cutané, tout en évitant un rejet, sur un modèle de plaie murin. Il nécessitera l'utilisation de 27 rats mâles Wistar de 10-12 semaines d'âge (275-300 g), rats avec un système immunitaire fonctionnel (dits immunocompétents) pour être le plus proche du modèle humain, et permettant ainsi d'évaluer la tolérance des substituts dermiques et la présence ou non de signes de rejet de la greffe autologue de peau par-dessus.

Les rats seront placés sous anesthésie gazeuse avant le rasage de la fourrure et le nettoyage de la peau du dos avec un antiseptique local (bétadine), puis une plaie cutanée de 25 mm de diamètre sera réalisée par excision cutanée complète sur le milieu du dos (Procédure expérimentale 1). Celle-ci sera suivie par la mise en place dans le lit de la plaie cutanée d'un des substituts dermiques à évaluer, avant la suture chirurgicale de la peau excisée par-dessus et la mise en place d'un pansement secondaire dit de couverture (Procédure expérimentale 2). Les régions greffées seront observées et photographiées 2 fois par semaine pendant 3 à 9 semaines lors de chaque change de pansement de couverture, après placement des rats sous anesthésie gazeuse, et une mesure de la perte insensible en eau, paramètre qui renseigne sur l'intégrité de la barrière cutanée, sera effectuée à l'aide d'une sonde appliquée sur la surface de la peau pendant 20 secondes (Tewamètre®) (Procédure expérimentale 3).

Les rats seront mis à mort par injection intrapéritonéale d'une surdose d'euthanasique sous anesthésie gazeuse à différents temps après réalisation de la greffe cutanée, 3, 6 et 9 semaines, avec 3 rats greffés prélevés pour chaque temps.

Un prélèvement de l'ensemble substitut dermique biosynthétique et peau greffés sera effectué pour la réalisation d'analyses biologiques (histologie et immunohistochimie) permettant d'évaluer le maintien et/ou les modifications des substituts dermiques biosynthétiques et la régénération du tissu cutané au cours du temps (prolifération cellulaire, réépithélialisation, revascularisation...).

Nous utiliserons le nombre minimum d'animaux nécessaire à la réalisation de ce projet mais permettant d'obtenir des résultats prédictifs et représentatifs (Réduction).

Les rats seront placés en cage individuelle (48 x 27 x 20 cm) pour éviter qu'ils ne s'arrachent entre eux le greffon cutané et le pansement secondaire de couverture, en cycle de lumière inversé pour observer leur comportement pendant leur phase active et ainsi respecter leur horloge biologique (chronobiologie), et des briques d'Aspen seront placées dans leur cage comme enrichissement pour assurer leur bien-être (Raffinement).

Les animaux seront observés quotidiennement tout au long de l'expérimentation, leur poids sera mesuré 2 fois par semaine à chaque renouvellement de pansement secondaire, et si une perte de poids supérieure à 15% entre 2 pesées ou supérieure à 20% par rapport au poids maximal est observée, ou si des signes d'infection de la plaie ou des modifications du comportement des animaux sont observés (cachexie, vocalises, convulsions...), ceux-ci seront mis à mort dans des conditions éthiques.

Ce projet sera réalisé sur des animaux vivants car il n'est pas possible d'utiliser des modèles in vitro ou ex vivo pour évaluer la tolérance et l'efficacité de substituts dermiques biosynthétiques sur des plaies cutanées chroniques (Remplacement).

18706 Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est classé comme le sixième cancer le plus fréquent et la troisième cause de décès par cancer.

Le développement du carcinome hépatocellulaire est étroitement lié à la présence de la maladie du foie gras non alcoolique appelée « stéato-hépatite non alcoolique » ou NASH en anglais. Cette

maladie est caractérisée par une inflammation chronique du foie conduisant à une mauvaise cicatrisation appelée fibrose dont le stade ultime est la cirrhose. :

Or, la réponse inflammatoire des cellules immunitaires est amplifiée par triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1).

L'inhibition de TREM-1 dans un modèle murin de NASH diminue l'inflammation du foie et restaure les capacités de « recyclage » cellulaire. Ces résultats sont confirmés chez les souris génétiquement invalidées pour le gène TREM-1. Néanmoins, les limites de ces modèles animaux de NASH sont l'absence d'évolution vers la cirrhose et le CHC.

Afin d'évaluer à terme l'inhibition de TREM-1 dans le CHC, il nous faut d'abord développer un modèle de NASH évoluant jusqu'au stade CHC. Le modèle de souris C57BL/6 traitées par streptozotocine et soumises à un régime riche en graisse a l'avantage d'induire une véritable NASH avec toutes les composantes évolutives : excès de graisse semaine 6 (S6) ; NASH avec fibrose sévère à S8-10 et CHC entre S16-S20. Ces CHC sont constants et sont très proches des CHC humains sur le plan moléculaire. Dans ce projet, l'objectif est de mettre au point ce modèle, d'en caractériser les évolutions par imagerie IRM et Scanner et d'en adapter la résolution de façon à disposer des outils de suivi dans les futurs projets.

1. Remplacement : Il n'existe aucune approche in vitro pour étudier l'évolution d'une pathologie inflammatoire multifactorielle comme la stéato-hépatite non alcoolique vers la fibrose sévère et le carcinome hépatocellulaire. Une étude chez un organisme vivant est indispensable.

2. Réduction : L'étude sera menée avec un nombre total de 71 souris jeunes adultes mâles et femelles, basé sur le calcul a priori du nombre de souris nécessaires tenant compte de la variabilité interindividuelle, ainsi que de l'effet du genre, sur l'évolution de la pathologie hépatique.

3. Raffinement : Dès leur réception, les animaux auront une période d'acclimatation d'une semaine pour s'adapter à leur nouvel environnement. Ils seront hébergés dans une animalerie dotée de tous les paramètres nécessaires (température, hygrométrie, filtration de l'air, ...) à leur bien-être. La NASH sera induite (procédure 1) par une injection sous-cutanée unique de streptozotocine associée à un régime riche en graisse. La streptozotocine est un antibiotique connu pour déclencher, si administrée à l'âge de 2 jours, une résistance à l'insuline ; ce désordre métabolique sera amplifié par le régime riche en graisse administré à partir de la 4^e semaine de vie, conduisant à la NASH. Les stades de la maladie seront évalués de manière non invasive par imagerie (procédures 2 et 3) Scanner avec injection de produits de contrastes et IRM.

4. Le point limite est basé sur l'observation clinique des animaux et l'identification d'une dénutrition sévère attestée par une perte de 25% du dernier poids de référence (C'est-à-dire le dernier poids stable ou à la hausse pendant une semaine). Des signes de mal-être définis au préalable par notre vétérinaire référent (isolement, yeux fermés, dos voûté, poils hérissés, immobilité, yeux et abdomen creux, perte des réflexes de fuite) conduiront à une prise en charge de type nursing (modification des enrichissements, facilitation d'accès à la nourriture).

5. En fin de protocole, une injection intrapéritonéale de bromodéoxyuridine (procédure 4, marqueur non toxique pour évaluer la prolifération des cellules hépatiques) sera réalisée 2 à 6 heures avant la mise à mort nécessaire pour les prélèvements d'organes et les analyses biochimiques et immunopathologiques.

18707 Les liposarcomes sont définis comme étant des tumeurs malignes rares se développant dans les tissus adipeux. C'est la raison pour laquelle les liposarcomes sont régulièrement confondus avec les lipomes, tumeurs bénignes provenant de la prolifération de cellules adipeuses. Les liposarcomes représentent environ 20% des sarcomes, avec près de cinq milles nouveaux cas par an en France. Des études ont démontré que des anomalies génétiques pourraient être à l'origine de certains liposarcomes. En effet, 90% des cas proviendraient d'une anomalie du chromosome 12 entraînant une augmentation des gènes impliqués dans le développement des cellules tumorales à savoir MDM2, CDK4 et HMGA2. Afin d'améliorer le diagnostic et la prise en charge de patients, notre

objectif est de développer une thérapie ciblant MDM2, et un acide aminé (la sérine), permettant une alternative moins lourde que la chirurgie et la radiothérapie.

Des tests précliniques menés sur des tissus tumoraux de patients ont démontré que les liposarcomes se nourrissent d'acides aminés comme la sérine. Ainsi, le blocage de cet acide aminé réduit la croissance de la tumeur et entraîne la mort des cellules cancéreuses.

Afin de confirmer l'efficacité de ces nouvelles thérapies, nous réaliserons des modèles de greffe de tumeur de patient sur la souris (appelé patient-derived tumor xenograft PDTX) dans lesquels un fragment tumoral provenant d'un patient est greffé dans les plus brefs délais chez des souris. Les PDTX reproduisent les caractéristiques phénotypiques des tumeurs dont elles proviennent et représentent donc mieux la maladie que les lignées cellulaires. L'efficacité anti-tumorale de diverses molécules sera ensuite testée sur ces modèles sur un total de 2102 souris soit environ 420 souris par an.

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

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

- Réduction : Les expériences sur les animaux ont été précédées de nombreuses expériences réalisées sur des lignées cellulaires, dont la culture 3D en sphéroïdes. Les sphéroïdes, qui se présentent en un regroupement de cellules en amas permettent de se rapprocher des caractéristiques des tumeurs, ce qui en fait un bon modèle pour tester de nouveaux traitements. Ces mises au point in vitro nous permettent de diminuer le nombre d'animaux à utiliser dans les expériences in vivo. Nous limitons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables. A cause des variabilités inter-animales et inter-groupes, un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables et non valides.

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

18708 Notre projet vise à développer de nouvelles approches thérapeutiques pour le diabète de type 2 (DT2). Le diabète de type 2 est caractérisé par une résistance à l'insuline et / ou une sécrétion anormale d'insuline par les cellules β pancréatiques. Lorsque l'action de l'insuline diminue, comme cela se produit lors de la prise de poids dans l'obésité, la fonction des cellules β augmente en compensation. Pour tenter de réguler cette maladie, de nombreuses études ont montré l'importance de l'activité physique et du contrôle de l'alimentation parallèlement à l'intervention pharmacologique pour traiter le DT2. Cependant, les effets d'exercices physiques «génériques» montrent des effets variables suivant les patients. Nos données préliminaires sur différentes souches de souris atteintes de DT2 ont confirmé une grande variabilité du profil métabolique musculaire suivant le fond génétique et les formes de DT2 (induite ou génétique). C'est donc dans ce contexte que nous souhaitons :

Evaluer les effets de différents exercices physiques personnalisés sur l'évolution pathologique du DT2.

Pour cela, l'étude utilisera un modèle de DT2 induite sur souris C57Bl6 par un régime riche en graisses (60% des Kcal). Ensuite, ces souris seront soumises à différents protocoles d'exercices de nage, de durée et d'intensité variable. Les effets in vivo de l'exercice physique seront suivis longitudinalement au niveau comportemental (comportement moteur) et physiologique (métabolisme énergétique, poids corporel et glycémie). Enfin, le niveau d'atteinte neuropathique sera analysée juste avant euthanasie. Les tissus cibles seront collectés et l'identification des mécanismes candidats qui pourraient être impliqués dans les effets bénéfiques de l'exercice physique sera réalisée grâce à des techniques de biologie moléculaire.

Ce projet a été conçu pour respecter au mieux la règle des 3R.

Concernant le remplacement, aucun modèle cellulaire ne peut répondre à de telles questions scientifiques. L'analyse des maladies humaines du système métabolique et l'évaluation des effets d'exercices physiques impliquent des relations complexes entre les différents tissus et organes impliqués (tissu musculaire, tissu nerveux, foie et tissus adipeux) et nécessite l'utilisation d'organismes vivants, mimant les maladies humaines et répondant aux stimuli de manière la plus proche possible de l'Homme.

Concernant la réduction, 32 souris seront utilisées pendant 6 mois pour répondre aux questions scientifiques posées. Ce nombre est basé sur la constitution de 3 groupes de 8 animaux diabétiques soumis à 3 types d'exercices différents et à 1 groupe de 8 animaux contrôles diabétiques sans exercice. Ce nombre permet le meilleur respect possible de la règle des 3R tout en permettant de tirer des conclusions statistiquement valides.

Enfin, concernant le raffinement, le confort des animaux sera amélioré par enrichissement de l'environnement (igloo, copeaux) et d'un suivi régulier du comportement en phase symptomatique, par l'utilisation de tableaux d'évaluation individuels. Les points limites ont été établis et adaptés à la pathologie et à la tranche d'âge des animaux. Un score de douleur trop élevé impliquera une euthanasie de l'animal avant la fin de l'étude.

Ce projet fondamental et préclinique doit permettre de découvrir de nouvelles approches potentiellement thérapeutiques et de permettre d'adapter la prise en charge clinique des patients atteints de diabète de type 2. Il favorisera le développement de protocoles de physiothérapie personnalisés à chaque patient (médecine personnalisée).

18709 Le virus de la rougeole (VR) est en forte réémergence en Europe ces dernières années avec plus de 20. 000 cas recensés en France depuis 2008, causant en moyenne près de 140 000 décès chaque année dans le monde. Ce virus est connu pour être l'un des virus humains les plus contagieux. Le VR cause une maladie infantile respiratoire qui peut être associée à l'infection du système nerveux central. Dans ce cas, des complications neurologiques très sévères peuvent survenir pour lesquelles aucun traitement n'est disponible. Lors d'études précédentes chez la souris transgénique, il a été démontré une très bonne efficacité de peptides capables d'inhiber l'entrée du virus dans les cellules cibles. Nous proposons dans ce projet d'aller plus loin vers le développement d'un nouveau traitement de l'infection à la rougeole. Notre hypothèse principale est que cette approche antivirale devrait être efficace chez le macaque qui est un modèle pertinent de l'infection humaine. Dans ce contexte, l'objectif de ce projet est de valider une nouvelle stratégie antivirale basée sur l'administration par nébulisation dans les voies respiratoires de peptides capables d'inhiber l'infection respiratoire et la dissémination virale. Cette approche présente une stratégie conceptuellement nouvelle pour protéger la population face à un risque d'infection par les virus respiratoires, incluant le virus de la rougeole. Le projet apportera ainsi des réponses en recherche fondamentale et en recherche appliquée. Toutes les étapes du projet sont basées sur des études effectuées et validées auparavant par des méthodes in vitro, ex vivo et in vivo chez la souris. La poursuite des tests chez le Primate Non Humain et plus précisément le macaque est nécessaire avant de procéder à l'essai clinique chez l'homme. Dans ce contexte, le macaque est un modèle de choix car : 1) c'est une espèce de référence pour les études réglementaires, 2) son modèle d'infection au virus de la rougeole est maîtrisé 2) avec l'homme, c'est l'espèce de l'ordre des primates la mieux documentée d'un point de vue génomique et immunologique, 3) le macaque a une anatomie pulmonaire, une physiologie respiratoire et des paramètres respiratoires proches de ceux de l'homme, 4) il permet de tester des thérapeutiques avec des produits et dispositifs pour inhalation qui seront directement utilisés chez l'homme.

2 groupes de 3 macaques non vaccinés contre la rougeole seront testés. Un premier groupe « contrôle » de 3 macaques (LOT 1) recevra des nébulisations de sérum physiologique. Un deuxième groupe « test » de 3 macaques (LOT 2) recevra des nébulisations de peptide.

Le plan expérimental établi répond à la règle des « 3R » : Les données obtenues seront indispensables pour étudier l'effet antiviral suite à la nébulisation des peptides inhibiteurs.

-Réduire : 3 animaux par groupe est le minimum nécessaire pour une preuve de l'efficacité du traitement par nébulisation chez le macaque.

-Remplacer : Des précédentes études ont été réalisées par des méthodes in vitro, ex vivo et in vivo chez la souris. Elles ont apporté la preuve de l'efficacité du traitement. Avant la réalisation d'étude clinique chez l'homme, il est nécessaire d'évaluer l'efficacité du traitement dans un modèle le plus proche de l'homme pouvant utiliser le système d'inhalation humain.

-Raffiner : Toutes les procédures sont optimisées pour n'induire aucune détresse ou douleur, ou le cas échéant les supprimer. Les animaux seront hébergés par groupe de 2 ou 3 en volières (enrichissement social) conformes aux normes en vigueur. Les animaux disposent dans leur hébergement de plateformes surélevées, de tunnels, de jouets et de piscine. L'alimentation couvre les besoins journaliers et est complétée par une distribution de friandises deux fois par jour. La nourriture pourra être cachée dans des jouets pour stimuler la recherche alimentaire. Les friandises distribuées sont différentes d'un jour à l'autre et le matin et le soir.

18710 La cachexie est un syndrome métabolique global dévastateur associé avec de nombreuses maladies chroniques, et en particulier avec le cancer. Les patients atteints de cachexie voient leurs réserves adipeuses et musculaires fondre drastiquement de manière irréversible entraînant une grande faiblesse générale. Il est estimé que 30% des patients cancéreux meurent de cachexie. Malgré l'enjeu de santé évident, il n'existe pour le moment ni de biomarqueur fiable, ni de traitement reconnu pour la cachexie. La découverte de nouveaux biomarqueurs et de nouveaux traitements est donc essentielle afin d'améliorer la survie des patients.

Notre laboratoire a récemment développé des modèles non-mammifères de cachexie induite par des tissus tumoraux chez la drosophile, qui a permis d'identifier et de valider fonctionnellement certains marqueurs et médiateurs nouveaux de la cachexie. Le but de ce projet est ainsi de valider en modèle mammifère les nouveaux bio-marqueurs potentiels et la relevance fonctionnelle des nouveaux médiateurs de cachexie identifiés chez la drosophile. Pour cela, nous proposons d'utiliser 2 modèles très bien décrits chez la souris par greffe syngénique par voie sous-cutanée de cellules murines tumorales (C26 côlon, KPC pancréas) induisant une cachexie rapide et reproductible. Pour l'ensemble du projet, nous avons prévu un nombre total de 416 souris sur une durée de 5 ans, regroupant la recherche de bio-marqueurs sanguins de cachexie et les essais précliniques visant à évaluer l'efficacité thérapeutique des traitements proposés.

Le projet sera développé en conformité avec la règle des 3R :

1- Remplacer : bien que des études pharmacologiques aient été menées in vitro sur des cellules adipocytaires et musculaires en culture, la cachexie est un syndrome global qui ne peut être étudiée de façon complète que sur des animaux entiers avec leur physiologie et les différents échanges inter-organes. Ainsi, afin de valider des biomarqueurs sanguins pertinents de ce syndrome et tester l'effet des antagonistes sur la physiologie et la reprogrammation métabolique systémique, nous ne pouvons pas nous passer de tests chez l'animal.

2- Réduire : le nombre d'animaux a été réduit au minimum après calcul de l'échantillonnage nécessaire afin de nous permettre de réaliser des études statistiques robustes. Des études préliminaires chez la drosophile ont permis de restreindre les hypothèses, et donc le nombre de souris dont nous aurons besoin.

3- Raffiner : afin de réduire la contrainte, la douleur et la souffrance des souris, elles sont maintenues en portoir ventilé dans des cages d'une superficie de 500 cm² avec en fond un mélange de litière et de copeaux de peuplier et un enrichissement du milieu (briques de peuplier, carrés de cellulose, ouate de cellulose et/ou tunnels en plastique). Le syndrome cachexique induisant un affaiblissement profond de l'organisme (perte de poids, asthénie, atrophie musculaire, etc.) lié à une dénutrition, une observation quotidienne et minutieuse des animaux sera assurée tout au long des expériences. Une alimentation riche sous forme gélatinée sera proposée aux animaux en vue de contrôler la perte de poids. Tout sera mis en œuvre pour assurer le bien-être des animaux.

18711 La maladie rénale chronique (MRC) est associée à une augmentation du risque de thrombose veineuse profonde et d'embolie pulmonaire. Cette maladie s'accompagne d'une accumulation de toxines dérivés du tryptophane et en particulier d'indoxyl sulfate (IS). Ces toxines provoquent une activation de la coagulation et par conséquent une augmentation du risque thrombose artérielle à l'origine de maladies cardiovasculaires. Ces phénomènes sont médiés par l'activation d'un récepteur nommé AhR (Aryl hydrocarbon Receptor). AhR est un facteur de transcription dont l'agoniste le plus connu est la dioxine. Il joue un rôle dans le métabolisme des médicaments mais aussi un rôle dans l'activation des plaquettes et dans l'inflammation.

L'effet de l'IS et de l'activation d'AhR sur la thrombose veineuse profonde pouvant provoquer des embolies pulmonaires n'a jamais été étudié in vivo dans des modèles murins de maladie rénale chronique. Notre objectif est donc d'étudier l'effet de la modulation d'AhR au cours de la MRC. Nous allons utiliser un modèle d'apport d'IS dans l'eau de boisson chez des souris sauvages et des souris invalidées pour AhR (KO AhR) afin de mimer l'accumulation de cette toxine. Nous utiliserons aussi des souris KO Col4A3 qui développent progressivement une insuffisance rénale, comme modèle de MRC. La thrombose veineuse profonde sera étudiée au niveau de la veine cave inférieure.

Les modèles animaux de maladie rénale chronique sont des outils importants pour l'étude des événements pathophysiologiques permettant ainsi des études translationnelles dont le but est d'améliorer la prise en charge des patients présentant une MRC. Ce projet nous permettra d'envisager différentes approches thérapeutiques qui pour certaines seront facilement transposables à l'homme.

Afin de respecter les règles d'éthique, la règle des 3R (« Réduction/ Raffinement/ Remplacement ») sera appliquée. Seules les expériences considérées comme absolument indispensables seront réalisées afin d'utiliser le moins d'animaux possibles (réduction) : rédaction d'un protocole expérimental avant toute expérimentation, utilisation des statistiques lors de la conception du protocole expérimental pour une estimation préalable du nombre d'animaux nécessaire et suffisant à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Les expérimentations seront optimisées dans l'optique de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'anxiété subie par les animaux afin d'obtenir plus d'informations pertinentes à moindre coût en terme de "mal être" animal (raffinement).

Les animaux seront hébergés par groupes de 4 à 6 individus et un enrichissement sera mis en place par l'ajout de matériaux de nidification de type « Nestlets » dans les cages.

Les animaux resteront sous surveillance journalière pendant la durée entière des procédures. L'état moribond de l'animal et la mort seront évités en tant que point limite. La douleur ou la détresse de l'animal constitueront des points limites et des mesures seront prises pour les soulager en se basant sur l'évaluation de cinq aspects de l'état d'un animal : variation du poids de l'animal, apparence physique externe, signes cliniques mesurables (ex: changements du rythme cardiaque, du rythme respiratoire et de la nature de ceux-ci), changement dans les comportements non provoqués, réponses comportementales aux stimuli externes. Au moyen d'une grille d'évaluation de la douleur, nous déterminerons un score et agirons en conséquence (analgésie voire arrêt de l'expérimentation par euthanasie de l'animal). Pour la striction partielle de la veine cave inférieure, les animaux seront opérés sous anesthésie générale (kétamine / xylazine) à raison d'une injection en intrapéritonéale. Pour soulager la douleur, de la buprénorphine sera injectée (sous cutanée) avant l'intervention chirurgicale. A la fin de la chirurgie, les souris seront laissées sur le tapis chauffant jusqu'à leur réveil, sous surveillance. Elles seront ensuite hébergées dans des cages individuelles jusqu'à l'arrêt de la procédure par euthanasie de l'animal, soit 24h après l'opération.

A chaque fois que cela sera possible, des modèles in vitro seront développés à la place des modèles in vivo (remplacement).

Nous utiliserons le nombre minimum d'animaux pour chaque groupe, nécessaire à la réalisation d'un test statistique non paramétrique, soit un total de 192 souris.

18712 Des variants pathogènes dans le gène KCNQ2 provoquent une épilepsie chez l'homme. Cette épilepsie se manifeste par de fréquentes crises survenant durant les tous premiers mois de vie

(avant l'âge de 3 mois). Cette activité épileptique est accompagnée d'une détérioration des fonctions cognitives et motrices. Il n'existe pas de traitement et les anti-épileptiques classiques sont inefficaces. Nous étudions une souris modèle knock-in porteuse d'un variant récurrent du gène KCNQ2 (T274M). La souris hétérozygote pour ce variant reproduit les caractéristiques principales de la maladie humaine comprenant les crises d'épilepsie. Les crises d'épilepsie sont spontanées et inopinées chez nos souris ce qui ne permet pas de les contrôler et donc de les étudier. Notre projet porte sur le déclenchement de crises d'épilepsie audiogènes chez 180 souris grâce à des fréquences ultrasoniques pour nous permettre d'étudier ces crises et de mieux comprendre la pathophysiologie de la maladie.

De plus, dans l'optique de réaliser des essais thérapeutiques grâce à des molécules pharmacologiques, la présence de crises d'épilepsie sera un critère manifeste d'efficacité de ces molécules.

Pour l'hébergement de ces souris modèles, les cages avec de la litière propre, enrichies avec un dôme en carton et du papier kraft, sont placées dans un environnement calme avec un maximum de 5 souris adultes par cage. L'eau et la nourriture sont fournies ad libitum. Nous surveillons quotidiennement nos animaux pour détecter tout comportement anormal. Nous veillons à respecter la règle des 3Rs.

Remplacement : afin d'étudier la physiopathologie des crises d'épilepsie, il nous est indispensable d'avoir recours à des animaux.

Réduction : une analyse de puissance statistique est réalisée en amont de chaque procédure afin de déterminer le nombre d'animaux strictement nécessaires pour répondre à la question posée.

Raffinement : un suivi régulier de l'état clinique des animaux sera réalisé afin de détecter tout début de souffrance (voir grille de score). Les signes cliniques modérés à sévères entraîneront la mise à mort de l'animal.

18713 L'utilisation de sang et/ou de sécrétions corporelles est routinière dans les laboratoires développeurs de vaccins d'utilisation vétérinaire et/ou de techniques de diagnostic de maladies animales. Ces produits organiques constituent des réactifs nécessaires pour l'évaluation de l'efficacité de vaccins, le développement de tests de diagnostic de maladies et l'établissement et/ou maintien de nouvelles lignées animales modèles pour les maladies animales étudiées. Dans ce cadre, ce projet vise à réaliser des prélèvements sanguins et des écouvillonnages tous types confondus utilisés de façon routinière dans un laboratoire de recherche et diagnostic de maladies animales.

Les espèces animales choisies pour ce projet sont les espèces cibles ou les modèles animaux des maladies étudiées.

Le nombre d'animaux utilisés sera adapté à l'activité (projets, nombre de personnels) et à la capacité d'hébergement de l'établissement utilisateur. Afin de respecter au mieux la règle des 3R, comme il n'est pas possible d'acheter directement du sang chez un fournisseur agréé, nous réduirons le nombre d'animaux au minimum. C'est pourquoi, un maximum de 250 souris, 25 rats et 10 lapins sera utilisé pour les prélèvements de routine pendant la durée de ce projet (5 ans).

Le volume et fréquence des prélèvements sanguins seront également le plus petit possible et dans les limites recommandées pour chaque espèce. Toutes les procédures seront adaptées à l'espèce animale choisie et réalisées par du personnel expérimenté.

Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de leur hébergement. Par exemple, pour réduire le stress, les souris et les rats seront hébergés en groupe et leur milieu enrichi par l'ajout de tunnel et/ou carré de cellulose ; celui des lapins sera enrichi par des bûchettes de bois à ronger (par exemple briquettes de peuplier).

18714 La sclérose en plaques est une maladie neurodégénérative auto-immune qui affecte le cerveau et la moelle épinière, les deux composantes du système nerveux central (SNC). Cette maladie neurodégénérative imprévisible est caractérisée par des poussées inflammatoires à la fois cause et conséquence d'une destruction de la substance blanche du SNC, et progressivement une

destruction de la matière grise. Ces lésions chroniques induites par une dysfonction du système immunitaire provoquent des perturbations motrices, sensibles et cognitives. A plus ou moins long terme, ces troubles progressent vers un handicap irréversible. Avec plus de 100000 cas en France et 5000 nouveaux cas chaque année, elle est la première cause de handicap neurologique non traumatique chez le jeune adulte (<https://solidarites-sante.gouv.fr/>).

La thérapie par photobiomodulation (PBM) représente une stratégie thérapeutique innovante dans le traitement des maladies neurodégénératives.

Elle consiste à utiliser la lumière proche infrarouge pour améliorer les fonctions cérébrales. Elle a montré des propriétés antalgiques, anti-inflammatoires et cicatrisantes. L'un des effets les plus reproductibles est la réduction de l'inflammation en particulier au niveau cérébral, sans que le mécanisme d'action soit précisément connu. Le présent projet souhaite évaluer l'efficacité de la PBM comme traitement localisé de l'inflammation dans un modèle d'Encephalomyélite Autoimmune Expérimentale (EAE), un modèle murin bien établi de sclérose en plaques. Ce projet est issu d'une collaboration de recherche entre i) une équipe académique, spécialisée dans l'imagerie intravitale dynamique des processus cellulaires dans les modèles de neuropathologies chez le rongeur et ii) une société, spécialisée dans le développement d'appareils de photothérapie permettant d'enrayer les cascades inflammatoires dans les maladies neurodégénératives. Ces appareils et leur protocole de stimulation sont évalués en phase 2 sur des cohortes de patients humains atteints de la maladie d'Alzheimer. Les travaux proposés ont pour objectif de définir -des paramètres de stimulation et -les fenêtres d'opportunité de traitement spécifiques à la pathologie -en investigant les effets de la photostimulation sur la dynamique et les interactions des composants cellulaires de la réponse inflammatoire dans un modèle murin préclinique de sclérose en plaque EAE. Cette étude tentera également de clarifier le mécanisme d'action cellulaire et systémique de la photobiomodulation pour faciliter l'optimisation des traitements cliniques.

Au total, un maximum de 600 souris transgéniques (C57/Bl6) âgées de 0 à 6 mois est prévu pour la globalité de l'étude. Celles-ci seront réparties en 30 groupes de 20 animaux. Un total de 7 procédures expérimentales seront réalisés dont 3 de classe sévère ce qui nous conduira à une effectuer une analyse rétrospective pour chacune d'entre elles. De plus, l'ensemble de ces procédures fera l'objet de deux demandes de dérogation, une concernant la mise à mort et une autre concernant l'hébergement des animaux.

Notre projet respectera la règle des 3 R (réduction, raffinement et remplacement):

-Réduction: Le principal avantage de ce projet au niveau de la réduction du nombre d'animaux d'expérimentation est l'utilisation d'un même animal pour plusieurs procédures expérimentales. En effet, la fenêtre spinale permet l'imagerie d'un même animal tout au long du protocole, ce qui réduit significativement le nombre d'animaux nécessaire. De plus, seulement le nombre minimal d'animaux nécessaires à l'obtention d'un résultat statistiquement significatif sera utilisé. Comme établi dans la communauté scientifique, une significativité statistique de 5% est recherchée. Afin de réduire le nombre d'animaux par groupes tout en maintenant cette significativité, le test non paramétrique U-Mann Whitney, dédié à l'évaluation de petits échantillons, sera utilisé. Dans nos cas, étant donné une incertitude de l'ordre de 20% pour le protocole d'imagerie, une incertitude de l'ordre de 10% pour l'induction de l'EAE et une perte d'environ 10% à cause des différents points limites, il nous faudrait théoriquement des groupes de 20 animaux pour des quantifications à 5% près.

- Raffinement: Il est tout d'abord important de préciser que toutes les mesures permettant d'améliorer les conditions de vie des animaux seront prises en compte. Pour le bien-être de l'animal, les souris seront hébergées de façon individuelle avec un enrichissement (copeaux de bois, dômes) avec un accès non-limité à la nourriture et l'eau, un cycle de 12h jour - 12h nuit, une température et une humidité contrôlées. Les animaux sont vérifiés tous les jours, par des personnes non-stressées dont la compétence dans le domaine de l'expérimentation et du bien-être animaux sont reconnus par les autorités compétentes. La chirurgie d'implantation de fenêtre spinale et le protocole d'EAE pouvant amener des difficultés de déplacement aux animaux, du gel sucré énergétique (SAFE) est mis à disposition au fond de la cage pendant la procédure, afin de s'assurer que l'animal a les apports énergétiques dont il a besoin. Les souris seront observées quotidiennement, en observant

tout changement dans leur comportement ou l'apparition de signes cliniques de mal-être (posture, prostration, difficultés à se déplacer et à s'alimenter, déshydratation, ataxie) en nous appuyant sur une grille d'évaluation de la douleur. Lorsque les souris présenteront une perte de poids supérieure ou égale à 20% du poids maximum de l'animal ou si des signes cliniques apparaissent, les animaux seront mis à mort sans délai. De plus, une anesthésie générale est mise en place avant toute expérimentation, chirurgie ou imagerie, afin de s'assurer de l'absence de stress ou douleur chez l'animal.

Aussi, la procédure thérapeutique de Photo Bio Modulation PBM envisagée pour cette étude est une procédure non invasive appliquée en clinique.

-Remplacement: Le protocole d'imagerie utilisé est la microscopie de fluorescence bi-photonique intravitale. Il est donc nécessaire d'étudier des animaux transgéniques (fond génétique: C57/Bl6) exprimant des marqueurs fluorescents. Or, la souris est actuellement le modèle mammifère qui offre le plus grand catalogue de sous populations cellulaires marquées en fluorescence. Nous avons donc choisi un modèle animal transgénique connu et caractérisé, ce qui évite de perdre de nombreux animaux en mise au point de protocole. Par ailleurs, le modèle expérimental EAE chez la souris permet de récapituler efficacement la pathologie humaine. C'est un modèle accepté et aux conséquences physiologiques bien connues de la sclérose en plaques. Enfin, les connaissances actuelles d'organisation de la moelle épinière chez la souris ainsi que de son comportement en font un modèle expérimental pré clinique de choix, dont les caractéristiques comportementales sont bien connues et permettent ainsi de mieux détecter toute douleur ou souffrance chez l'animal. Aucun remplacement n'est donc possible par des alternatives in vivo, in vitro ou in silico.

18715 La thérapie génique est une stratégie innovante de médecine moléculaire consistant à transférer un acide nucléique thérapeutique dans des cellules malades pour améliorer l'état clinique d'un patient. Pour véhiculer ce produit thérapeutique, les vecteurs viraux, et en particulier les vecteurs recombinants dérivés des virus adéno-associés (AAVr) constituent des outils de choix. Il a été montré qu'une seule injection avec un AAVr peut permettre une expression à long terme du gène thérapeutique transféré, aussi bien dans des modèles animaux que chez l'homme. Les vecteurs viraux dérivés de l'AAV sont en passe de devenir des produits thérapeutiques et plusieurs de ces vecteurs viennent d'obtenir récemment une autorisation de mise sur le marché. Néanmoins, malgré des succès récents, plusieurs facteurs majeurs limitant l'efficacité du transfert de gène in vivo à l'aide d'AAVr dans les essais cliniques proviennent de la large biodistribution des AAV après injection mais également de la réponse immunitaire dirigée contre la capsid du vecteur ou du transgène. Ces limites nécessitent d'injecter de fortes doses chez le patient, et concernant la réponse immunitaire cela peut engendrer la destruction des cellules transduites, annihilant de fait tout bénéfice de la thérapie génique. L'occurrence de cette réponse immune délétère s'explique par le fait que les hommes sont naturellement infectés au cours de leur vie par des virus AAV sauvages (virus qui ne sont par ailleurs à ce jour associés à aucune pathologie chez l'homme).

L'objectif de ce projet repose sur le potentiel de la chimie organique pour améliorer l'« activité spécifique » et l'« index thérapeutique » d'une particule AAV recombinante choisie. Ces améliorations, non explorées jusqu'à présent, vont être obtenues par l'emploi de ligands ayant des propriétés de ciblage, couplés à la capsid d'un AAV. Ces modifications chimiques accentueront le ciblage vers un organe ou un tissu spécifique, comme le foie, la rétine ou le muscle squelettique, ce qui en retour permettra une réduction de la quantité d'AAV à administrer au patient.

Au-delà de l'augmentation du tropisme cellulaire, ces capsides modifiées chimiquement pourraient également échapper en partie au moins à des facteurs naturellement neutralisants et donc diminuer l'effet de la réponse immunitaire.

Pour cela, les praticiens et concepteurs en recherche sur la cécité doivent acquérir les compétences nécessaires à la réalisation de leurs projets de recherche impliquant des animaux selon la Directive Européenne (arrêté du 1er février 2013 relatif à l'acquisition et à la validation des compétences des personnels des établissements utilisateurs, éleveurs et fournisseurs d'animaux utilisés à des fins

scientifiques). C'est dans ce cadre que nous souhaitons mettre au point les techniques d'injection sous rétinienne et intravitréenne sur le modèle souris.

Dans un premier temps, nous souhaitons pour cette mise au point tester des lots de vecteurs AAV encapsulant la GFP pour lesquels nous connaissons déjà les résultats. Nous pourrions effectuer un suivi longitudinal de l'état de la rétine, en effectuant des imageries du fond d'œil et des différentes couches de la rétine par Tomographie par cohérence optique (OCT). Ces imageries seront faites sous anesthésie générale maximum une fois par mois. Puis, 1 à 3 mois après l'injection, nous récupérerons les yeux lors de l'euthanasie des animaux, afin d'analyser l'état de la rétine et le niveau d'expression de la GFP.

Dans un second temps, nous souhaitons comparer différents sérotypes d'AAV modifiés chimiquement ou non (AAV2 et AAV8) par injection sous rétinienne ou intravitréenne.

Au vue des gestes réalisés il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par un autre modèle.

Ce projet se déroulera dans deux établissements utilisateurs (EU), afin d'éviter une déclaration double du nombre d'animaux, 30 souris sont déclarées dans cette demande d'autorisation de projet (DAP) de l'EU 2/2 et 558 souris sont déclarées dans la DAP de l'EU 1/2.

Le nombre de souris sera réduit au minimum nécessaire en fonction du nombre de formations à mener et de lots de vecteurs à tester. Avec le mouvement de personnels, nous aurions besoin de former de temps en temps d'autres personnels de recherche. Les animaux sont nés et élevés dans des élevages agréés.

L'application de la règle des 3R au cours de ce projet sera effectuée de la façon suivante :

1/ Remplacer :

Des premiers tests seront effectués sur différents types de cellules en culture pour évaluer l'effet de la modification chimique sur le vecteur. Cependant, les modèles in vitro ne peuvent s'approcher de la complexité des interactions entre le vecteur et l'environnement biologique in vivo et rendent donc difficile la reproductibilité de ces résultats in vivo. Il est également impossible de vérifier la biodistribution ou encore l'index thérapeutique de ces particules modifiées sur des cellules en culture. De plus, la rétine, structure complexe composée de multiples couches de neurones et cellules nourricières, ne peut être reconstituée parfaitement in vitro. L'utilisation de modèles animaux est donc indispensable pour étudier le transfert de gènes dans la rétine

2/ Réduire :

La détermination du nombre d'animaux a été réalisée par approche statistique et sur la base de l'expérience d'études similaires en thérapie génique des maladies de la vision.

3/ Raffiner :

Les études antérieures de notre équipe ont été faites sur d'autres modèles pour des études précliniques. Pour l'étude de certaines pathologies de la rétine et pour des études de recherches fondamentales nous serons amenés à travailler sur le modèle souris avant de pouvoir passer à une plus grosse espèce

Toutes les interventions sur animaux se feront sous anesthésie générale et locale renforcée si nécessaire par des compléments analgésiques et anti-inflammatoires appropriés, pour réduire la contrainte imposée aux animaux.

L'état de santé des animaux est surveillé tout au long des expériences afin d'éviter l'apparition éventuelle d'une souffrance. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum. Pour leur bien-être, les animaux sont hébergés à plusieurs par cage (dans la limite réglementaire) dans un milieu enrichi comprenant des frisottis de papier, buchettes de bois et l'enrichissement serait renforcé pas des tunnels ou dômes si un animal se retrouvait en hébergement seul. L'application de critères d'arrêts nous permettra d'intervenir immédiatement dès le moindre signe de souffrance en utilisant des traitements antalgiques appropriés ou de décider d'une euthanasie.

18716 Ce projet porte sur l'étude de la fibrose pulmonaire qui se caractérise par une modification de la structure du tissu pulmonaire qui devient plus rigide. Elle résulte de l'accumulation excessive de protéines comme le collagène et mène à des défauts de fonctionnement des poumons. Il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode permettant un diagnostic précoce et peu de traitements disponibles car les mécanismes menant à la fibrose sont peu connus.

Ce projet est donc construit avec un triple objectif: 1/ Mettre en place de nouveaux traceurs d'imagerie pour le diagnostic précoce non-invasif de la fibrose pulmonaire, 2/ évaluer l'action de ces traceurs pour le suivi de l'efficacité de traitements anti-fibrose et enfin 3/ évaluer les effets de nouveaux traitements. La fibrose pulmonaire sera induite chez la souris par administration (sous anesthésie) de bléomycine. Ce modèle entraîne une fibrose qui commence à se déclarer une semaine après l'injection (phase précoce) jusqu'à 4 semaines (phase tardive).

Dans une première étape, la faisabilité de l'imagerie de la fibrose pulmonaire avec 6 traceurs distincts sera démontrée par une étude préliminaire (et des validations in vitro) sur un petit nombre d'animaux atteints de fibrose (n=6 groupe).

Par la suite, la validation des traceurs se fera sur un plus grand nombre d'animaux (n=10 par groupe) à 2 stades de l'évolution de la fibrose ; un stade précoce (10 jours après injection de bléomycine) et un stade tardif (28 jours après injection de bléomycine). Cette première étape permettra ainsi d'identifier la pertinence de l'imagerie in vivo pour la détection de la fibrose pulmonaire suivie par imagerie comparé aux analyses classiques.

La seconde étape de ce projet permettra d'évaluer l'action des traceurs validés lors de la première étape pour le suivi de l'efficacité de deux composés anti-fibrose déjà existants (pirfenidone et nintedanib). Les animaux atteints de fibrose recevront les traitements et subiront des imageries répétées (1 par semaine) afin de suivre l'évolution de la fibrose comparé à des animaux non traités.

La troisième étape permettra d'évaluer l'efficacité de quatre nouveaux traitements distincts. Les animaux recevront de la bléomycine puis les différents traitements et subiront des imageries répétées (1 par semaine) afin d'évaluer leur efficacité comparé à un placebo.

Pour la totalité du projet 550 souris seront nécessaires.

La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R. Tout d'abord, en comparaison avec une étude classique qui nécessite la mise à mort des animaux à chaque point de temps examiné, l'imagerie est répétée à différents temps et permet de réduire le nombre d'animaux d'autant. De plus, le design choisi permettra d'éviter de multiplier les expérimentations identiques et de réaliser des validations successives. Le raffinement a été pris en compte : la totalité des procédures impliquant les animaux (induction de fibrose, imagerie) sera réalisée sous anesthésie suivie d'un réveil sous lampe chauffante pour réduire au maximum l'inconfort potentiel. L'étude de la structure pulmonaire rend la règle de remplacement difficilement applicable puisqu'il est nécessaire de l'étudier dans son environnement in vivo.

18717 L'angiogenèse est définie par la formation de vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. Ce mécanisme intervient directement dans la formation de tumeurs puisque ces vaisseaux vont permettre d'apporter les nutriments nécessaires à leur développement. Ainsi interférer avec ce processus de façon spécifique constitue une stratégie anticancéreuse pertinente.

Le poisson zèbre est un modèle d'étude pertinent de l'angiogenèse car il est transparent ce qui permet d'effectuer de l'imagerie de vaisseaux in vivo. De plus, la forte ressemblance des pathologies de cet animal avec les pathologies humaines rend ce modèle idéal pour la compréhension et le ciblage de différentes pathologies liées à l'angiogenèse comme le cancer et pathologies cardiovasculaires.

Dans le but de tester les peptides Elabela et Apeline (hormones naturellement produites par les cellules humaines) sur l'angiogenèse dans cette étude nous utiliserons une lignée de poisson zèbre disponible commercialement et qui est génétiquement modifiée afin de rendre les vaisseaux fluorescents. Dans le but de favoriser le bien-être et de minimiser le stress des poissons, les études seront réalisées dans des conditions d'élevage classiques dans une armoire d'aquarium qui

contrôle automatiquement la température de l'eau, son pH et son renouvellement. Les animaux seront nourris à la main 2 fois par jour (entre 9h-10h puis entre 16h/17h).

Durant ces études, nous étudierons l'effet de ces peptides sur la régénération vasculaire du poisson zèbre après une section d'une partie (1/3) de la nageoire caudale, la régénération induite permet l'activation de l'angiogenèse et son observation sans sacrifice de l'animal par simple observation en microscopie à fluorescence. La régénération sera étudiée dans 3 situations: 1-après injection des peptides, 2- après électroporation (technique qui consiste à appliquer un champ électrique sur les membranes cellulaires afin d'augmenter la perméabilité membranaire) de morpholinos, molécules inhibant l'expression de ces peptides exprimés par les cellules du poisson et 3- Lors d'hypoxie qui induit l'angiogenèse.

Lors des expérimentations une solution réduisant la douleur est utilisée avant l'acte expérimental et la durée des expériences est réduite à 10-15 minutes pour limiter le stress pour les poissons. Dans ces études nous avons veillé au respect de la règle des 3 « R » : - Aucun remplacement des poissons étudiés ne peut être effectué puisque les informations recherchées sur l'angiogenèse ne peuvent être fournies que par un modèle animal. Cependant, avant les expérimentations in vivo nous utilisons des lignées cellulaires pour déterminer la dose efficace et non toxique des molécules à tester. Ainsi nous nous limitons aux seules expériences absolument indispensables du projet. Dans ces expériences nous utiliserons les nageoires régénérées pour l'extraction d'ARN et de protéines avec des kits commerciaux pour étudier les gènes impliqués dans l'angiogenèse.

Pour ce qui concerne le nombre de poissons qui seront manipulés, nous utiliserons 10 poissons/expérience. Chaque expérience sera réalisée 5 fois ce qui constitue un compromis entre la démarche de réduction et les besoins statistiques pour les expériences utilisant les poissons pour l'extraction de l'ARN et l'extraction protéique des nageoires régénérées. Ces expériences vont nous permettre d'analyser l'expression des gènes impliqués dans l'angiogenèse induite par l'hypoxie et régénération et comment ces peptides contrôlent leur expression.

Ainsi pour l'expérience de régénération de la nageoire après injection de peptides, il faudra 450 poissons, pour la régénération après électroporation, il en faudra 200, et pour la régénération en hypoxie il en faudra 200, soit un total de 850 individus sur les 5 années du projet. Une évaluation du point limite sera utilisée pour le suivi quotidien du bien-être animal. Lors de chaque évaluation le comportement des animaux sera renseigné en se basant sur différents critères comme : la nage anormale, l'isolement anormal du poisson, et une prise alimentaire perturbée. L'aspect général du poisson est également pris en compte comme l'apparition de déformations. Si un de ces points limites est noté, l'animal sera euthanasié immédiatement en respectant les procédures réglementaires.

18718 L'analyse de bioimpédance ou bioelectrical impedance analysis (BIA) en anglais, est une analyse de la composition de tissus biologiques par la mesure de leur impédance électrique. La valeur de l'impédance électrique d'un tissu biologique ou bioimpédance est en partie liée à sa teneur en eau et donc à sa teneur en gras. Cette technique a été initialement développée pour des applications médicales, en particulier pour caractériser l'évolution de l'état de santé de patients pour certaines conditions ou pathologies métaboliques.

Dans le cadre de l'étude des poissons, la BIA est utilisée pour évaluer la condition des individus ou des populations sauvages. Cette technique a pour avantage d'être relativement simple à mettre en place, peu coûteuse et ne demande pas le sacrifice de l'animal. De nombreux travaux expérimentaux montrent que la BIA est une mesure intégrative susceptible de refléter un grand nombre de processus biologiques. Ces processus peuvent être à long terme tels que des variations de l'état nutritionnel ou reproductif, mais aussi à courte terme, par exemple les effets d'une variation de température corporelle ou de niveau d'activité physique. Il en résulte que l'exploitation de la mesure de bio-impédance dans un contexte d'écophysiologie et d'écologie des poissons requiert une meilleure compréhension, d'une part, des processus physiologiques qui peuvent influencer le signal et, d'autre part, des informations physiologiques que la mesure peut fournir. Des expérimentations sur des espèces modèles, en milieu contrôlé, sont nécessaires pour caractériser la variabilité de la mesure en termes d'intensité et de rapidité de réponse, en lien avec

les processus biologiques, afin de pouvoir interpréter le plus justement possible la signature de BIA dans l'espace et le temps. Cela devrait permettre de réaliser des innovations dans l'étude des populations sauvages, telles que la réalisation d'une marque électronique mesurant la bioimpédance in situ le long des trajectoires des grands poissons pélagiques en haute mer.

La présente demande concerne des procédures d'expérimentation sur deux espèces emblématiques en Méditerranée et importantes dans la pisciculture : la dorade royale *Sparus aurata* et le loup *Dicentrarchus labrax*. L'objectif est d'évaluer les effets de la température corporelle sur la bio-impédance du muscle squelettique, avec une comparaison des effets aigus (changements rapides) versus chroniques (acclimatation saisonnière). Le choix d'utiliser deux espèces est pour évaluer si les effets peuvent être spécifiques aux espèces.

Les protocoles suivent la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner):

- Remplacer: Ces études, qui impliquent la mesure de signaux bioélectriques in vivo, doivent être réalisés sur des animaux. Il n'existe pas de modèle électrique de poisson et encore moins de l'influence de son activité sur la bioimpédance

- Réduire: Ces expériences impliquent le placement d'électrodes sous-cutanées ; le nombre d'individus utilisé (n = 24 par espèce) est le minimum nécessaire afin de permettre des tests statistiques appropriés aux objectifs.

-Raffiner: Les protocoles d'expérimentation qui impliquent le placement sous cutané des électrodes en acier inoxydable (diamètre entre 0.2 et 0.6 mm), pour l'analyse de signaux bioélectriques in vivo, sont bien établis chez les poissons. L'objectif des protocoles est de limiter au minimum la souffrance et le stress des animaux, avec utilisation approprié d'anesthésie avec ventilation des branchies pendant le placement des électrodes, suivi par un temps de récupération de la chirurgie d'au moins 24h, avec protection des poissons de toute nuisance visuelle et sonore pendant la récupération et les expériences. Cela permet d'obtenir des mesures physiologiques valides et fiables, qui ne sont pas influencées par un état de souffrance, stress ou agitation de l'animal.

18719 L'obésité est un problème de santé mondial qui est associée à des maladies chroniques et sévères comme le diabète. La surcharge calorique fait partie des facteurs déclenchant le phénotype obèse, et plus particulièrement la surconsommation d'aliments riches en graisses et en sucres. L'une des stratégies les plus efficaces pour lutter contre l'obésité est la chirurgie bariatrique, car elle permet une perte de poids durable et la disparition du diabète. Les patients subissant ce type de chirurgie déclarent avoir une préférence diminuée pour les aliments appétissants. Toutefois, les mécanismes pouvant expliquer cette modification de préférence alimentaire n'ont pas encore été élucidés. Les acides biliaires sont aujourd'hui considérés comme des acteurs métaboliques importants qui participent non seulement à la digestion des aliments, mais aussi aux processus liés au contrôle du poids corporel, à la dépense énergétique et au contrôle du glucose, notamment en activant leur récepteur spécifique. De plus, des études chez le rongeur suggèrent qu'ils seraient impliqués dans la préférence alimentaire. Ainsi, nous cherchons à comprendre si l'activité de ce récepteur peut participer au contrôle du poids corporel par des mécanismes liés à la préférence alimentaire, mécanismes classiquement régulés au niveau du cerveau. Des données récentes ont montré que son activation dans le cerveau de souris obèses entraîne une perte de poids significative au fil du temps. Ces effets ont lieu au niveau de l'hypothalamus, puisque l'élimination de ce récepteur dans cette région entraîne une prise de poids significative. Dans ce projet nous souhaitons décortiquer l'implication de ce récepteur dans le comportement alimentaire, notamment sur la préférence des souris à consommer des aliments appétissants. Pour cette étude, nous allons utiliser des approches pharmacologiques : utilisation des sels biliaires ou de composés synthétiques injectés directement au niveau du cerveau ; et génétiques : suppression du récepteur au niveau de l'hypothalamus. Dans ces deux cas, il sera nécessaire de pratiquer une chirurgie afin de cibler des zones précises du cerveau, chirurgie dites en conditions stéréotaxiques. Nous regarderons quel est l'impact de la stimulation de ce récepteur ou sa suppression sur la préférence à consommer une nourriture riche en graisse. Pour cela, les animaux auront le choix entre une alimentation classique et de la nourriture riche en graisse.

Nous avons choisi la souris comme modèle, car sa physiologie est suffisamment proche de l'Homme pour obtenir des informations biologiques pertinentes et pouvant être transposées chez ce dernier. De plus, la génétique de la souris est étudiée depuis longtemps ce qui en fait un modèle de choix lorsque l'on veut étudier des organismes génétiquement modifiés.

Nous prévoyons d'utiliser un maximum de 168 souris mâles adultes sur une durée de 3 ans. La règle des 3R a été mise en place dans la conception de notre projet.

Remplacement : Comme nous étudions des phénomènes qui impliquent une communication bidirectionnelle entre le cerveau et le reste du corps, notamment dans le contexte du comportement alimentaire, aucun modèle in vitro ou in silico ne peut être envisagé.

Réduction : Une planification précise des expériences a été établie afin de réduire au maximum le nombre d'animaux inclus dans cette étude, tout en ayant des groupes suffisamment importants pour obtenir des données exploitables. Par ailleurs, les protocoles que nous utilisons sont en amélioration constante afin de réduire au maximum la quantité des souris utilisés.

Raffinement : Nous enrichissons le milieu et nous maintiendrons le contact olfactif, auditif et visuel, afin de diminuer l'impact de l'individualisation des animaux, individualisation nécessaire à nos expériences. Avant chaque expérience, les animaux sont manipulés afin de réduire le stress. Les chirurgies sont réalisées sous anesthésie générale, et en utilisant de façon systématiquement des analgésiques pour limiter toute douleur. Par ailleurs, des points limites suffisamment précoces sont définis afin de limiter toute souffrance tout au long de la vie de l'animal.

18720 La douleur chronique est la principale cause d'invalidité chez l'Homme, et est strictement liée à des troubles graves tels que la fatigue, l'anxiété, la dépression et les maladies cardiovasculaires (MCV). Des études jumelles montrent que ces comorbidités résultent de mécanismes de causalité communs. Le projet PainFACT, financé par l'UE et dont notre étude fait partie, s'efforcera d'élucider ces mécanismes liés à ces pathologies.

Un modèle souris pilote de douleur chronique d'ostéoarthrite associée à des perturbations métaboliques induisant des MCV sera exploré par imagerie par résonance magnétique (IRM). Cela nous permettra d'identifier de potentielles signatures de la connectivité du cerveau spécifiques à la douleur chronique et ses comorbidités chez la souris. En effet, l'IRM du cerveau représente actuellement la seule méthode permettant de cartographier l'architecture des réseaux cérébraux de manière non-invasive, permettant de donner des indications uniques sur les mécanismes sous-jacents de pathologies comorbides. Les souris modèles seront créées à partir d'une souche présentant une diversité génétique spécialement élevée. Ainsi, l'utilisation de cette souche permettra d'être au plus près des variabilités génétiques de la population humaine, chez laquelle les comorbidités étudiées apparaissent malgré la diversité génétiques. Dans ce même but, des souris mâles et femelles seront utilisées.

Afin d'obtenir des résultats significatifs, 2 groupes d'animaux modèles de MCV et présentant ou non une douleur chronique seront utilisés, composés de 75 mâles et 75 femelles chacun. 5 souris par groupe et par sexe seront de plus utilisées pour les optimisations de l'anesthésie et de l'analgésie utilisées lors de l'examen d'IRM, soit un total de 20 souris. Au total, nous utiliserons 320 animaux pour cette étude.

Pour atteindre les objectifs du projet, cinq techniques non-invasives seront utilisées au cours de l'examen d'IRM : nous réaliserons deux types d'images anatomiques pour évaluer les changements morphologiques ; de l'imagerie fonctionnelle de repos afin d'obtenir des informations sur les changements de fonctionnement du cerveau ; de l'imagerie du tenseur de diffusion permettant d'évaluer la direction de diffusion des molécules d'eau dans les tissus selon un modèle de tenseur afin de déterminer les modifications microstructurelles ; et enfin une imagerie angiographique afin de détecter les altérations du système vasculaire. A l'issue des examens IRMs, différents tissus et organes seront analysés dans le but de mettre en évidence la développement d'une athérosclérose.

-Réduire : Nous utiliserons 75 animaux par sexe par groupe, ces chiffres étant le minimum pour pouvoir faire des études statistiques fiables dans notre modèle créée à partir d'une souche présentant la particularité d'une diversité génétique importante.

-Raffiner : Les animaux seront hébergés en groupes sociaux de 4 à 5 animaux dans des cages enrichies avec un barreau à ronger, des papiers absorbants pour qu'ils puissent faire leur nid. Ils bénéficieront d'un suivi quotidien et une grille d'évaluation sera utilisée afin de détecter les animaux qui présenteraient des signes de souffrance, de mal-être, ou de douleur. L'établissement de points limites prédictifs permettra alors d'interrompre les procédures et de réduire ainsi la souffrance animale. Tous les examens IRM seront réalisés sous anesthésie générale.

-Remplacement : L'étude portant sur la douleur chronique et ses comorbidités dans un modèle préclinique, elle nécessite donc impérativement l'utilisation d'animaux.

18721 La fibrillation auriculaire (FA) est la forme la plus fréquente des troubles du rythme cardiaque touchant 1 à 2 % de la population mondiale. Son incidence augmentant avec l'âge, on estime que sa prévalence sera multipliée par 2,5 d'ici les 50 prochaines années du fait de l'allongement de la vie dans les pays industrialisés. Elle résulte d'une activité électrique chaotique et d'une perte de fonction du tissu atrial qui provoque une contraction asynchrone du cœur, et est associée à un risque accru d'accidents vasculaires cérébraux, d'infarctus du myocarde et d'insuffisance cardiaque. Les thérapies actuelles sont basées sur des traitements anti-arythmiques et anticoagulants et sur l'ablation par radiofréquence des zones arythmogènes. Cependant, une partie des patients ne répondent pas positivement aux agents pharmacologiques et lorsque la maladie est ancrée depuis un long moment l'efficacité de l'ablation radiofréquence diminue drastiquement. Des études précédentes sur l'étude de la fibrillation auriculaire ont permis d'identifier des altérations de la fonction mitochondriale et notamment du métabolisme du succinate (impliqué dans la respiration cellulaire). Par conséquent, dans ce projet nous souhaiterions étudier in-vivo la capacité à modifier le rythme cardiaque de ce métabolite.

L'objectif principal de cette étude consiste à évaluer si des rats traités avec du succinate sont plus sensibles que des rats contrôles (non-traités) à l'induction de la fibrillation auriculaire. Les premiers résultats obtenus ex-vivo sont très prometteurs, mais le remplacement des animaux est impossible pour ce type d'étude car l'hypothèse nécessite de pouvoir étudier les réponses physiologiques sur l'organisme entier. Les essais ex-vivo ont permis de réduire l'utilisation du nombre d'animaux.

Le nombre d'animaux sera également réduit au strict minimum afin d'obtenir des résultats fiables, 120 rats seront utilisés. Le nombre d'animaux indiqué ci-dessus correspond au nombre maximal d'animaux utilisé dans le cas où l'ensemble des procédures seraient réalisées et que la variabilité des résultats seraient très importantes. Nous avons donc indiqué le nombre d'animaux à utiliser dans la DAP en se positionnant dans les conditions les plus difficiles. Nos études préliminaires indiquent néanmoins que le phénotype recherché sera exprimé de façon significative et ainsi nous permettra de limiter grandement la durée de l'étude et par conséquent le nombre d'animaux qui seront utilisés.

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

- Les animaux sont hébergés dans des locaux agréés et bénéficient de soins quotidiens dispensés par du personnel compétent et soucieux du bien-être animal.

Les animaux sont hébergés en groupes sociaux ce qui leur permet d'exprimer des comportements naturels

- Ils disposent d'enrichissements adaptés (copeaux, tige de cellulose...)

- Des points limites précis sont surveillés, si l'animal présente un signe de souffrance, des mesures adaptées sont mises en place immédiatement (ajout d'analgésique, arrêt du traitement par exemple).

18722 Le trouble du spectre autistique (TSA) est une maladie neurodéveloppementale qui touche environ 1 enfant sur 70. Le TSA est caractérisé par des difficultés de communication et d'interactions sociales et par des altérations comportementales, telles que des activités répétitives, des centres d'intérêt restreints, ainsi que des anomalies de la régulation sensorielle de l'environnement. Ces symptômes ont des conséquences extrêmement négatives sur la vie quotidienne des personnes atteintes de TSA, entraînant des inégalités dans l'accès à l'éducation et à une vie professionnelle.

À ce jour, il n'existe aucun traitement ciblé pour améliorer les symptômes spécifiques observés chez les patients atteints de cette maladie. L'élucidation des nouvelles approches pharmacologiques nécessite d'abord une meilleure compréhension des mécanismes neurobiologiques sous-jacents à cette maladie.

Ce projet porte sur l'étude des altérations neurobiologiques sous-jacentes au comportement atypique chez les modèles murins de TSA. Les bénéfices attendus de notre projet de recherche sont une meilleure compréhension des altérations neuronales sous-jacentes à la TSA, et, à terme, l'identification de nouvelles stratégies thérapeutiques pour améliorer les symptômes de TSA. L'utilisation d'un modèle animal (souris transgénique) est indispensable à la réalisation de ce projet à fort impact clinique.

En accord avec le principe des 3Rs (réduction, raffinement, remplacement), nous avons réfléchi à notre projet de recherche de façon à réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés ainsi que la souffrance imposée par les procédures détaillées dans ce document. Réduction : Une conception expérimentale soignée garantira la reproductibilité des résultats et permettra, en combinaison avec une analyse statistique appropriée, une estimation de la taille minimum d'échantillon requise pour obtenir des résultats fiables. En outre, dans la mesure du possible, les données comportementales et physiologiques recueillies porteront sur les mêmes animaux, permettant une réduction du nombre d'effectifs totaux utilisés lors de la réalisation de ce projet. Raffinement : Les animaux seront hébergés dans une manière adaptée à leurs besoins et recevront une surveillance quotidienne et les soins adaptés. Tous les animaux seront logés en groupe avec du matériel de nidification et auront accès à de la nourriture et de l'eau sous forme liquide ou solide (gel). Tous les animaux seront en cycle jour-nuit pour ne pas perturber leur rythme circadien et ils seront habitués à la manipulation et aux procédures comportementales. Plusieurs raffinements spécifiques aux procédures seront également appliqués (utilisations des produits anesthésiques et analgésiques, définition des points limites précoces et mesures conservatoires, et soins adaptés). Remplacement : Le projet porte sur l'étude d'une maladie neuropsychiatrique, caractérisée principalement par les marqueurs comportementaux. Les expériences proposées dans cette étude nécessitent des circuits intacts et des mesures à la fois physiologiques et comportementaux. Un modèle animal est absolument nécessaire pour reproduire la complexité de ces interactions neuronales et ne peut pas être remplacé par les études *in vitro* ou *in silico*. Les études cliniques ne sont pas adaptées à notre objectif expérimental car il s'agit d'une population clinique fragile et car les approches invasives sont nécessaires pour répondre à notre question scientifique. Les circuits neuronaux sont bien conservés chez les différentes espèces de mammifères et sont donc susceptibles d'être fonctionnellement similaires chez les rongeurs et les humains. L'utilisation des modèles de plus faible sensibilité neuronale (tels que la mouche à vinaigre) n'est pas adaptée à notre projet, parce que cet organisme manque la structure cérébrale ciblée par notre étude. Cependant certaines études seront *a priori* effectuées *in vitro* afin d'évaluer la conséquence de l'application des molécules novatrices, avant leur administration *in vivo*. Nous avons estimé le nombre maximum d'animaux nécessaire à ce projet crucial à 544 animaux

18723 Le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) a une incidence d'environ 750 000 personnes par an dans l'Union européenne et un taux brut de mortalité d'environ 40 %. Une forme aiguë de SDRA est connue sous le nom de syndrome respiratoire aigu sévère, qui peut être induit par la Covid-19 (SARS-Cov-2). Cette pathologie se caractérise par une insuffisance respiratoire aiguë nécessitant une ventilation mécanique, souvent nécessaire pour réanimer des patients gravement malades. La ventilation mécanique aggrave les lésions pulmonaires sous-jacentes et contribue à la mortalité élevée des patients atteints de SDRA en provoquant une complication secondaire appelée lésion pulmonaire induite par la ventilation (VILI). Il est généralement admis que la VILI est due aux contraintes mécaniques importantes subies par les tissus pulmonaires ventilés mécaniquement. Certains patients développant une VILI souffrent d'un phénomène observé comme l'initiation de la réparation du tissu pulmonaire, avec un dépôt précoce (quelques heures environ) de collagène conduisant à une fibrose pulmonaire. La fibrose pulmonaire est une séquelle durable chez les survivants du SRAS-Cov-2 et peut entraîner une incapacité respiratoire.

L'intérêt scientifique de ce projet vise à mieux comprendre comment la ventilation mécanique déclenche la fibrose pulmonaire de manière précoce sur deux modèles expérimentaux de SDRA développés chez le rat. Afin d'explorer les effets de la ventilation mécanique sur ce modèle expérimental, nous appliquerons une technique d'imagerie avec une résolution spatiale inférieure à 10 µm pour étudier la micromécanique à l'échelle alvéolaire et permettre une mesure quantitative de la contrainte mécanique imposée au tissu pulmonaire. Le but de ce projet est de comparer deux modèles de SDRA chez le rat. L'un est causé par une ventilation mécanique avec des volumes et des pressions élevées. Le second est basé sur les effets secondaires indésirables d'un médicament anti-cancéreux : la bléomycine (BLM). Nous comparerons les effets de la ventilation mécanique sur ces deux modèles de SDRA chez le rat. Les connaissances acquises dans le cadre de cette expérience sont importantes pour le patient car elles permettront de mieux comprendre comment la ventilation mécanique des patients atteints de SDRA en réanimation peut conduire à une fibrose pulmonaire afin de proposer des solutions ou des traitements visant à prévenir l'apparition de la maladie pulmonaire.

Toutes les mesures nécessaires seront prises pour réduire la souffrance des animaux, notamment en préservant des conditions optimales d'hébergement (température, lumière, densité de population, alimentation), en surveillant la santé des animaux tout au long de l'expérience afin d'intervenir au moindre signe de souffrance, en instaurant une sédation avant l'induction de l'anesthésie générale et une analgésie efficace. Une estimation formelle du nombre d'animaux n'est pas possible, car il n'existe dans la documentation aucune donnée de l'utilisation de techniques de tomodensitométrie à résolution temporelle (4DCT) dans ce modèle. Sur la base de nos données IRM, nous avons obtenu une puissance statistique satisfaisante avec 10 rats. Sur la base de ces données, un minimum de 10 rats dans chaque groupe sera nécessaire, soit un total de 36 animaux pour l'ensemble de l'étude. Le rat est l'un des modèles de référence de l'atteinte pulmonaire aiguë (SDRA). De plus, les dimensions thoraciques du rat sont parfaitement adaptées à la technique d'imagerie utilisée ici. Il existe des points limites pour mettre fin à la procédure, qui comprennent des changements de perte de poids, des changements de comportement et des changements de mobilité réduite. Tous les animaux seront euthanasiés par surdose d'anesthésiant à la fin de l'expérience d'imagerie.

Les chercheurs de cette étude sont guidés par les principes des « trois R » (Réduire, Raffiner, Remplacer) lorsqu'ils abordent l'expérimentation animale. Bien que la portée de notre recherche ne nous permette pas de remplacer les expériences sur les animaux, nous nous efforçons de réduire le nombre de rats utilisés et d'affiner nos procédures pour minimiser la souffrance des animaux (Réduire).

Toutes les mesures possibles seront prises pour prévenir et réduire la souffrance, l'anxiété et la douleur des animaux, en maintenant des conditions d'hébergement optimales (température, lumière, densité de population, nourriture et eau), en administrant une sédation appropriée avant une anesthésie générale profonde en vue d'une procédure douloureuse (Raffiner). Les rats sont inspectés à leur arrivée et doivent être acclimatés pendant au moins une semaine avant le début de l'essai. Les rats auront un accès libre à la nourriture, à l'eau ainsi qu'à tous les objets mis à disposition dans la cage tout au long de l'expérience.

18724 Le projet vise à évaluer en laboratoire l'innocuité et/ou l'efficacité de vaccins vétérinaires vivants ou inactivés destinés à l'animal concerné (bovins, ovins, caprins, porcins, équins, lapins, volailles ou chien) en répondant aux prescriptions de la réglementation européenne (European Medicines Agency, VICH GL44) et de la pharmacopée européenne (04/2005:50206 et 04/2005:50207) dans le cadre réglementaire du développement des dits vaccins.

Le projet répondant à des contraintes réglementaires, il n'y a pas d'alternative à l'utilisation d'animaux de l'espèce de destination des médicaments vétérinaires immunologiques.

Le nombre d'animaux utilisé est fonction de l'espèce cible ainsi que du vaccin étudié. La réglementation fixe un minimum de 8 animaux adaptable en fonction du vaccin ; le nombre d'animaux est défini de façon à ce que le projet puisse permettre une évaluation correcte de la tolérance au vaccin ; en pratique le nombre d'animaux peut être augmenté à 15 par groupe. Le

nombre de groupes dépend du nombre de lots de vaccins testés, soit pour 2 à 5 groupes, de 16 à 75 animaux par étude. Considérant que le nombre d'études envisagées par an peut-être de 2, nous tablons sur un nombre 'enveloppe' de 600 animaux maximum sur la période de 5 ans.

Application des 3Rs :

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

. réduction : Le nombre d'animaux utilisé sera optimisé et calculé de façon à ce que les effets attendus puissent être détectés avec un niveau de significativité adéquat.

. raffinement : Les conditions d'hébergement des animaux seront adaptées aux besoins physiologiques de ces derniers et leur permettront d'exprimer le plus possible leur gamme normale de comportements. La contention des animaux visera à limiter au maximum le stress des animaux. Le bien-être des animaux sera évalué quotidiennement par le personnel en charge des animaux: animaliers et vétérinaires.

18725 Le but de ce projet est d'évaluer des nouvelles molécules, i. e. dérivés de benzylidene guanidine, dans le traitement de la sclérose latérale amyotrophique (SLA). La SLA est une maladie neurodégénérative dont les patients atteints meurent en quelques années après le diagnostic par paralysie des muscles respiratoires. Il n'existe pas de traitement curatif à ce jour, seulement une prise en charge palliative. L'idée est de tester différents médicaments pour soigner les patients et leur offrir des nouvelles possibilités de traitement.

Cette étude sera réalisée chez des souris qui présentent une mutation similaire à celle que l'on retrouve chez les patients au niveau du gène SOD. . Nous allons utiliser ces souris car nous avons une grande expérience avec ce modèle animal. Une des raisons du développement de la SLA est l'accumulation anormale de la protéine SOD. Les traitements que nous utiliserons (4 traitements différents) seront administrés par gavage quotidien pendant 2 mois. Ils ont pour but de diminuer cette accumulation. Dans le but d'évaluer l'efficacité des traitements, les souris passeront des tests moteurs définis et pour lesquelles nous savons les déficits observés en condition sans traitement. Nous nous attendons à voir un retard dans l'apparition des troubles moteurs et une diminution de l'accumulation de la protéine SOD.

Dans la perspective du respect de l'approche des 3 R, nous avons réduit le nombre de souris utilisées. Nous proposons d'utiliser un maximum de 60 souris. Le développement de nouveaux traitements pharmacologiques pourrait permettre de proposer des nouvelles solutions aux patients.

- Remplacer : La modélisation de la SLA nécessite la présence d'un réseau nerveux complet (terminaisons nerveuses, nerfs, moelle épinière et cerveau), il n'est pas possible de remplacer le modèle murin par des modèles in silico ou in vitro. Nous allons réaliser une étude comportementale longitudinale de ces souris pour évaluer la coordination motrice.

- Réduire : Grâce à une connaissance du modèle associée à la puissance du test statistique utilisé, nous considérons que 10-12 animaux par groupe expérimental sont suffisant pour observer ou non un effet significatif. De plus, l'utilisation d'animaux consanguin limite la variabilité phénotypique.

- Raffiner : Les animaux sont maintenus en groupe social dans un environnement enrichi (nid, matériel à ronger). Nous avons défini des points limites clairs nous permettant d'intervenir de manière adéquate en cas de souffrance de l'animal.

18726 La maladie de Crohn et la rectocolique hémorragique sont des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) au cours desquelles se succèdent des épisodes aigus et chroniques pouvant entraîner la survenue du cancer colorectal. Elles n'ont à ce jour aucun traitement curatif et les traitements proposés visent surtout à améliorer le bien-être du patient. De plus, le traitement le plus répandu, basé sur l'utilisation des corticoïdes, ne peut pas être utilisé chez l'enfant. Il est donc important de développer de nouveaux traitements plus spécifiques, qui pourraient à la fois traiter les épisodes aigus et chroniques de la maladie.

Les MICI sont causées par une dérégulation du système immunitaire envers les bactéries intestinales. L'inflammation peut être due à de nombreux facteurs environnementaux parmi lesquels le stress, via la sécrétion de molécules telles que les catécholamines et l'activation de récepteurs (a et b-adrénergiques).

Après avoir démontré in vitro l'efficacité de molécules stimulant les récepteurs b-adrénergiques, il nous faut maintenant les tester dans des modèles précliniques mimant les MICI. Nous avons choisi un modèle d'inflammation intestinale chronique en utilisant 2 modèles murins : des souris C57BL/6 dans lesquelles le gène Muc2 est absent (C57BL/6 Muc2^{-/-}) et génère cette inflammation ou des souris C57BL/6 infectées avec la bactérie *Citrobacter rodentium*. Nous étudierons dans un premier temps l'effet de molécules seules. Dans un second temps, afin d'améliorer la solubilité de ces molécules et cibler spécifiquement les cellules immunitaires, nous souhaitons étudier l'impact de formulations basées sur l'utilisation de lipoprotéines dans lesquelles elles seront intégrées.

Nous mettrons en place des mesures pour appliquer la règle des 3R pour ces protocoles expérimentaux.

Remplacement : les travaux in vitro ont déjà démontré l'effet des molécules testées sur la réponse anti-inflammatoire. Il nous faut maintenant démontrer que ces molécules peuvent réduire l'inflammation intestinale, obligeant à utiliser des animaux dans lesquels nous pouvons avoir ou induire cette inflammation. Raffinement : le bien-être des animaux sera évalué quotidiennement, une supplémentation en nourriture gélatinée sera apportée si besoin, les souris seront hébergées en groupe et le milieu aura un enrichissement structurel. A partir du début de l'expérimentation, toutes les souris seront surveillées attentivement et pendant toute la durée de l'étude. L'utilisation d'une grille de score clinique nous permettra d'avoir une vision globale de leur état de santé, et de prendre les mesures nécessaires pour atténuer toute souffrance ou angoisse. Si les points limites que nous avons établis sont atteints, les souris seront mises à mort selon l'une des méthodes acceptées par la législation.

Réduction : Nous évaluons à 215 le nombre total d'animaux nécessaire à l'étude sur une période de 3 ans, ce qui correspond au nombre minimal permettant d'obtenir une étude statistique valable avec les tests adaptés à cette étude.

Les résultats obtenus pourraient contribuer au développement d'une approche thérapeutique visant à améliorer la prise en charge des patients atteints de MICI.

18727 Le porc est une espèce animale utilisée dans la formation biomédicale lorsqu'il n'existe pas d'alternative afin de permettre aux chirurgiens d'améliorer ou d'acquérir un geste technique avant de l'utiliser chez les patients en particulier lorsque le matériel n'existe pas encore sur le marché. Outre les aspects théoriques cette formation propose l'apprentissage des gestes techniques clefs d'un nouveau dispositif chirurgical et des actions correctives éventuelles sur animal anesthésié après simulation préalable hors animal permettant la prise en main du matériel. Cette simulation préalable permettra d'affiner le geste mais ne pourra pas palier aux mises en situations réelles.

Aujourd'hui au bloc opératoire, pour réaliser une hémostase lors d'une chirurgie ouverte, c'est-à-dire prévenir et arrêter les saignements, le chirurgien a recours à des bistouris électriques. On parle alors d'électrochirurgie. Aujourd'hui, les bistouris électriques conventionnels dédiés à l'hémostase sont basés sur deux principales technologies électriques : monopolaire et bipolaire. Le bistouri monopolaire permet de sectionner les tissus et de coaguler. En revanche, le courant passe à travers le corps du patient, entre la pointe du bistouri et une plaque positionnée sous le patient. Les risques associés sont nombreux et peuvent aller jusqu'au décès du patient, et les recommandations d'usage sont très complexes. Avec le bistouri bipolaire (sorte de pince), le courant circule uniquement entre les deux mors de la pince, mais il ne fait que coaguler. Il ne peut pas couper les tissus.

Fort de ces constats, un nouveau dispositif appelé TOM breveté à l'international (Tripolar Open Multifonctional) a été développé par la société Magnitude Surgical. Cette pince est dédiée à l'hémostase, avec l'objectif de remplacer avec un seul instrument les deux technologies actuellement utilisées par les chirurgiens, en cumulant les avantages des deux, mais sans leurs

inconvenients respectifs. Cet instrument permet de sectionner ET de coaguler en même temps. Il permet également une meilleure précision et performance, plus de sécurité en simplifiant son usage (meilleure intuitivité) afin d'éviter les nombreuses complications et risques d'incidents qui sont constatés avec les bistouris électriques classiques. TOM est également un procédé respectueux de l'environnement puisque, contrairement aux dispositifs actuels qui sont jetés après chaque utilisation (y compris les cordons électriques et les prises), la pince est réutilisable 100 fois, et seule l'électrode-scalpel intégrée au bout de la pince est à usage unique. Ce dispositif n'a encore jamais été utilisé chez des patients humains.

Cette formation a pour objectif de donner les moyens aux chirurgiens d'améliorer le raffinement des procédures avant d'utiliser ce nouvel outil pour la première fois chez des patients. Cette formation permettra au chirurgien de se familiariser avec un instrument plus sécuritaire à la fois pour les chirurgiens et pour les patients, plus efficace, et plus simple à utiliser. Les chirurgiens pourront ensuite utiliser ce matériel sur leurs patients et former leurs collègues dans les blocs opératoires des hôpitaux où ils travaillent ce qui permettra de limiter les formations sur animaux pour ce nouvel outil. La formation est composée d'une partie théorique, puis d'une partie de simulation sur blancs de poulet avant de passer sur l'animal vivant.

Les procédures chirurgicales concernées par cette formation sont : l'incision de la peau puis la dissection des tissus mous, la squellettisation de l'artère mésentérique, les premières étapes de cholectomie gauche, la cholecystectomie et les hépatectomies.

REMPACEMENT : des travaux sur pièces anatomiques et sur objets inertes sont effectués avant cette formation. Par la suite, la formation sur animal vivant reste nécessaire pour garantir la maîtrise du geste avant le passage à l'homme

RAFFINEMENT : ces procédures sont réalisées sous anesthésie générale avec une couverture analgésique même si l'animal n'est pas réveillé.

REDUCTION : Afin de réduire le nombre d'animaux, un à deux porcs seront utilisés par la formation. 10 porcs sur 5 ans sont prévus au total pour ces formations. L'animal sera opéré dans les mêmes conditions que lors d'une chirurgie humaine (anesthésie gazeuse, prise en charge de la douleur, stérilité). La dépouille sera congelée et servira ensuite lors d'autres formations sur cadavre mises en place au sein de la structure afin de réduire d'autant le nombre d'animaux utilisés au cours des formations en général.

18728 La génération de nouveaux modèles de souris génétiquement modifiées par techniques de transgénèse (insertion d'un gène exogène dans des embryons avant implantation dans l'utérus) portant une ou plusieurs modifications génétiques est extrêmement importante en recherche fondamentale et biomédicale. En effet, ces nouvelles lignées de souris peuvent devenir des modèles de choix dans des recherches spécialisées, des modèles de maladies humaines ou de validation de cibles thérapeutiques.

Les lignées transgéniques obtenues par transgénèse « classique » (additive, aléatoire) portent un caractère supplémentaire par addition d'un gène exogène. Les lignées transgéniques obtenues par transgénèse ciblée seront soit déficientes pour un gène (KO) soit incorporeront un nouveau gène ou une modification spécifique (KI), toujours dans un endroit déterminé (locus endogène). Bien qu'il existe actuellement plusieurs milliers de ces lignées de souris modifiées génétiquement, la découverte de nouveaux gènes, nouveaux promoteurs, nouvelles régions régulatrices ouvre chaque jour la possibilité de génération de nouvelles souris transgéniques comme un outil puissant en recherche fondamentale et appliquée.

Ce projet concerne la génération de nouveaux modèles de souris génétiquement modifiées par techniques de transgénèse pour répondre aux besoins des projets de recherche qui y ont recours. Le recours au modèle animal constitue souvent une étape incontournable après des expériences in vitro qui ont besoin de vérification sur l'organisme entier (présentant en particulier toutes les voies de régulation fonctionnelles).

Les techniques de transgénèse sont basées sur la microinjection d'embryons au stade préimplantatoire (< 4 jours après fécondation) de différents types de « transgènes » ou de cellules souches embryonnaires (cellules ES) modifiées.

- La première étape pour aboutir à un projet de transgénèse consiste à avoir un grand nombre d'embryons à modifier. C'est pourquoi nous utilisons la procédure de superovulation de femelles prépubères (Procédure 1: traitement hormonal des femelles donneuses avec deux hormones avant l'accouplement avec les mâles reproducteurs) afin d'augmenter le nombre d'ovocytes produits naturellement. La superovulation permet donc de réduire le nombre de femelles nécessaire pour la création d'une lignée de souris transgéniques. Les femelles superovulées sont aussi surveillées après le traitement et jusqu'au prélèvement des embryons le jour correspondant en fonction du stade de l'embryon.

- Les embryons fertilisés obtenus après superovulation le jour J sont ensuite micromanipulés afin de les modifier. Cette modification se fait principalement par microinjection, mais pour certains projets est aussi possible par électroporation des embryons avec le transgène. Etant donné que la survie des embryons après électroporation est plus importante comparée à la microinjection, l'utilisation de cette nouvelle technique, dans les cas où c'est possible, permet aussi réduire à son tour le nombre de femelles donneuses nécessaires pour les expériences de transgénèse.

- Après microinjection/électroporation, les embryons sont réimplantés (Procédure 2) moyennant une petite intervention chirurgicale chez des souris receveuses anesthésiées, utilisant aussi un analgésique afin de minimiser la douleur. Ces souris femelles receveuses (femelles adultes préparées pour la gestation) permettront le développement à terme des embryons génétiquement modifiés.

Les souris femelles opérées seront suivies juste après réimplantation (placement sur plaque chauffante, distribution dans les cages en groupes de 3 maximum) et aussi leur bonne cicatrisation sera surveillée chaque jour pendant au moins les 5 premiers jours après-chirurgie. L'état de gestation sera surveillé aussi régulièrement et, une fois la gestation confirmée (généralement 13-14 jours post-opération), chaque femelle sera replacée seule dans une nouvelle cage avec 2-3 bâtons de coton (enrichissement) afin qu'elle puisse préparer son nid. La femelle gestante ne sera plus perturbée dès ce moment en attente de la mise-bas.

- Les souriceaux (mâles et femelles) nés de ces mères-porteuses, après identification par phalangectomie (c'est-à-dire par ablation d'une phalange) avant 8 jours (Procédure 3), seront analysés très rapidement (avant 14 jours) afin d'identifier les individus qui auront incorporé la modification désirée (transgéniques).

- Il est très peu probable que ces animaux présentent un phénotype dommageable (c'est-à-dire un caractère qui altère gravement l'état général de l'animal). Toutefois, nous surveillerons attentivement le développement de tous les animaux transgéniques pour détecter précocement toute anomalie qui pourrait nécessiter des soins particuliers. Si des signes de détresse se manifesteraient (perte de poids > 15%, signes cliniques, ébouriffement du poil, problèmes comportementaux et d'activité, manque de toilettage etc.) et persistaient au-delà de 24H, les animaux seraient mis à mort.

Lors de ce projet, nous créerons 3 à 5 nouvelles lignées pour chacune des 15 à 25 nouvelles modifications génétiques qui seront générées chaque année.

Sur les 5 ans du projet, nous prévoyons l'utilisation au maximum d'un total de 26500 souris, dans 3 procédures de sévérité légère (1-superovulation, 2-chirurgie de réimplantation, 3-identification des animaux).

Les 3 procédures expérimentales ont été optimisées pour réduire le nombre d'animaux utilisés et réduire aussi l'impact négatif des gestes sur le bien-être des animaux. Nous aurons en particulier recours à des antalgiques pour réduire l'éventuelle douleur post-opératoire dans la procédure 2.

Au total, ce projet permettra la création de nouvelles lignées qui seront utiles à la recherche fondamentale et biomédicale.

18729 Un quart de la population française est âgée de plus de 60 ans et les prévisions suggèrent que cette tranche d'âge pourrait représenter plus d'1/3 de la population en 2040. L'âge est un des principaux facteurs de risque d'apparition des pathologies neurodégénératives du SNC et en particulier de la maladie d'Alzheimer. Cette dernière se caractérise par une perte des neurones dans certaines zones du cerveau et par la présence de lésions microscopiques (accumulation de protéine tau). Les neurones du cerveau ne sont pas les seuls à dégénérer avec l'âge et nous savons désormais que les neurones qui peuplent l'intestin (le système nerveux entérique) sont aussi affectés par le vieillissement. Le système nerveux entérique couvre l'ensemble du tube digestif, du tiers inférieur de l'œsophage au rectum et est parfois appelé second cerveau en raison de ses similitudes avec le cerveau. Il permet un bon fonctionnement du tube digestif en assurant la motricité digestive et la régulation de l'absorption des nutriments. Avec l'âge, les neurones du SNE se raréfient et cette perte neuronale s'accompagne de troubles digestifs au premier plan desquels la constipation et les troubles de la défécation. Toutefois, les mécanismes moléculaires à l'origine de cette neurodégénérescence entérique ne sont pas connus et il est très difficile de faire des corrélations in-vitro/ex vivo/atteinte fonctionnelle chez l'homme. Nous pensons que la protéine tau qui est impliquée dans la neurodégénérescence du cerveau est aussi impliquée dans celle du système nerveux entérique et dans les troubles digestifs associés à l'âge. Nous souhaitons donc étudier les effets de l'âge sur les fonctions digestives des souris et sur le niveau d'expression de la protéine tau dans le tube digestif. Pour cela, nous utiliserons des souris d'âges différents qui ont été hébergées dans les mêmes conditions.

Ce projet sera réalisé en tenant compte du principe des 3R (Réduire, Raffiner et Remplacer). Le nombre de souris a été réduit au minimum possible tout en permettant une analyse statistique fiable (Réduire). Afin de limiter toutes sources d'angoisse et de souffrance, la réalisation de certains gestes (ex : temps de transit colique distal) sera effectuée sous anesthésie générale ; les souris seront conservées dans des cages de taille suffisante, et avec un accès libre à l'eau et à la nourriture. Le bien-être des souris sera surveillé tout au long de l'étude tous les jours, avec mise en place d'un enrichissement par frisois, et en évaluant l'état général des animaux, et des points limites seront mis en place. En cas d'éventuels signes de souffrance les animaux seront euthanasiés (Raffiner). Comme mentionné ci-avant, la corrélation in vitro-in vivo est difficilement réalisable chez l'homme ; par conséquent, le recours à l'utilisation de modèles animaux est indispensable dans notre étude et il n'y a pas d'alternative au Remplacement. Les expériences seront reproduites 3 fois de manière indépendante et ce projet nécessitera 57 animaux (souris C57Bl6) maximum.

18730 Le botulisme est une affection neurologique sévère, souvent mortelle si non-traitée, qui est le plus souvent d'origine alimentaire. Le nombre annuel de cas humains en France est d'environ 20 à 40 et la plupart sont hospitalisés en service de réanimation et nécessitent des soins longs et lourds. Le botulisme est également une affection des animaux notamment volailles et bovins qui cause de lourdes pertes économiques chaque année en France.

La méthode actuellement la plus sensible capable de détecter et d'identifier l'ensemble des types de toxines botuliques est le test de létalité sur souris qui est reconnu comme la méthode de référence. Du fait que la toxine botulique est présente en très faible concentration dans les prélèvements biologiques (de l'ordre de 1 dose létale dans le sérum des malades), il est impératif d'utiliser une méthode très sensible pour le diagnostic du botulisme. Nous mettons en place des méthodes alternatives pour la détection et l'identification des toxines botuliques. Leur sensibilité est satisfaisante pour certaines toxines mais pas pour toutes et elles doivent être validées par rapport à la méthode de référence qui est le test de létalité sur souris.

Par ailleurs, nous étudions et développons des anticorps neutralisants des toxines botuliques à des fins de diagnostic et d'usage thérapeutique. Le modèle reconnu d'évaluation du potentiel neutralisant des sérums et anticorps anti toxines botuliques est le test de protection chez la souris contre une dose d'épreuve de toxine botulique. Le test de létalité sur souris est utilisé pour calibrer le titre létal des préparations de toxines botuliques et pour évaluer le titre protecteur des sérums ou anticorps anti toxines botuliques dans des essais de neutralisation avec des doses connues de toxines botuliques. Il n'existe pas actuellement de méthode alternative satisfaisante.

Ce projet compte 3 procédures expérimentales de niveau sévère. Le nombre total de souris utilisées sur 5 ans est 15200.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet a été déterminé afin de garantir une bonne reproductibilité des résultats, tout en respectant le principe des 3R. Notamment, en ce qui concerne l'évaluation des titres neutralisants des sérums, les effectifs ont été validés afin de garantir la qualité des contrôles réalisés.

Les animaux injectés sont surveillés plusieurs fois par jour et un gel d'eau enrichi sur le plan nutritionnel est mis à leur disposition au fond de la cage pour améliorer la prise alimentaire dès l'apparition des premiers signes cliniques; ils sont mis à mort lorsqu'ils présentent des signes de paralysie.

18731 Il s'agit d'un projet préclinique visant à étudier le traitement du mélanome chez la souris.

L'objectif de ce projet est d'étudier l'efficacité de la radiothérapie sur le mélanome en combinaison avec l'immunothérapie. Ce projet durera 3 ans.

Ce projet utilisera des souris car une étude préclinique sur les anticancers doit utiliser un système mammifère entier avant de passer aux essais cliniques. Malheureusement, les méthodologies, telles que les lignées de cellules tumorales en culture et les organoïdes, sont insuffisantes, et il est nécessaire d'avoir recours à des animaux. On peut s'attendre à ce que les souris utilisées dans le cadre de l'expérience souffrent d'une brève période d'inflammation au niveau du site d'implantation de la tumeur. Une gêne sur la peau due à la croissance du mélanome est possible. Tout inconfort supplémentaire sera minimisé en mettant strictement fin à l'expérience.

Nous pensons que les inconvénients causés à l'animal pendant ce projet sont minimes et justifiés compte tenu des attentes de cette étude, à savoir démontrer que la radiothérapie, en combinaison avec l'immunothérapie, peut stimuler des réponses immunitaires antitumorales systémiques. À l'avenir, ce projet pourrait conduire à un contrôle significatif des mélanomes et d'autres tumeurs chez l'homme et à une réduction significative des effets secondaires des radiations dans les tissus sains (en réduisant le nombre de traitements nécessaires pour obtenir un contrôle de la tumeur).

Conformité aux principes de remplacement, de réduction et de raffinement :

Remplacement : Après avoir effectué une recherche dans les bases de données pertinentes concernant le remplacement des animaux pour les procédures expérimentales, nous pouvons affirmer que nous ne pouvons pas utiliser les méthodologies mentionnées ci-dessous pour les raisons suivantes :

- Lignée de cellules tumorales en culture : la culture de cellules tumorales est souvent employée pour remplacer l'utilisation d'animaux lors de l'essai d'approches anticancéreuses, par exemple de nouveaux composés médicamenteux. Cependant, la biologie impliquée dans les effets anticancéreux de la radiothérapie est très complexe et implique l'étude des effets sur le microenvironnement tumoral, y compris la vascularisation et le recrutement des cellules immunitaires, qui ne peuvent pas être étudiés en culture cellulaire.

- Organoïdes : les organoïdes humains ou murins sont des systèmes modèles en 3D soutenus par une matrice extracellulaire et contenant différents types de cellules qui imitent les organes natifs. Cependant, ils n'incluent pas une réponse inflammatoire de base, ce que ce permis vise à étudier.

Réduction : Le nombre total de souris requises sera de 847. Le nombre d'animaux utilisés a été évalué à l'aide de méthodes statistiques, ce qui nous a permis de réduire autant que possible le nombre de souris utilisées en adaptant soigneusement la taille de l'échantillon par expérience. Le suivi de la croissance tumorale sera réalisé in vivo en effectuant des mesures répétées, réduisant ainsi le nombre d'animaux impliqués dans les expériences. De plus, les souris de l'étude mécaniste auront deux tumeurs, ce qui réduira de moitié le nombre de souris nécessaires.

Raffinement :

Les animaux seront logés dans un cycle 12 h/jour, avec une ventilation et une température contrôlées automatiquement et une humidité de 50 %. Les animaux seront acclimatés dans leur installation pendant au moins 2 semaines avant le début de toute procédure. Les procédures

susceptibles de causer du stress aux animaux seront réalisées sous anesthésie par inhalation à court terme (par exemple, les mesures de la taille des tumeurs). En revanche, les procédures plus longues susceptibles de causer de la douleur aux souris (par exemple, l'inoculation de tumeurs) seront réalisées sous anesthésie générale. La température de l'animal sera régulée par des coussins chauffants et des cages de récupération à température régulée. Une analgésie systémique sera administrée. De plus, la santé des animaux sera contrôlée quotidiennement tout au long de l'expérience. Nous avons préparé une feuille de score détaillée pour évaluer le bien-être des animaux, ce qui nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée au moindre signe de douleur. L'expérience suivra un protocole d'arrêt strict ; l'animal sera euthanasié lorsqu'une tumeur atteindra un volume de 100 mm³ OU plus tôt s'il y a le moindre signe de lacération de la peau.

18732 Les rayonnements ionisants (RI) impactent directement la santé des organismes vivants. L'objectif de ce projet est d'évaluer l'effet de faibles doses de RI sur le cerveau adulte d'un animal vertébré, le poisson zèbre. Les RI ont un impact significatif sur les fonctions cognitives et motrices des animaux vertébrés pouvant potentiellement impacter la santé des populations. Un nombre croissant de données montrent que les RI affectent non seulement les neurones différenciés mais également les capacités de proliférations des cellules souches. Les RI produisent une accumulation de mutations génétiques dans les cellules souches pouvant perturber leur fonctionnement et aboutissant à une perte progressive des capacités de renouvellement cellulaire s'apparentant au processus de vieillissement prématuré. Le poisson zèbre, *Danio rerio*, fait partie des animaux vertébrés ayant conservé une grande capacité de neurogénèse au stade adulte, ce qui en fait un modèle biologique d'intérêt majeur pour l'acquisition de connaissances sur les cellules souches neuronales. De plus le comportement animal, tels que la sociabilité et la mobilité, sont proposés comme des processus intégratifs sensibles pouvant prédire des effets à plus long terme. Le poisson zèbre étant un animal vertébré, ces données permettront de mieux comprendre les mécanismes toxiques pouvant impacter la neurogénèse.

Les poissons seront hébergés en groupe dans des portoirs spécifiques qui permettent le suivi des paramètres d'ambiance (température, conductivité, pH). De plus, des observations quotidiennes seront réalisées pour assurer le bien-être des animaux. Ce protocole utilisera 1500 poissons zèbre adultes, en répartissant de manière équivalente les deux sexes et incluant 180 animaux transgéniques sur 3 ans, pour l'étude de 4 débits de doses d'irradiation (plus un contrôle non exposé). Les débits de dose retenus sont faibles, allant des valeurs maximales rencontrées suite à l'accident de Tchernobyl (50 mGy/h), jusqu'au seuil générique de protection des écosystèmes (10 µGy/h). Les analyses porteront sur paramètres moléculaires, cellulaires et comportementales afin d'intégrer les réponses aux différentes échelles biologiques. La technique de ponction par insertion d'aiguille sera utilisée sur un nombre restreint d'animaux (180) afin de stimuler les processus d'apoptose et de neurogénèse et de valider les techniques d'immunocytochimie nouvellement mises en œuvre dans ce projet en condition d'expositions chronique à de faible débit de doses de rayonnements ionisants.

Ce projet s'inscrit dans une démarche d'étude des chemins adverses (Adverse Outcome Pathway) qui vise à modéliser les réponses toxiques (ici aux rayonnements ionisants) à différents niveaux d'organisation biologique. Le processus de neurogénèse et les analyses comportementales ne sont possibles que sur des animaux vivants. Une réduction du nombre d'animaux utilisés est réalisée par la mutualisation des dissections pour des analyses différentes et par le développement de coupes histologiques fines (cryostat) qui permet de limiter le nombre de cerveau utilisé pour les analyses d'immunocytochimie. Le raffinement des conditions d'élevage consiste en la prise ponctuelle de nourriture vivante (*artemia*).

18733 Malgré les avancées significatives réalisées ces dernières années dans le traitement des cancers, beaucoup de patients ne répondent pas aux traitements disponibles. Des développements de nouvelles stratégies sont nécessaires. Le rétablissement d'une immunité efficace contre les cellules tumorales est une stratégie prometteuse. Notre laboratoire a mis au point et breveté une nouvelle

stratégie de vaccination très prometteuse, applicable à un grand nombre de cancers mais aussi aux infections virales tant en médecine humaine que vétérinaire. Cette technologie est basée sur une plateforme pseudo-virale sur laquelle sont greffés des antigènes tumoraux ou viraux, et constitue un outil thérapeutique puissant pour activer le système immunitaire contre les cellules tumorales ou les virus pathogènes. Des analyses *in vitro* ont permis de montrer l'efficacité de cette stratégie à stimuler des réponses immunitaires effectrices dirigées contre les antigènes présents sur les particules, et des études *in vivo* faites avec des particules de grade « recherche » ont permis de démontrer que la vaccination de souris avec un tel complexe induit l'activation de réponses immunitaires dirigées contre les antigènes présents sur la particule, ainsi que l'inhibition complète de la croissance d'une tumeur exprimant les antigènes d'intérêt.

En vue du transfert vers la clinique de cette stratégie, des particules compatibles avec leur utilisation chez l'homme ont été développées. Le but de notre étude est de tester et d'optimiser *in vivo* l'immunogénicité de ces nouvelles particules, étape indispensable avant de réaliser des essais cliniques chez l'homme. Pour cela, des souris C57Bl6 seront vaccinées avec les particules portant des épitopes d'intérêt (OTI et OTII de l'ovalbumine) et nous étudierons leur capacité à induire des réponses T et B spécifiques. Les particules seront injectées par voie sous cutanée dans le flanc droit des souris après rasage et anesthésie gazeuse sous isoflurane.

Afin d'induire une réponse immunitaire efficace après vaccination, différents types de cellules seront activés par des adjuvants spécifiques.

Les objectifs du projet sont les suivants :

Objectif 1 = optimiser l'immunogénicité des particules avec différents adjuvants

Notre 1er objectif consiste à évaluer la réponse immunitaire ainsi que les potentiels effets secondaires induits par les différentes approches (particules seules ou avec adjuvant 1 ou 2 ou 3).

Objectif 2 = combiner les meilleurs adjuvants

Nous combinerons alors les approches entraînant les plus fortes réponses immunitaires.

Un total de 80 animaux sera nécessaire pour la mise en oeuvre de ces 2 objectifs.

Tout sera mis en oeuvre pour respecter la démarche éthique des 3R:

Remplacement: l'étude de la réponse à la vaccination ne peut s'effectuer que *in vivo*; ce processus met en jeu différents types cellulaires qui interagissent de façon complexe, ce qui n'est pas modélisable *in vitro*; le remplacement du modèle animal pour cette étude n'est pas envisageable.

Réduction: les particules vaccinales ont été optimisées et sélectionnées par des tests *in vitro* afin de réduire les lots d'animaux nécessaires; nous avons réduit les nombres d'animaux/lot au minimum afin d'obtenir des résultats interprétables sur la base des besoins imposés par les tests statistiques.

Raffinement: l'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de douleur, ce qui permettra d'intervenir immédiatement dès le moindre signe d'inconfort ou de souffrance. Les injections se feront en voie sous-cutanée dans le flanc, ce qui n'entraîne que très peu d'inconfort. Par ailleurs des études préliminaires *in vivo* ont montré que l'injection des particules n'induisait pas d'effets secondaires. Enfin, nous utiliserons des adjuvants VacciGrade de Invivogen spécialement conçus pour études pré-cliniques *in vivo*, avec analogues synthétiques des TLR-L, déjà utilisés chez l'homme. Ainsi nous n'attendons pas d'effets secondaires de la part de ces adjuvants et nous les utiliserons aux doses recommandées et déjà optimisées par le fournisseur.

18734 Le syndrome de Sjögren (SjS) est une maladie auto-immune chronique caractérisée par la destruction des glandes exocrines par des cellules immunitaires auto-réactives. Environ 0,5% de la population totale est atteinte de SjS et souffre de sécheresse buccale et oculaire. A l'aide d'études cliniques et des modèles animaux, la réponse auto-immunitaire dans les glandes exocrines a été caractérisée. Ces progrès dans la compréhension de l'immunopathologie du SjS ont conduit à plusieurs traitements testés chez des patients. Cependant, les résultats de ces essais cliniques ne sont pas satisfaisants il n'existe toujours pas de traitement curatif contre du SjS. L'étude de nouvelles voies de recherche dans le SjS est donc nécessaire. Le rôle des peptides antimicrobiens

(AMPs) dans le domaine de l'auto-immunité est émergent. Les AMPs constituent un groupe de petits peptides largement exprimés sur les surfaces épithéliales pour la défense contre les micro-organismes pathogènes. Des études récentes révèlent que les AMP régulent également les réponses immunitaires dans différents contextes et qu'une production dérégulée d'AMPs est associée à diverses maladies auto-immunes. De manière intéressante les AMPs sont exprimés dans les glandes salivaires et leur expression dans la salive augmente en condition infectieuse ou inflammatoire. Notre objectif est de déterminer le rôle immunomodulateurs des AMPs dans les glandes exocrines lors du développement du SjS dans un modèle murin.

Pour atteindre ces objectifs nous envisageons d'utiliser un modèle induit de la maladie, de développer une souche de souris invalidée pour un AMP spécifiquement au niveau des glandes salivaires et de traiter les souris avec des AMPs. Nous analyserons dans cette condition de système immunitaire dans les glandes salivaires et le développement de la maladie.

Toutes les expérimentations sur l'animal seront conduites en respectant la règle des « 3 Rs »: Réduire: Nous utiliserons des calculs de puissance dans le planning des expériences et pendant leur suivi afin de limiter le nombre d'animaux au minimum pour obtenir des résultats statistiquement concluants, tenant compte des données scientifiques publiées ou obtenues par nos études in vitro, du type et du nombre simultané de données collectées et de l'expérience des expérimentateurs. Nous partagerons les souris avec les autres chercheurs du groupe et de l'institut utilisant des approches et prélèvements distincts afin de tirer un maximum d'informations de chaque animal mis à mort. Raffiner: Nous nous attacherons à réduire au maximum la souffrance des animaux, notamment en utilisant systématiquement l'anesthésie et l'analgésie pendant les procédures invasives. Suite aux et pendant les traitements, nous surveillerons l'état général, le poids, l'apparence et le comportement des animaux. L'expérimentation sera ainsi interrompue avant le développement de complications aiguës pouvant causer une douleur à l'animal. Remplacer: L'utilisation du modèle murin de SjS est incontournable pour ce projet car cette maladie résulte de l'interaction complexe entre le système immunitaire et l'organe cible de la réponse auto-immune. Il est impossible d'étudier ces interactions in vitro, même dans les systèmes les plus avancés disponibles. Cette étude, prévue pour 5 ans, nécessitera au total 752 souris.

Nous nous attacherons à réduire au maximum la souffrance des souris. La perte de poids, la douleur et le comportement de l'animal seront suivis régulièrement. A la fin de chaque procédure, les animaux seront euthanasiés selon les méthodes autorisées dans l'annexe IV de l'arrêté relatif à l'agrément des établissements du 1er février 2013.

Notre projet fournira de nouvelles perspectives dans la physiopathologie du SjS en démontrant le rôle des AMPs et offrira ainsi à long terme de nouvelles cibles thérapeutiques pour prévenir ou guérir la maladie.

18735 L'exposition à la fumée de cigarette et polluants comme l'ozone est un facteur majeur dans le développement de la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO). Cette pathologie est caractérisée par une inflammation anormale des voies respiratoires, une difficulté respiratoire et une altération progressive des parois alvéolaires (emphysème). La pathologie peut aussi être ponctuée de phases d'exacerbations dues à des infections virales et/ou bactériennes ou stress/dommage tissulaire qui induisent des réponses inflammatoires.

L'objectif du projet est d'étudier l'exacerbation ou la modulation des réponses inflammatoires et immunitaires pulmonaires déclenchées par l'exposition à la fumée de cigarette, ou plus largement à d'autres polluants environnementaux comme l'ozone ou les pesticides. Pour comprendre l'importance des voies impliquées dans les réponses inflammatoires, nous étudierons le déroulement de la maladie chez des souris déficientes pour les gènes correspondants. Les modèles murins sont en effet des outils précieux pour tester les nouvelles stratégies thérapeutiques en phase préclinique, qui ne sont pas réalisables chez l'homme.

Ce projet s'inscrit dans la continuité de travaux antérieurs qui ont conduit à la découverte du rôle important de molécules de l'hôte dans le développement de l'emphysème induit par la fumée de cigarette. Nous avons développé chez la souris des modèles d'inflammation pulmonaire et

d'emphysème par exposition à la fumée de cigarette ou l'ozone. Par rapport au précédent projet «Etude de la réponse inflammatoire pulmonaire aux aérosols par la fumée de cigarette et l'ozone», et au projet actuellement soumis élargi à l'étude à d'autres polluants environnementaux comme les pesticides, ce projet s'intéresse à de nouveaux aspects de la réponse immunitaire comme l'exacerbation de la réponse aux polluants par des infections bactériennes ou virales, des composés immunomodulateurs susceptibles de modifier la réponse immunitaire.

Les immunomodulateurs envisagés sont de 3 types, à savoir (1) reproduisant les effets induits par la bactéries comme le LPS, (2) les effets induits par les virus, comme le Poly I:C, ou (3) les effets produits par des stress/dommages tissulaires et le relargage d'acides nucléidiques comme l'ADN ou des di-nucléotides.

Nous disposons de lignées de souris génétiquement modifiées et d'inhibiteurs d'intérêt pour ce projet, qui permettent d'étudier les variations de la réponse immunitaire et/ou de la pathologie et de valider les hypothèses scientifiques. Les animaux immunodéficients utilisés ne présentent pas de phénotypes dommageables dans les conditions d'hébergement de l'animalerie. Pour déterminer le rôle de certaines populations cellulaires dans les réponses étudiées nous prévoyons d'étudier des animaux issus d'un autre projet, délétés pour certains types de cellules critiques pour la réponse inflammatoire, ou des animaux chimères après transplantation médullaire afin de déterminer le rôle des cellules hématopoïétiques dans la réponse aux polluants.

La procédure étudiera les mécanismes mis en œuvre dans l'induction d'une inflammation pulmonaire par des immunomodulateurs dans le contexte d'une exposition à des polluants environnementaux, soit aiguë (1 à 4 jours), soit plus chronique (2 semaines), avec prélèvement juste avant l'autopsie en fin d'expérience.

Les immunomodulateurs seront administrés sous anesthésie gazeuse (Isoflurane), par voie intranasale ou intratrachéale dans 40µL pendant 1 à 3 jours avant le début d'exposition aux polluants et les administrations seront poursuivies pendant la période d'exposition (1 fois tous les 1 ou 2 jours, pendant au maximum 2 semaines). Les animaux traités reçoivent jusqu'à 8 administrations.

L'exposition à la fumée de cigarette est réalisée 3 fois par jour pendant 4 jours, ou bien 5 jours par semaine pendant 2 semaines. L'exposition à l'ozone (1ppm) est réalisée une fois unique pendant 1h pour un traitement aigu. L'exposition à d'autres polluants environnementaux tels pesticides ou toxines bactériennes sera réalisée par voie intranasale, intratrachéale ou nébulisation, sous anesthésie légère, une fois unique pour un traitement aigu ou 3 fois/semaine pendant 2 semaines.

L'exposition à la fumée de cigarette, à l'ozone ou aux polluants peut causer une gêne respiratoire manifestée par des signes visibles tels que sifflement, hyperventilation, ou prostration, avec perte de poids passagère. Des anesthésiques seront utilisés pour les administrations par voie intranasale ou intratrachéale, et une surveillance quotidienne des animaux sera réalisée. Une grille de score clinique sera renseignée quotidiennement et les animaux atteignant le point limite mis à mort.

Positionnement du projet et règle des 3R :

A ce jour, l'animal de laboratoire reste le seul recours fiable et pertinent permettant d'étudier les mécanismes d'inflammation et de régulation à l'échelle de l'organisme. Ce projet sera réalisé en respectant la règle des 3R :

Remplacement : le modèle animal est fondamental dans notre cas, puisque l'étude de l'inflammation et de la pathologie ne peut se faire que sur un organisme vivant entier. Plusieurs niveaux de complexité sont nécessaires, impliquant des interactions entre différents types cellulaires et organes, qui ne peuvent être développés in vitro ou in silico.

Raffinement : Une anesthésie (isoflurane) est réalisée lors d'administrations par voie intranasale ou intratrachéale. Une surveillance quotidienne des animaux est réalisée. Elle consiste en l'observation de l'aspect général de l'animal, de son comportement et de sa mobilité et une grille de score clinique est renseignée. Si des animaux présentent des signes de souffrance et atteignent le point limite, ils seront mis à mort.

Réduction : le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement pertinents et reproductibles. Il est prévu d'étudier 3 types de polluants environnementaux, avec 3 immunomodulateurs et 6 lignées de souris modifiées sur des gènes d'intérêt par type d'exposition, soit au maximum 2592 souris pour 5 ans.

18736 Contexte et objectif du projet :

L'acquisition et la validation des compétences est une obligation réglementaire. Afin que tous les expérimentateurs travaillant à l'animalerie mettent en œuvre de bonnes pratiques, ils seront supervisés dans l'accomplissement de leurs tâches par un tuteur présentant les qualifications et l'expérience adéquates, jusqu'à ce qu'ils aient démontré qu'ils possèdent les compétences requises. La mise en place d'un tutorat pour l'acquisition des compétences est nécessaire et constitue l'objectif de ce projet.

Modalités de mise en œuvre :

Dans le but d'assurer une traçabilité complète de l'apprentissage des gestes techniques réalisés sur des animaux de réforme (souris) et des animaux commerciaux (rats), le présent projet va décrire certaines méthodologies des gestes techniques.

Pour les souris, l'entraînement des gestes techniques se fera sur des animaux d'élevages disponibles n'entrant pas dans un projet de recherche et destinés à être euthanasiés car ne portant pas les gènes d'intérêt. Une exception sera faite pour l'entraînement à l'électroporation in utero qui sera réalisée sur des souris femelles gestantes du commerce. Pour les rats, l'entraînement des gestes techniques se fera sur des animaux commerciaux car notre animalerie ne produit pas de rats. L'apprentissage sera encadré par une personne compétente et formée. Nous enregistrerons les animaux destinés à ce projet d'entraînement mis en place pour des étudiants, des ITA ou le personnel permanent souhaitant se former aux procédures techniques nécessaires aux expérimentations animales.

Dans ce projet, nous utiliserons des mâles et des femelles à des âges variés.

Les injections intrapéritonéales se feront avec des solutions anesthésiques afin d'effectuer ensuite les autres gestes sur les animaux anesthésiés. Les autres injections se feront avec des solutions injectables de sérum physiologique. Le gavage sera pratiqué avec de l'eau. Les perfusions intracardiaques seront réalisées avec un fixateur afin de vérifier la qualité de la fixation réalisée.

Les volumes de prélèvements de sang seront ajustés au poids de l'animal et effectués aux fréquences respectant sa physiologie. La douleur associée aux gestes chirurgicaux sera traitée avec des anti-inflammatoires et un morphinique.

Nombre d'animaux :

Ce projet nécessitera sur 5 ans, l'utilisation de 2320 animaux (soit l'utilisation de 1350 animaux issus de nos élevages). La formation aux gestes de base et aux gestes de chirurgie sera réalisée à la fréquence de deux par années.

Conformité éthique et 3Rs :

Ce projet s'inscrit pleinement dans la règle des 3Rs :

- le remplacement ne peut pas s'effectuer car il est nécessaire de pouvoir s'entraîner sur les mêmes espèces animales avant de réaliser le projet in vivo souhaité.
- la réduction est mise en œuvre par la réutilisation des animaux produits dans l'animalerie mais n'étant pas considérés comme d'intérêt et n'ayant pas de phénotype dommageable. Le nombre d'animaux a été calculé en fonction i) d'une part de l'expérience des tuteurs qui savent quel est le nombre minimal d'animaux nécessaires pour arriver à la maîtrise complète du geste technique, et ii) d'autre part, du nombre de nouveaux entrants par année, qui est de 20 personnes.
- le raffinement est l'objectif et sera la conclusion de la formation. Il permettra de diminuer les biais dans les protocoles expérimentaux. En effet le manque d'entraînement peut engendrer une mauvaise manipulation provoquant un stress ou une douleur.

Sauf si cela n'est pas approprié, toutes les procédures expérimentales du projet sont pratiquées sous anesthésie générale ou locale en recourant à des analgésiques. Les administrations et prélèvements seront effectués conformément aux bonnes pratiques vétérinaires.

Les animaux seront hébergés en groupes sociaux de 5 individus maximums et ils disposeront dans chaque cage d'un enrichissement de nidification. Une surveillance quotidienne sera réalisée pour vérifier la bonne santé des animaux et les points limites définis.

Avant le début de chaque procédure l'animal sera pesé et son état général contrôlé. En cas de signe de douleur les animaux seront exclus du protocole.

18737 Actuellement, les technologies de l'embryon sont largement utilisées par les entreprises de sélection bovines afin d'accroître le progrès génétique par la réduction de l'intervalle entre générations et l'augmentation de l'intensité de sélection. En fonction de la nature des embryons à transférer, les taux de gestation obtenus après transfert dans des femelles receveuses varient de 35 à 65%, entraînant d'importantes pertes économiques et de progrès génétique. Afin d'améliorer ces taux de gestation, des projets de recherche ont été menés sur l'évaluation de la réceptivité de la femelle receveuse et ont conduit à l'identification de marqueurs sanguins prédictifs de la réussite au transfert. Ces marqueurs ayant été identifiés en conditions expérimentales, il est désormais nécessaire de les valider sur un nombre d'animaux plus importants et dans des conditions d'élevage moins standardisées.

L'objectif du projet présenté est donc de prélever du sang sur des femelles receveuses d'embryons en fermes commerciales (400 femelles dont 200 en France et 200 en Espagne) et de mesurer ces marqueurs en lien avec la réussite au transfert d'embryons. Au préalable, des essais seront menés en ferme expérimentale, en France et en Espagne, pour évaluer l'impact de quelques facteurs de variation non maîtrisables sur le terrain (saison, température, intervalle de temps entre le repas et le prélèvement sanguin...) sur le niveau d'expression des marqueurs candidats. Un seul facteur de variation sera testé en France sur un lot de 6 génisses (intervalle de temps entre le repas et le prélèvement sanguin). Ainsi, cette saisine comprend essentiellement des prélèvements sanguins sur les 6 génisses hébergées en ferme expérimentale et sur les 200 femelles receveuses d'embryons hébergées en fermes commerciales. Ce projet respecte la règle des 3 R :

Remplacement : aucun système ex vivo permet de remplacer le recours à l'animal à cette étape de validation.

Réduction : Selon les éléments de la bibliographie, l'effectif utilisé (6 génisses) pour tester le facteur de variation en conditions expérimentales devrait permettre de mettre en évidence statistiquement l'effet s'il existe. De plus, la validation des marqueurs sanguins sera effectuée sur 200 femelles receveuses d'embryon utilisées commercialement en France permettant ainsi de s'affranchir du recrutement d'animaux uniquement pour l'expérimentation.

Raffinement : En conditions expérimentales, les génisses utilisées dans ce projet seront placées sous surveillance permanente (mesure en continu de l'activité et de la rumination) et hébergées dans une stabulation répondant aux normes de bien-être animal chez cette espèce (10m² par animal avec un accès aisé à l'auge et aux points d'abreuvements, présence de tapis caoutchouc derrière le cornadis pour le confort des aplombs, accès à des brosses latérales et dorsales. . .).

18738 Les maladies chroniques du foie sont associées à différentes causes comme la consommation chronique d'alcool (les maladies alcooliques du foie (Alcoholic Liver Disease, ALD)) et l'obésité (les stéatoses hépatiques métaboliques (Non Alcoholic Liver Disease, NALD)). Les maladies alcooliques du foie (ALD) sont les principales causes de maladies sévères du foie en Europe et de mortalité. Les maladies alcooliques du foie vont du foie gras, au foie avec une inflammation chronique (stéatohépatite alcoolique) à la cirrhose et le cancer du foie. La stéatohépatite alcoolique est la forme progressive des maladies alcooliques du foie et ne dispose toujours pas de traitement pharmacologique.

Dans le laboratoire nous nous intéressons aux fonctions de la protéine CD44. CD44 est une protéine d'adhésion cellulaire interagissant avec les intégrines, qui peut réguler le recrutement des cellules

immunitaires dans les organes et les fonctions de ces cellules. Nous avons déjà pu mettre en évidence que 1) CD44 joue un rôle important dans la mise en place de l'inflammation chronique au niveau du foie dans un contexte de stéatohépatite métabolique chez la souris ; 2) son expression hépatique constitue un marqueur de cette inflammation chez homme et 3) CD44 régule les fonctions pro-inflammatoires des macrophages mis en évidence dans des expériences réalisées sur des cellules. Nos résultats préliminaires ont mis en évidence que l'expression hépatique de CD44 augmente aussi au cours de la stéatohépatite alcoolique chez la souris et chez les patients. Dans cette nouvelle étude, nous étudierons comment l'alcool contribue au développement de stéatohépatite alcoolique et l'impact de CD44 sur 1) enrichissement des cellules immunitaires au niveau du foie, 2) l'activation de ces cellules et 3) la mise en place de cette inflammation chronique délétère au niveau du foie.

Ainsi nous déterminerons :

-le niveau d'expression de CD44 au cours du développement de la stéatohépatite alcoolique (foie, cellules immunitaires, cellules sanguines.....)

-si l'inactivation de CD44 (souris CD44KO) prévient le développement de la stéatohépatite alcoolique

-si la neutralisation de CD44 par un anticorps spécifique corrige ces altérations hépatiques.

Cette étude permettra de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Ce projet de recherche a été décrit dans un souci de Réduire le nombre d'animaux en expérimentation, de raffiner les méthodologies utilisées avec les points limites bien définis. Pour satisfaire au remplacement, nos résultats sur les biopsies humaines démontrent le rôle potentiel de CD44 dans le développement des complications hépatiques associées à une consommation chronique d'alcool (corrélation positive entre son expression et les complications hépatiques) (data personnels). Afin de raffiner et réduire ce projet, une des procédures consiste à la mise en culture de cellules primaires permettant d'étudier plus spécifiquement certains aspects. Ces différentes procédures expérimentales sont nécessaires et ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants. En effet, des approches sur cellules isolées ne permettent pas de mimer la physiopathologie de ces maladies retrouvées chez l'homme. Il est donc nécessaire de travailler sur l'organe entier de la souris en présence de tous les types cellulaires. Il est à noter que les souris déficientes pour CD44 ne présentent aucun phénotype dommageable comme décrit par le fournisseur des souris : "les souris sont viables, fertiles, de taille normale et ne présentent aucune anomalie physique et comportementale". Cette étude n'engendre aucune douleur chez l'animal induite par les traitements nécessaires pour le développement des complications induites par l'alcool (le foie est un organe non innervé). De plus, ces études seront réalisées dans le souci d'utiliser un nombre minimum d'animaux (660 animaux pour toutes les procédures) sans compromettre les objectifs du projet. Leur bien-être sera scrupuleusement pris en compte dans toutes les procédures en termes de conditions d'élevage (température, hygrométrie), d'hébergement (présence de tige en coton et d'igloo dans les cages), et de soins afin de réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux.

18739 Si l'obésité est un réel problème de santé publique, générant une diminution de l'espérance de vie en raison des maladies qu'elle entraîne (hypertension, cancers, diabètes ...), elle est également associée des déficits de mémoire. C'est d'autant plus problématique pendant l'enfance et l'adolescence qui représentent des périodes de maturation de certaines structures du cerveau indispensables pour la mémoire, dont l'hippocampe. Chez la souris, il a été montré que la consommation d'une nourriture hyperlipidique (HL) pendant l'adolescence, en plus d'entraîner l'obésité, perturbe la mémoire, et que cette perturbation est due à une hyperactivité des neurones de l'hippocampe.

L'objectif du présent projet est de mieux comprendre l'effet de la consommation d'une nourriture HL pendant l'adolescence sur la mémoire chez la souris, en particulier sur la mémoire sociale.

L'olfaction étant primordiale dans la fonction sociale chez la souris, nous souhaitons étudier les potentiels déficits de mémoire olfactive sociale.

Nous nous pencherons plus particulièrement sur la zone CA2 de l'hippocampe, une zone critique dans la construction de la mémoire sociale. Pour cela des souris seront exposées pendant 12 semaines à une nourriture HL ou standard avant de réaliser des tests comportementaux simples permettant d'évaluer la mémoire olfactive sociale.

Cette étude devrait permettre une meilleure compréhension des effets d'une nourriture HL sur le cerveau et la mémoire sociale. Identifier les mécanismes aboutissant à ces déficits permettra à plus long terme d'envisager des stratégies thérapeutiques. En outre, ce projet permettra d'étendre notre compréhension du rôle de l'olfaction dans la construction de l'environnement social des animaux.

L'ensemble des procédures proposées est en conformité avec les directives européennes 2010/63/UE et françaises, dans le respect des nouveaux standards de soin et de bien-être des animaux (règle des 3Rs).

Remplacer : L'étude intégrée des effets de la nutrition sur des aspects comportementaux et de fonctionnement cérébral est permise grâce à l'utilisation du modèle de rongeur soumis à de la nourriture obésogène. Le rôle primordial de l'olfaction dans les fonctions sociales chez la souris sera tout particulièrement exploité dans notre étude, et les tests comportementaux utilisés font appels à des comportements innés chez les rongeurs. Il n'est donc pas possible de remplacer ce modèle souris par des modèles in vitro ou in silico.

Réduire : Tous les efforts seront faits pour réduire le nombre d'animaux en effectuant plusieurs tests comportementaux chez les mêmes individus plutôt que des groupes différents, et de réduire les souffrances inutiles. En minimisant le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir des résultats concluants et permettre des comparaisons statistiques fiables, nous estimons que 576 souris seront nécessaires afin de mener à bien le projet. Cela correspond à une durée de 5 ans.

Raffiner : Les recherches seront réalisées en accord avec les recommandations institutionnelles pour le bon traitement des animaux de laboratoire. Les souris seront hébergées tout au long de leur vie en cage collective avec un environnement enrichi dans une animalerie agréée comportant une régulation de la température, de l'hygrométrie et du cycle jour/nuit. Elles recevront de l'eau et de la nourriture à volonté, elles seront changées régulièrement et elles seront observées tous les jours de la semaine par un personnel qualifié. Au cours de ces observations, si un animal présente des blessures, il sera immédiatement soigné et surveillé deux fois par jour. Si un animal présente un comportement anormal traduisant un état de mal être (perte de poids, poils hérissés, prostration...), il sera immédiatement isolé et surveillé. Si l'animal ne montre pas d'amélioration significative, il sera euthanasié dans les 48h. Les chirurgies seront réalisées sous anesthésie générale avec administration d'antalgiques en pré- et post-opératoire pour limiter la douleur.

18740 La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative caractérisée par la perte des neurones produisant de la dopamine situés dans une région du cerveau appelée la substance noire. La dopamine est un neurotransmetteur essentiel pour le contrôle des mouvements volontaires et les apprentissages. Le traitement de la maladie de Parkinson est basé sur l'utilisation de l-dopa (précurseur de la dopamine) ou d'agonistes dopaminergiques qui ont pour but de pallier au manque de dopamine consécutif à la perte des neurones dopaminergiques. Certains patients vont développer une addiction au traitement antiparkinsonien, caractérisée par une prise compulsive du traitement et la survenue d'effets secondaires sévères (troubles du contrôle des impulsions, mouvements anormaux involontaires).

Les facteurs de vulnérabilités qui conduisent certains sujets à développer une addiction au traitements dopaminergiques restent inconnus à ce jour. L'objectif de ce projet est d'identifier les mécanismes responsables de l'addiction aux traitements antiparkinsoniens afin de proposer des alternatives thérapeutiques. Nous effectuerons un suivi longitudinal d'animaux sur différents traits comportementaux qui peuvent être prédictifs d'une vulnérabilité accrue à développer une addiction (anxiété, recherche de nouveauté, flexibilité comportementale).

Une lésion au niveau de la substance noire sera réalisée par injection virale permettant ainsi de mimer les caractéristiques la maladie de Parkinson.

L'impact de cette lésion dopaminergique sur les traits comportementaux précédemment cité sera étudié, ainsi que leur comportement d'auto-administration de traitement antiparkinsonien.

Ce projet nécessitera une cohorte de 232 rats et sera réalisé suivant la règle des 3R. Remplacer : ces approches nécessitant une analyse comportementale, il n'est pas envisageable d'utiliser des méthodes alternatives à l'expérimentation animale. Réduire : un protocole rigoureux a été envisagé avant toute expérimentation permettant de réduire au maximum le nombre d'animaux en ne planifiant que les expérimentations nécessaires et en mettant en place un suivi longitudinal où chaque animal est son propre contrôle (mesures répétées permettant des analyses statistiques plus performantes). Raffiner : les expérimentations sont réfléchies de façon à minimiser au maximum l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse des animaux au cours des différentes procédures de ce projet (médicamentation définie avec le vétérinaire référent et tests comportementaux basés sur le comportement spontané des animaux et ne nécessitant pas d'intervention directe de l'expérimentateur).

Lors de la chirurgie nous aurons recours à l'anesthésie générale, additionnée d'une anesthésie locale en présence d'antalgiques. Les rats sont hébergés par deux (sauf quand la procédure justifie un isolement de 15 jours maximum) en présence d'enrichissement avec eau et nourriture ad libitum.

18741 L'élimination de certains organismes étrangers ou des tumeurs repose sur les interactions coordonnées de sous-types de globules blancs (lymphocytes, macrophages, cellules dendritiques) au sein des organes du système immunitaire de l'hôte comme la rate ou les ganglions lymphatiques. Alors que l'activation des lymphocytes par les cellules dendritiques est bien documentée, les fonctions des macrophages de la rate restent inconnues, du fait de la difficulté technique de les isoler.

Notre hypothèse de travail est que certains macrophages de la rate sont capables d'activer des lymphocytes spécifiques d'organismes étrangers et ainsi conférer une immunité protectrice. Nous avons développé une stratégie pour extraire les sous-types de macrophages de la rate de souris. Nous avons pu vérifier in vitro notre hypothèse et montré que ces macrophages sont au moins aussi efficaces que les cellules dendritiques. La relevance de ces observations doit cependant être testée dans un modèle physiologique in vivo, tenant compte de l'organisation anatomique et cellulaire de la rate, bien plus complexe qu'un modèle cellulaire.

Nos objectifs principaux sont de 1) montrer le rôle direct et protecteur de ce sous-type de macrophages dans un modèle de mélanome métastatique ; 2) d'en comprendre les mécanismes.

Le recours au modèle animal se justifie car aucun outil ne permet de tester cette hypothèse chez l'homme ; un simple modèle cellulaire est insuffisant pour récapituler toutes les étapes de la tumorigénèse ; des modèles tumoraux pertinents et bien caractérisés existent chez la souris dont la rate présente de nombreuses similitudes avec l'homme.

Le projet regroupe 12 procédures qui comportent l'utilisation de souris transgéniques déjà existantes, des injections de cellules (lymphocytes, macrophages, cellules dendritiques, mélanome) par voie intraveineuse, des administrations de substances pour moduler les réponses immunitaires par voie intraveineuse ou intrapéritonéale, une irradiation de certains animaux, une observation du comportement des macrophages en temps réel dans la rate sur quelques heures par microscopie après volet chirurgical abdominal de petite taille, en l'absence de méthodes substitutives existantes.

Ce projet d'une durée de 5 ans a été conçu en respectant la règle des 3R. Les différentes procédures expérimentales ont été élaborées pour prévenir et réduire au maximum la souffrance animale (anesthésie, analgésie, enrichissement du milieu de vie). L'état général, la perte de poids, l'apparence et le comportement de l'animal seront suivis régulièrement après les traitements ou pendant la procédure de chirurgie pour définir des points limites pouvant justifier l'arrêt prématuré de la procédure. A la fin programmée des procédures ou lors de l'atteinte de certaines points limites, les animaux seront mis à mort selon les méthodes autorisées dans l'annexe IV de l'arrêté relatif à l'agrément des établissements du 01/02/2013.

Le nombre total minimal d'animaux nécessaires pour répondre aux objectifs (n= 3 259) avec une puissance suffisante repose sur un calcul statistique, tenant compte des données scientifiques publiées ou obtenues par nos études in vitro, du type et du nombre simultané de données collectées et de l'expérience des expérimentateurs.

Ce projet permettra d'obtenir un rationnel pour développer des traitements basés sur l'utilisation ou la modulation des fonctions des sous-types de macrophages de la rate, notamment pour améliorer la survie ou la qualité de vie des patients atteints de tumeurs métastatiques.

18742 Dans un contexte sociétal progressiste, le bien-être animal a pris une place prégnante. De nombreuses questions se posent sur la gestion de la douleur au cours d'un processus infectieux induit expérimentalement pour comprendre les physiopathologies animales. Des outils d'observation sont mis en place pour évaluer cette douleur (comme par exemple le scoring sur le faciès). La mise en place de médicaments de type antalgiques ou analgésiques permettent de soulager une douleur induite lors d'une expérimentation. Cela a été démontré chez certains modèles animaux dans le cadre d'études comportementales. Cependant, ces antalgiques ou analgésiques ne doivent pas perturber le développement de la pathologie chez son hôte, pour ne pas modifier la question scientifique initiale. Actuellement dans nos processus infectieux, l'utilisation de ces médicaments est mal connue, ainsi que leurs conséquences sur la physiopathologie de l'agent infectieux ainsi que sur la réponse immunitaire induite de l'hôte.

La toxoplasmose est une maladie infectieuse cosmopolite due à un protozoaire intracellulaire, parasite opportuniste, *Toxoplasma gondii*. La toxoplasmose congénitale représente un problème majeur de santé publique et vétérinaire. Environ 3000 femmes enceintes s'infectent chaque année en France avec, dans 10% des cas, une transmission transplacentaire du parasite au fœtus. En parallèle, elle est l'une des causes majeures d'avortements pour les petits ruminants (principalement les ovins) au sein des élevages français.

Nous utiliserons le modèle expérimental ovin pour étudier l'impact du paracétamol sur les réponses immunitaires induites lors d'une toxoplasmose, plus précisément dans la phase aiguë de la maladie. C'est durant cette phase, que chez la brebis, un pic hyperthermique est observé pendant plusieurs jours consécutifs. Le projet a pour but de savoir si le paracétamol limite ce pic hyperthermique améliorant le bien-être de l'animal, sans interactions sur la réponse immunitaire induite lors d'une toxoplasmose chez la brebis. Une seconde molécule, le méloxicam (anti-inflammatoire non stéroïdien), sera utilisée comme témoin positif car il a un effet potentiel sur la réponse inflammatoire et son mode d'action est proche de celui du paracétamol. De nouveaux outils seront mis en place pour évaluer le comportement de la brebis durant l'infection (scoring du faciès, suivi hormonal). Parallèlement, des analyses immunologiques seront réalisées afin de vérifier l'impact du paracétamol sur la réponse immunitaire. Cette expérimentation nécessitera au maximum l'utilisation de 72 brebis dans le respect de la règle des 3R et afin d'établir les premières études de l'utilisation du paracétamol au cours d'un processus infectieux.

- Remplacement : Il n'a pas de modèles in vitro alternatifs.

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

- Raffinement : Les brebis sont hébergées en groupe dans une animalerie A2, avec un environnement enrichi (pierre de sel, paille). Cependant les animaux sont suivis plusieurs fois par jour (enrichissement social) pour détecter les signes cliniques précoces et afin de prendre une décision rapide en cas d'atteinte des points limites. Le paracétamol utilisé a pour objectif de soulager les brebis durant la phase aiguë en limitant l'hyperthermie.

18743 La douleur chronique est la principale cause d'invalidité chez l'Homme, et est strictement liée à des troubles graves tels que la fatigue, l'anxiété, la dépression et les maladies cardiovasculaires (MCV). Des études jumelles montrent que ces comorbidités résultent de mécanismes de causalité

communs. Le projet financé par l'UE et dont notre étude fait partie, s'efforcera d'élucider ces mécanismes liés à ces pathologies.

Un modèle souris pilote de douleur chronique de type ostéoarthrite du genou, associée à des perturbations métaboliques induisant des MCV sera exploré. Les souris seront hébergées et mises sous un régime à haut niveau caloriques avant une exploration par imagerie par résonance magnétique, afin d'identifier de potentielles signatures de la connectivité du cerveau spécifiques à la douleur chronique et ses comorbidités chez la souris. A l'issue des examens IRMs, une évaluation comportementale sera réalisée, et différents tissus et organes seront prélevés pour être analysés. Les souris modèles seront créées à partir d'une souche présentant une diversité génétique spécialement élevée. Ainsi, l'utilisation de cette souche permettra d'appréhender l'existence de comorbidités dans une population à forte diversité génétique, au plus proche des conditions naturelles. Dans ce même but, des souris mâles et femelles seront utilisées.

L'étude sera menée sur un total de 320 souris et respectera les principes de :

-Réduction : Le nombre d'animaux par groupe a été calculé pour obtenir des résultats statistiquement fiables à la fin de ce projet multisite, dans notre modèle créée à partir d'une souche présentant la particularité d'une diversité génétique importante.

-Raffinement : Les animaux seront hébergés en groupes sociaux de 4 à 5 animaux dans des cages enrichies avec un barreau à ronger, des papiers absorbants pour qu'ils puissent faire leur nid. Ils bénéficieront d'un suivi quotidien et une grille d'évaluation sera utilisée afin de détecter les animaux qui présenteraient des signes de souffrance, de mal-être, ou de douleur. Ces derniers seront exclus des analyses et seront soustraits à la souffrance. L'établissement de points limites prédictifs permettra alors d'interrompre les procédures et de réduire ainsi la souffrance animale. Tous les examens IRM seront réalisés sous anesthésie pour éviter toute souffrance des animaux.

-Remplacement : L'étude portant sur la douleur chronique et ses comorbidités dans un modèle préclinique, elle nécessite donc impérativement l'utilisation d'animaux.

18744 Dans l'objectif de répondre à la règle du Remplacement (règle de 3Rs), les équipes de recherche sont amenées à travailler prioritairement avec des techniques in vitro sur différents types de matériel biologique d'origine animale (e. g. sang, urine, salive, poils, selles, cellules, Liquide Céphalo-Rachidien, biopsie). Une des activités de notre unité est de fournir à la communauté scientifique et aux laboratoires de recherche privés ce matériel biologique nécessaire à leurs recherches et développements.

L'obtention de ce matériel biologique implique l'anesthésie (eg. prise de sang, biopsie) ou la contention manuelle de l'animal (eg. échantillon de bulbes capillaires). Le présent projet a pour objectif la validation éthique de ce type de pratique, courant dans notre unité, par le comité d'éthique auquel notre unité est rattaché.

Pour la plupart des cas, l'implication de notre unité dans ces projets scientifiques se limite à la réalisation de ces prélèvements et l'envoi des échantillons. Les échantillons qui seront collectés dans le cadre du présent projet ne donneront pas lieu à des analyses de données au sein notre unité. Le nombre d'animaux à inclure dans le projet ne peut donc pas être déterminé par un calcul de taille d'effectifs à l'avance. Ce nombre est par ailleurs dépendant des demandes qui seront faites par les équipes de recherche et les laboratoires. Par conséquent, une analyse rétrospective des demandes formulées à la station a permis d'évaluer le besoin à 60 animaux par an, avec un taux de ré-utilisation d'environ 50% soit 150 animaux pour la durée totale du projet (5 ans). La contribution de chacune des espèces à l'effectif global ne peut cependant pas être déterminée avec précision. Il est à noter que les procédures décrites dans le présent projet ont un impact minime sur l'état de santé et le bien-être des animaux et ne nécessitent en aucun cas la mise à mort des animaux.

Ces échantillons seront collectés sur différentes espèces de Primates non Humains hébergés dans notre unité: *Papio papio*, *Papio anubis*, *Macaca mulatta*, *Saimiri sciurus* et *Callithrix jacchus*.

REMPACEMENT : Dans le cadre des 3R, l'utilisation d'animaux est ici incontournable et le remplacement n'est pas envisageable puisqu'il s'agit de fournir des échantillons de tissus

biologiques pour des études in vitro. Ceux-ci permettront l'analyse de biomarqueurs, reflets du fonctionnement d'un ou plusieurs systèmes.

RÉDUCTION : Plusieurs approches permettent par ailleurs de réduire le nombre d'animaux. Lorsque cela est possible, et sur avis vétérinaire, plusieurs échantillons pourront être collectés sur le même animal dans le cadre d'une anesthésie unique (ex. prélèvement sanguin avec prélèvement poils). Elle vise à ré-utiliser les mêmes animaux, en conformité avec les exigences de la réglementation en vigueur.

RAFFINEMENT : En termes de raffinement, plusieurs approches sont mises en place dans notre établissement. Tous les animaux dans notre unité sont hébergés en groupes sociaux stables avec accès en continu à des volières enrichies structurellement et avec un accès à des installations extérieures pour la plupart d'entre eux. Tous les animaux font partie d'un programme d'enrichissement alimentaire et cognitif approuvé par la Structure du Bien-être Animal. Lors des périodes d'isolement nécessaires à la réalisation de certains de ces prélèvements les animaux seront inclus dans un programme d'enrichissement adapté à ces conditions. Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie utilisés ont été mis en place par l'équipe vétérinaire. Enfin, lorsque cela est possible, des programmes d'entraînements sont initiés pour permettre la réalisation du prélèvement avec la coopération des animaux (ex : prélèvements de salive).

18745 La sclérose latérale amyotrophique (SLA) ou maladie de Charcot est une maladie neurodégénérative caractérisée par l'apparition d'une paralysie musculaire progressive. C'est une maladie sévère avec une espérance de vie médiane de 3 ans après apparition des premiers symptômes, la mort survenant le plus souvent lorsque les muscles respiratoires sont affectés. Dans la SLA, les neurones moteurs qui relient le cerveau et la moelle épinière aux muscles meurent progressivement. Cette maladie est également caractérisée à des stades plus avancés par une réponse inflammatoire délétère qui amplifie la dégénérescence des neurones. Les causes de ce phénomène sont encore mal connues. En effet la plupart des cas de SLA sont sporadiques et apparaissent spontanément. Des cas familiaux ont été cependant identifiés avec des mutations dans plusieurs gènes (dont le gène SOD1) affectant la fonction des neurones. Il n'y a aujourd'hui aucun traitement curatif pour la SLA. Le seul médicament autorisé sur le marché en Europe, le riluzole (une molécule neuroprotectrice), a une efficacité limitée et ne prolonge l'espérance de vie que de quelques mois. Ainsi le développement de nouvelles molécules thérapeutiques pour la SLA est une priorité.

L'objectif de ce projet est de démontrer l'efficacité thérapeutique d'une nouvelle biomolécule développée dans notre laboratoire dans un modèle murin de SLA. Cette biomolécule possède des propriétés neuroprotectrices et anti-inflammatoires qui pourraient être bénéfiques dans cette maladie. Cette étape de développement préclinique chez l'animal est absolument déterminante pour pouvoir ensuite tester cette molécule chez l'homme dans des essais cliniques.

Pour ce projet nous utiliserons une lignée de souris transgénique exprimant une protéine SOD1 mutante qui développe une maladie très similaire à la SLA humaine. Les premiers symptômes de la maladie apparaissent entre 3 et 4 mois avec une faiblesse musculaire des membres postérieurs et évoluent progressivement sur plusieurs semaines. Ce modèle murin est le modèle de référence pour la SLA et est utilisé dans la majorité des études précliniques.

Notre candidat médicament sera dans un premier temps vectorisé par l'intermédiaire d'adénovirus associés (AAV) puis administré directement sous forme de biomolécule. Ces traitements seront d'abord testés chez le nouveau-né avant l'apparition des symptômes afin de réaliser une preuve de concept de leur efficacité puis lors de l'apparition des symptômes chez l'adulte pour démontrer leur intérêt thérapeutique. Leur efficacité sera évaluée par des tests fonctionnels de motricité musculaire et par des études histopathologiques.

Sur cinq ans, un maximum de 1722 souris (nombre égal de mâles et femelles) seront utilisées dans 9 procédures (108 souris en procédure légère, 1614 en procédure modérée). La molécule qui sera utilisée dans ce projet a été sélectionnée et optimisée à l'aide de tests d'efficacité sur des cultures de neurones in vitro. Ainsi une seule molécule candidate sera testée sur les animaux. Afin de réduire

le nombre d'animaux, nous avons organisé le projet en une succession de procédures qui s'enchaînent de façon linéaire avec à la fin de chaque procédure une évaluation précise des résultats débouchant sur la poursuite ou l'arrêt du projet. Les dommages attendus pour les animaux sont liés à la nature même de la pathologie avec une faiblesse musculaire progressive. Afin de limiter la souffrance des animaux, leur état général sera suivi régulièrement et en cas d'atteinte d'un des points limites définis dans ce projet, l'animal sera mis à mort. De plus, les souris seront hébergées par groupe de 6 individus et leur environnement sera enrichi de matériaux de nidification. Ce projet de recherche translationnel est une étape clé dans la validation et le développement d'un nouveau médicament pour traiter la SLA.

18746 Les perturbateurs endocriniens (PE) sont des composés d'origine naturelle (hormones et phyto-œstrogènes) ou provenant des activités humaines (produits issus de l'industrie chimique contenus dans des objets de consommation courante, pesticides, cosmétiques ...) capables d'interférer avec la fonction du système endocrinien et de ce fait, entraîner des effets néfastes sur la santé. Les sources d'exposition sont multiples (air, sols, eaux, produits de consommation) et leurs effets sur la santé humaine et animale sont encore mal connus. Les PE peuvent perturber le fonctionnement hormonal par divers mécanismes d'action et ainsi altérer les effets biologiques des hormones sur des grandes fonctions corporelles telles que le développement, la reproduction et le métabolisme. Chez les espèces saisonnières, la reproduction et le métabolisme énergétique sont des fonctions finement régulées par les hormones thyroïdiennes dans le système nerveux central. Les variations annuelles de ces hormones au niveau de l'hypothalamus contrôlent la synthèse de protéines impliquées dans la reproduction et le métabolisme, permettant ainsi de synchroniser le statut reproducteur et métabolique des individus avec les saisons. Ces régulations complexes permettent de synchroniser la naissance des progénitures aux périodes les plus favorables de l'année. Cependant, les effets biologiques des hormones thyroïdiennes sont particulièrement sensibles à l'action des PE. Un nombre croissant d'études rapportent qu'une multitude de PE interfèrent à tous les niveaux de l'homéostasie thyroïdienne : régulation centrale, synthèse, transport, distribution tissulaire, métabolisme et dégradation des hormones thyroïdiennes. Les effets de telles altérations du système thyroïdien sont encore peu connus, mais nous posons l'hypothèse que l'exposition d'espèces saisonnières à des PE pourrait altérer la régulation annuelle de leurs fonctions biologiques par les hormones thyroïdiennes.

L'objectif de ce projet est d'étudier les effets de deux PE couramment trouvés dans l'environnement : le Bisphénol A (BPA) et le DiéthylHéxyl Phtalate (DEHP) sur les fonctions reproductrices et métaboliques du hamster sibérien, une espèce saisonnière bien établie.

Pour ce faire, des hamsters sibériens mâles et femelles seront exposés à de faibles doses environnementales de PE, par incorporation dans l'alimentation, en période prénatale ou à l'âge adulte. Le but sera d'évaluer les effets directs ou transgénérationnels des PE sur l'adaptation saisonnière (soit activation lors du transfert de jours courts en jours longs ; soit inhibition lors du transfert de jours longs en jours courts) du statut reproducteur et métabolique des hamsters sibériens.

Pour réaliser ce projet nous avons besoin de 768 hamsters sibériens.

Remplacement : L'expérience doit être réalisée sur l'animal entier. Les mécanismes saisonniers et les mécanismes d'action des perturbateurs endocriniens font intervenir des voies de signalisation multiples dans différents types cellulaires, tissus et organes, nous empêchant donc de travailler sur un modèle *in vitro*.

Réduction : Le nombre d'animaux est établi au minimum requis de $n = 10$ par sexe, pour chaque dose de PE.

Raffinement : En conditions de laboratoire, les hamsters sibériens sont des animaux sociaux, ils seront donc maintenus par groupe de 4, en cages collectives enrichies avec un bâtonnet de bois et du matériel de nidation (coton).

Ce projet nécessitera la pose sous-cutanée de puces électroniques afin d'identifier les animaux maintenus en cages collectives. Cette procédure sera réalisée sous anesthésie gazeuse. La

température corporelle sera maintenue grâce à un tapis chauffant thermostaté. Les animaux seront suivis 5 jours suivant l'injection (mesures du poids corporel, observations du site de l'injection). Afin d'éviter des procédures invasives et stressantes pour les animaux, les PE seront administrés par incorporation à leur nourriture habituelle.

Afin de limiter la souffrance induite à l'animal, des points limites ont été définis permettant à tout moment d'exclure l'animal de l'étude. Ainsi le maximum sera fait pour réduire la douleur et le stress des animaux tout au long de l'expérience.

18747 Les maladies chroniques inflammatoires de l'intestin (MICI) sont des pathologies constituant un véritable enjeu de santé publique, puisqu'elles sont particulièrement handicapantes, incurables actuellement, et les approches de prise en charge des symptômes sont d'une efficacité relative. Ces pathologies sont multifactorielles et complexes. Elles se manifestent par des poussées inflammatoires plus ou moins longues et fréquentes selon les patients. Dans ce contexte, comprendre les facteurs impliqués dans le déclenchement des MICI est indispensable pour établir de nouvelles prises en charges des patients, en particulier des approches préventives chez les patients à risque (prédisposés génétiquement en particulier).

Des études épidémiologiques indiquent qu'un apport calorique important et le surpoids semblent être associés avec un risque augmenté de MICI et des prises en charge plus compliquées des patients. De plus, des études expérimentales sur des souris transgéniques obèses ont confirmé une exacerbation de l'inflammation.

Notre étude consiste à comparer la sévérité de l'inflammation intestinale induite par un agent colitogène chez des souris préalablement soumises à différents régimes alimentaires hypercaloriques. Nous avons démontré un effet aggravant de ces régimes avec un fort impact sur le microbiote intestinal des souris ayant consommé ces régimes. Afin d'établir le rôle causal du microbiote dans le processus inflammatoire, nous souhaitons réaliser un protocole de transfert de microbiote fécal sur des animaux exempt de germes (sans microbiote intestinal).

La physiologie de l'intestin est complexe et la réponse inflammatoire implique de nombreux acteurs présents dans l'ensemble de l'organisme d'où l'utilisation de modèle in vivo, sur des souris dont le microbiote intestinal est très largement étudié et donc décrit dans la littérature. Cette étude complémentaire nécessitera 30 animaux impliqués dans 5 procédures expérimentales, dont une sera classée sévère (traitement colitogène).

1. Remplacement : il n'existe pas d'alternative d'approche in vitro car l'étude porte sur des régimes alimentaires et la nutrition fait intervenir des processus physiologiques complexes qui interagissent avec le microbiote intestinal.

2. Réduction : l'étude portera sur des souris mâles de laboratoire, réparties en 3 groupes d'études dans l'objectif d'étudier l'effet aggravant de régimes hypercaloriques en transférant le microbiote fécal de souris de type sauvage (fond C57/Bl6) à des souris « Germ-Free » (C57/Bl6 GF) dépourvues de flore intestinale.

3. Raffinement : toutes les procédures expérimentales (régime, traitement pro-inflammatoire, coloscopie) auront lieu dans l'animalerie où les premières souris ont été également élevées précédemment. Ce dernier point est primordial afin de pouvoir comparer nos résultats. De plus c'est un environnement sécurisant pour l'animal et les coloscopies se feront sous anesthésie générale. Une procédure d'estimation et suppression de la douleur est mise en place. Les points limites sont fixés en fonction des procédures expérimentales selon un score défini au préalable et qui tient compte des signes éventuels de mal-être (isolement, yeux fermés, dos voûté, poils hérissés, immobilité, perte de poids de plus de 20% du poids initial, déshydratation, yeux et abdomen creux). En fin de protocole, les animaux seront mis à mort et des organes prélevés pour permettre des analyses biologiques.

18748 L'immunothérapie constitue un véritable espoir dans le traitement de nombreux cancers, notamment dans ceux sans prise en charge efficace actuellement. Ce traitement consiste principalement en l'administration d'anticorps monoclonaux dirigés contre les cellules tumorales ou

leur microenvironnement afin de limiter la croissance tumorale. Plusieurs types d'anticorps monoclonaux peuvent être utilisés dans ce but, sous réserve que le patient présente bien la protéine ciblée au sein de sa tumeur. D'autres anticorps monoclonaux ont une action immunomodulatrice en levant le mécanisme d'inhibition du système immunitaire induit par la tumeur. Ces mécanismes sont communs à plusieurs cancers et ces traitements récents ont des indications dans déjà sept types de cancers : poumon, rein, vessie, tête et cou, mélanome, maladie de Hodgkin et maladie de Merkel et sont actuellement évalués dans de nombreux autres cancers. Bien que des réponses remarquables et prolongées aient pu être observées chez des patients atteints de cancers avancés métastatiques, un nombre important de patients (80 à 60% selon les cancers) restent réfractaires au traitement. Il semblerait que les tumeurs génétiquement instables avec un fort de mutation ou fortement infiltrées par les lymphocytes T (tumeurs chaudes) soient les plus vulnérables à l'immunothérapie.

Nous avons développé une nouvelle génération d'anticorps polyclonaux glyco-humanisés permettant de s'affranchir des effets délétères de la réponse anti-carbohydate et de l'intolérance inhérente à l'utilisation d'anticorps polyclonaux chez l'homme.

Ce projet fait suite au projet APAFIS 26124. Dans cette première étude nous avons pu démontrer l'efficacité thérapeutique de notre anticorps polyclonal oncolytique dans 5 modèles de cancer. Dans cette seconde étude nous souhaitons déterminer la dose minimale requise pour obtenir un effet thérapeutique dans nos 5 modèles de xénogreffe tumorales chez la souris NMRI nude. Trois doses seront ainsi évaluées. Un nombre total de 140 souris NMRI nude sera utilisé pour ce projet.

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

- Réduire: le nombre de souris est réduit au minimum afin de permettre la reproductibilité et l'analyse des résultats par tests statistiques
- Remplacer: Du fait du contexte physiologique et de la complexité du système immunitaire, la validation d'un traitement par anticorps polyclonaux ne peut s'effectuer que dans un modèle in vivo.
- Raffiner: des protocoles d'anesthésie et d'analgésie seront mis en place selon la procédure. Un suivi clinique et comportemental des animaux (poils hérissés, dos vouté, agressivité. .) sera réalisé. Les animaux montrant des signes caractéristiques d'un mal-être tel qu'un changement de comportement ou de souffrance pourront être euthanasiés. Pour limiter le stress et l'inconfort, les animaux sont maintenus dans des cages ventilées dans un cycle jour/nuit de 12h/12h avec un accès à l'eau et à la nourriture à volonté ainsi qu'un nombre maximum de 5 animaux/cage et des brindilles de papier pour s'enfouir et se cacher

18749 L'un des défis majeurs associé à l'administration d'un médicament est le manque de spécificité de celui-ci vis-à-vis d'un site pathologique, entraînant des exigences de dosage plus élevé pour l'efficacité. Une stratégie intéressante pour augmenter l'index thérapeutique d'un médicament (c'est-à-dire augmenter le rapport bénéfice-risque en diminuant la dose administrée) consiste à délivrer spécifiquement la molécule thérapeutique sous sa forme active à des cellules cibles. La technologie des peptides pénétrants de tumeurs (TPP) apparaît comme l'une des approches les plus prometteuses à cet égard. Dans ce projet, nous proposons d'explorer une stratégie basée sur la combinaison de TPP associés à un cargo permettant un ciblage tumoral.

Ces peptides innovants en tant qu'approche thérapeutique permettent de délivrer un composé bioactif spécifique dans les cellules tumorales en utilisant un TPP associé à un peptide bioactif, qui cible l'interaction entre deux protéines impliquées dans la pathologie.

Nous avons généré 4 peptides en utilisant 4 TPP différents associés à un même peptide bioactif. Leur efficacité a été validée in vitro en utilisant des lymphocytes B primaires isolés de donneurs sains et de patients atteints de leucémie lymphoïde chronique (CLL) ainsi que des cellules primaires de foie saines et tumorales. Une efficacité in vivo a également été montrée sur un modèle de xénogreffes de CLL chez la souris. Les résultats ont montré un très bon effet anti-tumoral avec une prolongation importante de la survie des souris traitées en comparaison avec les souris non traitées.

Dans le but de mieux caractériser ces peptides en vue d'une validation préclinique nous avons décidé de faire des études de pharmacocinétique (PK).

Après injection intraveineuse, nous analyserons le temps de demi-vie par prise de sang, la biodistribution, la biodisponibilité, l'exposition corporelle au médicament et la concentration maximale du médicament dans le plasma. Nous prévoyons ces dosages à 9 temps différents. Ce projet respectera la règle des 3R : Pour remplacer l'expérimentation animale, les validations d'efficacité et de toxicité ont été faites sur des cultures cellulaires. Pour réduire le nombre d'animaux, nous travaillerons sur des petits groupes de 5 souris, suffisant pour ce type d'expériences, en commençant par des essais sur 3 souris, et en ajoutant 2 autres souris uniquement si les résultats ne permettent pas de conclure. De plus, suite aux expériences préalablement réalisées, nous n'effectuerons cette étude que sur un seul des 4 composés, celui ayant montré l'activité la meilleure. Cette étude portera donc au maximum sur 45 souris Swiss, sur une période de 1 an. Le raffinement consistera à héberger les souris groupées en milieu enrichi par de petits abris de nidification et du coton.

Notre projet contribuera au développement d'approches innovantes spécifiques aux tumeurs pour transporter un composé bioactif dans une cellule tumorale pour une thérapie ciblée contre le cancer. Les résultats attendus sont une cinétique d'élimination sanguine du produit étudié. Le projet consistant en une simple injection intraveineuse sous anesthésie suivie d'une exsanguination totale après mise à mort par surdose d'anesthésique, nous n'escomptons pas de dommages.

18750 La dépression majeure affecte approximativement entre 8% et 12% des hommes et entre 15% et 20% des femmes. Sa prévalence a été multipliée par 6 depuis 1970 et d'après les études de l'Organisation Mondiale de la Santé, cette pathologie sera la pathologie la plus coûteuse en 2030 (devant les maladies cardiovasculaires, les maladies infectieuses et les cancers). Les traitements pharmacologiques disponibles actuellement sont très insuffisants puisque d'après l'étude multicentrique STAR*D, moins d'un tiers des patients recevant une thérapie pharmacologique parviennent à la rémission après 14 semaines de traitement.

Ainsi, la dépression est un problème majeur de santé publique, nécessitant la mise au point de nouveaux traitements à travers l'étude des mécanismes des circuits neuronaux de dérégulation comportementale. Parmi ceux-ci, il y a l'optogénétique et la chimio-génétique qui sont des technologies permettant de manipuler les neurones en visant la normalisation des anomalies cellulaires : l'opto via des canaux activés par la lumière et la chimio via des récepteurs couplés à des protéines modifiées activés par des molécules inertes. Ces outils permettant d'inhiber ou d'activer les neurones pourraient permettre de traiter certains adolescents avec un risque de dépression évoluant vers des symptômes dépressifs à l'âge adulte.

En effet, nous avons effectué une étude préliminaire dans laquelle il a été mis en évidence un état dépressif à travers un modèle d'isolement social post sevrage de 3 semaines à l'adolescence ayant induit certaines modifications cérébrales notamment dans l'amygdale, l'hippocampe, le striatum, le pallidum et le thalamus qui ont été visible en imagerie (PET-SCAN). L'activité neuronale de ces régions est donc impliquée dans l'apparition des troubles dépressifs dans le sens d'une hyper activation. Il sera donc question d'inhiber cette sur-activation afin de retrouver une activité normale des circuits neuronaux touchés. Le but de cette expérience sera alors 1) d'observer si l'inhibition faite à l'adolescence permet d'une part de reverser les symptômes dépressifs à l'adolescence et d'autre part de stopper leur survenue à l'âge adulte, ensuite de 2) comprendre les mécanismes qui sous-tendent l'apparition des effets thérapeutiques à travers la modulation neuronale.

Des couples reproducteurs constitués de 20 femelles et de 5 mâles nous permettront d'obtenir des portées dans lesquelles seront sélectionnés 2 mâles et 2 femelles. Pour cette expérience, 432 souris adolescentes sont requises pour constituer les lots, nous devons donc obtenir environ 108 portées d'une moyenne de 6 petits soit environ 650 animaux. Les souris seront soumises à l'opto et la chimio à l'adolescence.

Le total d'animaux requis pour cette saisine est de 650 + 25 reproducteurs.

En application de la règle des 3 R au modèle utilisé dans l'étude :

Raffinement : les stress appliqués aux animaux peuvent être qualifiés de léger à moyen. Les expérimentateurs sont experts dans la préhension/contention des souris et sont soucieux d'éviter tout stress lors de la réalisation des procédures. Les injections quotidiennes d'antidépresseur ont été remplacées par un traitement dans l'eau de boisson. Les conditions d'élevage des animaux non stressés seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu (cabanes plexiglass et cartons, tubes). Les animaux recevront un traitement analgésique avant, et juste après l'intervention, puis si nécessaire un traitement antibiotique. Chaque animal est placé sur une couverture chauffante pour éviter toute hypothermie. Les cornées sont protégées de la déshydratation. L'anesthésie gazeuse est ici privilégiée pour mieux contrôler la profondeur d'anesthésie et pour une meilleure récupération post-opératoire. Une surveillance post-opératoire d'une semaine est réalisée pour suivre chaque souris et intervenir si nécessaire.

Remplacement : aucune méthode alternative in vitro n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée. La sélection des animaux et les effets du stress chronique et ses symptômes chez l'animal, comme modèle de pathologie psychiatrique humaine, repose sur l'observation du comportement de l'animal vivant. L'étude de l'activation cérébrale et de l'implication des réseaux et circuits neuronaux sous-jacents nécessite un animal vivant. Aucun marqueur cellulaire in vitro n'est disponible pour ce type d'étude.

Réduction : les effectifs sont optimisés, les observations comportementales nécessitent une taille d'effectifs suffisant compte tenu de la variabilité inter-individuelle (n=12 sujets par groupe). De plus, la rationalisation des procédures permet d'optimiser l'utilisation des échantillons cérébraux prélevés. Les animaux qui n'intègrent pas les tests seront utilisés pour des tests comportementaux ou de la reproduction pour d'autres saisines de l'équipe de recherche. .

18751 La dépression majeure affecte approximativement entre 8% et 12% des hommes et entre 15% et 20% des femmes. Sa prévalence a été multipliée par 6 depuis 1970 et d'après les études de l'Organisation Mondiale de la Santé, cette pathologie sera la pathologie la plus coûteuse en 2030 (devant les maladies cardiovasculaires, les maladies infectieuses et les cancers). Les traitements pharmacologiques disponibles actuellement sont très insuffisants puisque d'après l'étude multicentrique STAR*D, moins d'un tiers des patients recevant une thérapie pharmacologique parviennent à la rémission après 14 semaines de traitement.

Ainsi, la dépression est un problème majeur de santé publique, nécessitant la mise au point de nouveaux traitements à travers l'étude des mécanismes des circuits neuronaux de dérégulation comportementale. Parmi ceux-ci, il y a l'optogénétique et la chimiogénétique qui sont des technologies permettant de manipuler les neurones en visant la normalisation des anomalies cellulaires : l'opto via des canaux activés par la lumière et la chimio via des récepteurs couplés à des protéines modifiées activés par des molécules inertes. Ces outils permettant d'inhiber ou d'activer les neurones pourraient permettre de traiter certains adolescents avec un risque de dépression évoluant vers des symptômes dépressifs à l'âge adulte.

En effet, nous avons effectué une étude préliminaire dans laquelle il a été mis en évidence un état dépressif à travers un modèle d'isolement social post sevrage de 3 semaines à l'adolescence ayant induit certaines modifications cérébrales notamment dans l'amygdale, l'hippocampe, le striatum, le pallidum et le thalamus qui ont été visible en imagerie (PET-SCAN). L'activité neuronale de ces régions est donc impliquée dans l'apparition des troubles dépressifs dans le sens d'une hyper activation. Il sera donc question d'inhiber cette sur-activation afin de retrouver une activité normale des circuits neuronaux touchés. Le but de cette expérience sera alors 1) d'observer si l'inhibition faite à l'adolescence permet d'une part de reverser les symptômes dépressifs à l'adolescence et d'autre part de stopper leur survenue à l'âge adulte, ensuite de 2) comprendre les mécanismes qui sous-tendent l'apparition des effets thérapeutiques à travers la modulation neuronale.

Des couples reproducteurs constitués de 20 femelles et de 5 mâles nous permettront d'obtenir des portées dans lesquelles seront sélectionnés 2 mâles et 2 femelles. Pour cette expérience, 432 souris adolescentes sont requises pour constituer les lots, nous devons donc obtenir environ 108 portées d'une moyenne de 6 petits soit environ 650 animaux.

Les souris seront soumises à l'opto et la chimio à l'adolescence.

Le total d'animaux requis pour cette saisine est de 650 + 25 reproducteurs.

En application de la règle des 3 R au modèle utilisé dans l'étude :

Raffinement : les stress appliqués aux animaux peuvent être qualifiés de léger à moyen. Les expérimentateurs sont experts dans la préhension/contention des souris et sont soucieux d'éviter tout stress lors de la réalisation des procédures. Les injections quotidiennes d'antidépresseur ont été remplacées par un traitement dans l'eau de boisson. Les conditions d'élevage des animaux non stressés seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu (cabanes plexiglass et cartons, tubes). Les animaux recevront un traitement analgésique avant, et juste après l'intervention, puis si nécessaire un traitement antibiotique. Chaque animal est placé sur une couverture chauffante pour éviter toute hypothermie. Les cornées sont protégées de la déshydratation. L'anesthésie gazeuse est ici privilégiée pour mieux contrôler la profondeur d'anesthésie et pour une meilleure récupération post-opératoire. Une surveillance post-opératoire d'une semaine est réalisée pour suivre chaque souris et intervenir si nécessaire

Remplacement : aucune méthode alternative in vitro n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée. La sélection des animaux et les effets du stress chronique et ses symptômes chez l'animal, comme modèle de pathologie psychiatrique humaine, repose sur l'observation du comportement de l'animal vivant. L'étude de l'activation cérébrale et de l'implication des réseaux et circuits neuronaux sous-jacents nécessite un animal vivant. Aucun marqueur cellulaire in vitro n'est disponible pour ce type d'étude.

Réduction : les effectifs sont optimisés, les observations comportementales nécessitent une taille d'effectifs suffisant compte tenu de la variabilité inter-individuelle (n=12 sujets par groupe). De plus, la rationalisation des procédures permet d'optimiser l'utilisation des échantillons cérébraux prélevés. Les animaux qui n'intègrent pas les tests seront utilisés pour des tests comportementaux ou de la reproduction pour d'autres saisines de l'équipe de recherche.

18752 L'agriculture est depuis toujours en constante évolution. Pour l'aider dans cette mutation la recherche agronomique a initiée de nombreux programmes de recherche, auparavant orientés vers l'augmentation des performances et l'amélioration de la productivité des espèces animales élevées et destinées à produire du lait et/ou de la viande. Aujourd'hui, elle s'orienterait plutôt à maintenir le niveau de production des animaux (ovins, bovins...) tout en prenant plus en compte les contraintes du milieu, les risques environnementaux (production des gaz à effet de serre, pollution des sols...) ou attentes sociétales (bien être animale, qualité des produits, traçabilité de l'alimentation...). Pour répondre à une partie de ces enjeux, notre établissement utilisateur a un besoin constant d'animaux. Pour réaliser des études fines des mécanismes physiologiques d'ingestion et de la digestion des aliments chez les ruminants, les animaux modèles utilisés sont, ici des bovins laitiers. C'est un modèle animal de référence pour établir les valeurs de digestibilité et d'ingestibilité des aliments pour ruminants, et pour comprendre les processus digestifs afin de les modéliser. Pour certaines études, en particulier pour la compréhension des mécanismes de digestion et de mesure de la cinétique de dégradation des aliments, le recours à des animaux porteurs de canules est indispensable. Le projet dure 5 ans et les expérimentations conduites nécessitent de disposer chaque année de 70 vaches laitières avec un renouvellement de 24 génisses annuellement, dont 20 porteuses de canules, ainsi que leur descendance. Il y aura 166 animaux mobilisés sur la durée du projet. Ceci implique de renouveler une partie de cet effectif chaque année. Il existe des méthodes alternatives de type in vitro mais dont la précision des résultats ne permet pas toujours la généralisation. Cependant, elles sont mises en oeuvre dès que possible permettant de remplacer ou de réduire au maximum le nombre d'animaux canulés utilisés et la sévérité des procédures appliquées.

La règle des 3R a été prise en compte pour l'élaboration du projet et de cette demande :

i) Réduire : avoir recours à moins d'animaux. Par exemple : schémas expérimentaux minimisant le nombre d'animaux, en utilisant une approche en carré latin.

ii) Raffiner : cela consiste à améliorer les conditions d'élevage et d'hébergement des animaux dans le but d'augmenter autant que possible leur bien-être (habituation aux procédures, conditions d'hébergement et de contention adaptées, maintien du contact entre eux quand c'est possible, réduction du temps de présence en stalle de digestibilité, temps de repos suffisant entre les procédures appliquées et surveillance quotidienne de leur bonne santé). Il s'agit aussi d'accorder une préférence à des procédures non-invasives, de donner des soins pré, per et postopératoires adéquats, de réduire la durée de l'étude et d'appliquer les points limites établis pour réduire la douleur et l'angoisse des animaux.

iii) Remplacer : quand c'est possible des méthodes invitro seront utilisées

18753 La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est la première cause de malvoyance après 50 ans et on estime à un million le nombre de personnes concernées. A ce jour, la cause précise de la maladie est encore inconnue, mais plusieurs hypothèses concernant le développement de la pathologie ont été proposées, et notamment le rôle très probable de la toxicité lumineuse et du stress oxydant sur la mort des cellules de la rétine.

Le but de ce projet est de tester l'effet d'agonistes adrénérgiques sur le phénotype rétinien de souris présentant des caractéristiques de la DMLA. Les effets de ces agonistes ont été préalablement validés dans trois modèles cellulaires dans lesquels il a été montré qu'ils agissent sur des mécanismes permettant de réduire l'accumulation de la lipofuscine, une des caractéristiques de la pathologie. Le développement d'un médicament visant à traiter la DMLA chez l'homme pourrait découler de ces expériences.

Un total de 640 souris sera utilisé pour réaliser ces expériences sur une durée totale de 5 ans, ce qui représente une moyenne de 114 souris par an. Les traitements seront réalisés soit par gavage quotidien soit par injection intra- péritonéale ou intra-vitréenne.

La règle des 3R sera appliquée. Remplacer : Ce projet fait suite à plusieurs tests sur cellules démontrant sans conteste le potentiel des molécules d'intérêt en thérapie humaine. La validation des effets thérapeutiques chez l'animal est donc à ce stade indispensable pour envisager un développement thérapeutique. Réduire : Nous réduirons au minimum le nombre de souris par groupe afin de pouvoir réaliser un test statistique (en tenant compte d'une perte possible de 10 à 20 % des souris en cours d'expérimentation). Raffiner : Les souris seront d'abord acclimatées aux zootechniciens afin de réduire au maximum le stress engendré par le gavage. Elles seront pesées chaque semaine et observées quotidiennement, et leur comportement lors du gavage sera reporté par écrit. Toutes les manipulations le nécessitant seront réalisées sous anesthésie générale et/ou locale et des traitements préventifs (antibiotique, anti-inflammatoire) seront utilisés afin de réduire les risques d'infection et de douleur. Le poids et l'apparence physique des souris seront vérifiés tout au long des procédures expérimentales. Une perte de poids supérieure à 20% ou un signe révélateur de souffrances engendrera une euthanasie. Le comportement et la posture des souris seront également observés afin d'évaluer le degré de bien-être ou de douleur.

18754 1 personne sur 4 souffre d'allergies respiratoires. Cette pathologie représente un problème majeur de santé publique en termes de qualité de vie, de perte de jours de travail, de coût médicamenteux, voire de mortalité. Parmi les approches thérapeutiques proposées pour traiter les allergies respiratoires de type I, l'immunothérapie allergique (aussi appelée « désensibilisation ») est le seul traitement de fond qui s'attaque à la cause même de la maladie en rééduquant le système immunitaire. L'immunothérapie allergique consiste en l'administration par voie sous-cutanée ou sublinguale d'extraits allergéniques identifiés comme responsables des manifestations allergiques pour permettre au système immunitaire de les tolérer. Dans ce contexte, ce projet permettra de sélectionner les principes actifs (e. g. extraits allergéniques, allergènes purifiés, allergènes recombinants), les formulations (e. g. molécules immunomodulatrices, particules) et les modes d'administration (e. g. voies sublinguale, orale, nasale, sous-cutanée) qui composeront les traitements du futur. Avant toute étude clinique chez l'homme, le but du projet est de permettre une évaluation préclinique chez la souris de l'efficacité des traitements développés par le laboratoire et de réaliser des tests de sécurité des produits en développement. Les résultats pourront être intégrés

aux dossiers réglementaires. Il est indispensable de recourir à un modèle animal car il est impossible de reconstruire un processus de sensibilisation/désensibilisation dans des cultures de cellules. Nous utiliserons 3 procédures expérimentales qui permettent de mesurer l'innocuité et l'efficacité de nos principes actifs et formulations. Un cahier des charges précis nous permet d'éliminer des molécules à chaque étape du projet afin de réduire le nombre d'animaux utilisés. Le projet est composé de 3 procédures expérimentales différentes et va nécessiter l'utilisation de 7680 animaux sur 5 ans. Ce nombre a été déterminé grâce à des tests statistiques appliqués pour chaque expérience et permettant de réduire au maximum le nombre d'animaux, tout en en gardant suffisamment pour ne pas risquer d'invalider les expériences qui seront menées. Le processus de désensibilisation est non douloureux, et nous surveillons nos animaux pour vérifier que tel est le cas lors de nos expériences. L'utilisation de la pléthysmographie corps entier qui permet de mesurer l'asthme chez des animaux non contraints est la seule mesure lors des procédures 2 et 3 qui entraîne une angoisse de niveau modérée, car l'utilisation de broncho-constricteur provoque chez les animaux allergiques l'équivalent d'une crise d'asthme. La mesure par pléthysmographie sera immédiatement interrompue si les animaux présentent des signes cliniques de souffrance (spasmes respiratoires, salivation excessive) et les animaux reposés dans leur cage et surveillés jusqu'à récupération totale (ce qui survient 5-10 min après l'arrêt de l'exposition au bronchoconstricteur)

18755 Le médulloblastome (MB) est la tumeur pédiatrique du cerveau la plus répandue et la plus agressive. Le taux de guérison est d'environ 70%, mais les traitements associant radio- et chimiothérapie sont excessivement péjoratifs, entraînant une réduction de la qualité de vie des patients. Ils sont inefficaces à la rechute qui est fatale. Les raisons invoquées sont : (i) une forte hétérogénéité de la pathologie (4 groupes décrits dont le pronostic vital associé est variable) et (ii) une forte propension à développer des résistances aux traitements de référence, induisant la récurrence post-thérapeutique de la maladie.

Le MB est très vascularisé. Or, les phénomènes de résistance au traitement et d'échec thérapeutique sont, en partie, liés au développement des vaisseaux sanguins (angiogenèse) et/ou lymphatiques (lymphangiogenèse) et à l'inflammation qui en résulte.

Des travaux antérieurs de notre laboratoire ont prouvé qu'un nouveau composé antiangiogénique, nommé C29, inhibait efficacement l'angiogenèse et le développement tumoral, dans des modèles cellulaires de cancer du rein ou de cancer de la tête et du cou. La croissance tumorale in vivo est également affectée. Cependant, les effets de ce composé n'ont jamais été étudiés pour le MB.

Nos expériences préliminaires réalisées in vitro démontrent que le C29 a la même efficacité inhibitrice sur plusieurs cellules naïves dérivées de MB (modèles de MB au diagnostic) ou résistantes à l'irradiation (modèles de MB en rechute). En effet, il réduit très significativement la croissance des cellules tumorales, leur migration, ainsi que l'invasion cellulaire. Il s'agit donc d'un excellent inhibiteur de l'agressivité des cellules tumorales, in vitro. Notre objectif à terme est de réaliser la démonstration in vivo de l'effet inhibiteur du C29 sur l'angiogenèse, l'inflammation et la croissance tumorale.

Le traitement des tumeurs du cerveau par chimiothérapie est rendu compliqué par l'existence de la barrière hémato-méningée ou barrière hémato-encéphalique (BHE) qui protège le cerveau des agents pathogènes, des toxines et des hormones circulant dans le sang. Cette barrière, extrêmement sélective, complique considérablement l'administration des traitements, de nombreuses molécules ne pouvant pas la franchir, de par leurs caractéristiques physico-chimiques (taille, charge électrique, etc.). La première étape, absolument fondamentale à la démonstration de l'efficacité d'un traitement sur une cible cérébrale, est la démonstration de la capacité dudit traitement à franchir la BHE. C'est l'objectif du projet décrit ci-après.

La procédure 1 vise à étudier le passage de la BHE par le C29, 3 heures après une administration aiguë du produit, par voie orale. Le produit sera recherché dans les tissus du système nerveux central et, notamment, dans le cervelet, siège du MB.

La procédure 2 a pour but de vérifier que, suite à un traitement chronique, le taux de C29 est stable dans le cervelet et que ce taux est suffisant pour envisager une efficacité thérapeutique.

La procédure 3 consiste en la perfusion cardiaque, sous anesthésie et analgésie, de solution saline de façon à rincer l'ensemble des organes (et notamment le cerveau) de résidus de sang avant prélèvement du cerveau pour analyse.

Sur le plan éthique :

- Conformément aux exigences de réduction, le nombre d'animaux nécessaires a été calculé au plus juste par l'utilisation de méthodes statistiques appropriées (test de puissance).
- Conformément aux exigences de remplacement, les expériences proposées dans ce projet ont été précédées de nombreuses expériences in vitro qui permettent de répondre à de nombreuses questions préliminaires et donc, d'ajuster au mieux ce nombre d'animaux. Il n'existe pas de méthodes alternatives ni substitutives à l'utilisation de souris pour les objectifs de notre projet.
- Conformément aux exigences de raffinement, une grande importance sera accordée au bien-être des animaux avec un suivi régulier, par un personnel formé à l'expérimentation animale, afin de détecter tout signe de détresse et/ou de souffrance suite aux traitements administrés. Les procédures susceptibles de générer une souffrance sont conduites sous analgésie et anesthésie. Si des signes de souffrance devaient apparaître néanmoins, les mesures nécessaires seraient prises grâce à l'application des points limites clairement définis. Conformément aux recommandations en vigueur, nos souris bénéficient d'un milieu enrichi et l'ensemble des manipulateurs est dûment qualifié et diplômé dans le domaine de l'expérimentation animale.

En vue de futures applications cliniques qui exigent la démonstration d'efficacité de traitement sur au moins un modèle animal, ces études in vivo sont nécessaires et non contournables. Nous avons donc réduit à un minimum le nombre d'animaux nécessaires à cette étude, dans le respect de la significativité statistique des résultats que nous en attendons.

Ainsi, nous utiliserons pour ce projet de 1 an maximum un total de 45 souris C57BL/6.

18756 Les astrocytes sont les cellules gliales les plus abondantes du système nerveux central et ont un rôle primordial dans le maintien des fonctions neuronales et vasculaires dans le cerveau. La mitochondrie des astrocytes est une organelle participant activement à ces régulations en couplant en particulier le taux de respiration avec les besoins métaboliques du cerveau et la régulation fine de l'homéostasie cérébrale. Plusieurs données de notre laboratoire et de la littérature montrent que les mitochondries astrocytaires s'adaptent rapidement aux besoins métaboliques en particulier au cours du développement mais selon des modalités encore inconnues. Dans ce projet nous souhaitons analyser ces changements au cours du développement cérébral postnatal qui est une période cruciale pour la mise en place des fonctions astrocytaires.

Notre projet repose sur l'étude du modèle de souris Aldh111 CreERT2 Mitotag dans lequel les mitochondries astrocytaires expriment à leur surface une protéine fluorescente (MitoTag), permettant de visualiser sur des coupes histologiques les mitochondries dans les astrocytes et de les purifier par immunoprécipitation pour étudier leurs caractéristiques fonctionnelles et biochimiques.

Nos analyses seront réalisées aux jours postnatal 5 (P5), P10, P15, P60 qui sont des stades clés dans le développement astrocytaire chez la souris.

Notre projet comprend l'injection de tamoxifène (procédure 1) pour l'induction de l'expression du Mitotag entre les jours P1 et P4 pour 960 souris réparties ensuite pour les analyses suivantes:

- L'analyse biochimique et moléculaire des mitochondries purifiées: A partir de P5 les souris injectées par le tamoxifène sont sacrifiées par dislocation cervicale sans anesthésie préalable pour prélever le cerveau (pas de procédure)
- Une analyse histologique sur 60 souris anesthésiées puis sacrifiées par exanguination par perfusion intracardiaque de PBS (solution saline) puis de fixateur paraformaldéhyde (PFA) et/ou Glutaraldéhyde (procédure 2). Les cerveaux fixés sont prélevés et analysés en imagerie confocale et électronique.

Le nombre prévu de souris correspond à des groupes de 10 animaux de chaque stade pour les différentes analyses sur mitochondries purifiées ou de 5 animaux pour les analyses histologiques. Ce nombre a pu être déterminé sur la base de nos études précédentes et permettra d'obtenir des résultats statistiques.

Nos expérimentations seront menées sur une période de 3 années, sur la souris qui représente un très bon modèle d'étude du cerveau des mammifères. Le modèle murin est irremplaçable pour notre étude car il n'existe en effet pas de système *in vitro* reproduisant la morphologie complexe des astrocytes.

Notre projet repose sur :

-un protocole d'injection au tamoxifène sur des nouveaux nés publiés et qui permet une induction efficace du Mitotag.

-un protocole de purification des mitochondries astrocytaires à partir des cerveaux disséqués après euthanasie des animaux mis au point au laboratoire et adapté aux études biochimiques.

-un protocole de fixation après exanguination par perfusion intracardiaque qui permet d'obtenir des tissus préservés pour l'analyse histologique.

Ces protocoles ont tous été optimisés et raffinés permettant de réduire à son minimum le nombre d'animaux à utiliser. Des mesures ont été mises en place pour réduire la douleur pendant les procédures expérimentales (anesthésie, analgésie, points limites adaptés etc...). L'injection de tamoxifène n'est pas répertoriée pour causer une inflammation mais nous surveillerons les animaux pour détecter tout état inflammatoire visible par un rejet par les mères des souriceaux injectés ou une absence de prise de nourriture par le souriceau. Dans ce cas qui constitue le point limite de ce protocole, les animaux seraient immédiatement euthanasiés par dislocation cervicale après anesthésie. Dans le cas de la perfusion intracardiaque, les animaux seront profondément anesthésiés.

Les animaux seront aussi surveillés quotidiennement et placés dans un environnement propice à leur bien être: nourriture et eau *ad libitum*; cycle de lumière jour nuit; aération et température contrôlées; favorisation des comportements sociaux en mettant les animaux à plusieurs dans des cages suffisamment grandes; environnement enrichi (coton pour la nidification).

18757 Les glioblastomes (GBM) sont les tumeurs cérébrales les plus fréquentes chez l'adulte. Leur pronostic reste sombre en raison de récurrences très agressives survenant au décours d'un traitement associant radiothérapie et chimiothérapie. La présence d'une sous population de cellules à caractère « souche » (GSC : glioblastoma stem-like cells), résistantes au traitement est évoquée pour expliquer en partie ces récurrences. Par ailleurs, les GBM sont caractérisés par une importante vascularisation. La mise en place de vaisseaux associés à la tumeur apparaît précocement lors de la progression tumorale. Cette vascularisation bien qu'abondante, est morphologiquement et fonctionnellement anormale, favorisant l'installation d'une hypoxie au sein de la tumeur aidant au maintien du caractère souche des GSC. Ces dernières sont le plus souvent retrouvées à proximité des vaisseaux au sein de niches formées par les cellules endothéliales, ce qui suggère fortement que les cellules endothéliales et les GSC établissent des contacts importants pour le maintien des caractéristiques souches des GSC. Différents mécanismes de mise en place de cette vascularisation anormale ont été décrits. Il a notamment été montré que des cellules avec des caractéristiques endothéliales (cellules « endothéliales-like » dérivées de tumeurs ou TDEC (tumor derived endothelial cells)) provenaient de la transdifférenciation de GSC. Compte tenu de l'importance de la vascularisation au sein des GBM et pour le maintien des GSC, la capacité de ces dernières à réaliser une transition glio-endothéliale pourrait alors participer à la récurrence des GBM après traitement, notamment après radiothérapie. En effet, nos résultats *in vitro* montrent que les TDEC obtenues à partir de GSC irradiées ont des capacités fonctionnelles endothéliales augmentées par rapport aux TDEC obtenues à partir des GSC non irradiées.

Identifier les voies moléculaires régissant ce mécanisme de transdifférenciation radio-induite permettra de tester des inhibiteurs pharmacologiques utilisables en clinique humaine pour accroître l'efficacité des thérapies. Nous avons identifié *in vitro* des voies de signalisation impliquées dans

cette transdifférenciation radio-induite. Toutefois, dans les tumeurs des patients les cellules comme les TDEC se développent dans un microenvironnement contenant d'autres types cellulaires, des facteurs de croissances. . . au contact desquels elles se modifient, s'adaptent, diffusent. Il est donc indispensable de valider notre preuve de concept dans ce contexte plus global qu'il est impossible de reproduire in vitro.

Nous envisageons donc d'utiliser un modèle murin très largement utilisé pour valider in vivo les études in vitro, le modèle de souris immunodéficientes ou « nude » dans lequel seront injectées en sous-cutanée les cellules tumorales présentant une inactivation des voies d'intérêt mixées à une matrice extracellulaire (Matrigel). Après 15 jours, nous nous attendons à observer une diminution de la formation de nouveaux vaisseaux dans le Matrigel plug contenant les TDEC dans lesquelles les voies d'intérêt ont été inhibées. Sur la base de nos études antérieures et des données de la littérature, nous avons limité le nombre d'animaux à 8 par groupe de traitement. 5 animaux par groupe est le minimum requis pour avoir une significativité statistique. L'hétérogénéité tumorale, l'efficacité de la transdifférenciation qui peut être variable et la réponse à l'irradiation nous obligent à prévoir un nombre plus important d'animaux au départ. Le fait de prévoir des animaux supplémentaires nous épargnera de renouveler plusieurs fois les mêmes expériences. Quatre groupes seront nécessaires pour valider chacune des cibles préalablement identifiées in vitro : groupe TDEC provenant de GSC non irradiées, groupe TDEC provenant de GSC irradiées, groupe TDEC provenant de GSC non irradiées et inhibition de la cible et groupe TDEC provenant de GSC irradiées et inhibition de la cible. Nous envisageons de valider plusieurs cibles mais aussi d'étudier différents inhibiteurs spécifiques des cibles identifiées. Au total au cours de ce projet, nous utiliserons un maximum de 640 animaux.

Toutes les manipulations qui pourront être stressantes ou douloureuses pour l'animal seront réalisées après anesthésie (injection sous-cutanée, récupération des plugs).

Ce projet applique la règle des 3Rs:

- le nombre d'animaux qui sera utilisé dans ce projet a été calculé au plus juste sur la base des données de la littérature et de nos études antérieures
- les animaux seront hébergés dans un environnement qui répond à la réglementation nationale et aux directives européennes dans le domaine de l'expérimentation et de l'éthique animale. Une personne est spécifiquement dédiée au bien-être des animaux. De plus, toutes les manipulations qui pourraient être douloureuses ou stressantes pour l'animal seront systématiquement réalisées sous anesthésie (souris maintenue sous anesthésie isoflurane durant l'injection ou le retrait des plugs). Afin de réduire au maximum le stress des animaux, ils seront manipulés avec précautions et calme durant toute la durée de l'expérience. Les animaux seront observés tous les jours afin de repérer précocement les signes de souffrance. Dès l'apparition de signes de souffrance (difficulté à s'alimenter, blessures, hématomes, oedemes au niveau de l' abdomen) ou si l'état des animaux se dégrade (prostration, perte de poids, isolement, gonflement de l'abdomen) nous stopperons l'expérimentation (injection ou gavage) et les animaux seront mis à mort. A la fin de l'expérimentation, les animaux seront mis à mort après avoir récupéré le plug, soit 15 jours après l'injection sous-cutanée.
- Notre travail repose beaucoup sur des données obtenus in vitro. Toutefois, les cellules tumorales évoluent dans un microenvironnement contenant d'autres types cellulaires et des facteurs de croissance qui sont impossible de reproduire in vitro. Afin de pouvoir valider nos résultats, nous devons réaliser ces expériences dans un milieu in vivo (donc chez la souris) afin de se rapprocher le plus possible de l'environnement réel de la tumeur.

18758 Les troubles du mouvement sont des maladies neuromusculaires, souvent chroniques, qui handicapent durablement les patients et ont donc un impact sociétal important. La dystonie, par exemple, est un trouble qui se caractérise par des contractions musculaires involontaires, pouvant notamment entraîner des mouvements répétitifs ou des postures figées. La spasticité musculaire, quant à elle, est considérée comme une sur-contraction inhabituelle et involontaire du ou des muscles. Ce trouble du système nerveux central résulte en une crispation et une rigidité accrue du

muscle touché. Le traitement de ces maladies neuromusculaires implique généralement la prescription de traitements administrés oralement : le baclofène, les benzodiazépines, le dantrolène... Ces traitements systémiques comportent cependant tous des effets secondaires conséquents (sommolence, nausée, fatigue). Une solution pour diminuer ces effets secondaires consiste à administrer le baclofène via une pompe intrathécale ; cette approche est toutefois invasive. Alternativement, l'injection intramusculaire de certains produits directement dans le muscle affecté peut soulager ces malades : le phénol ou la toxine botulique. Cette approche présente de clairs avantages devant celles présentées précédemment, notamment concernant les effets secondaires. Toutefois, cette approche doit encore être optimisée : les patients et soignants attendent des myorelaxants offrant encore moins d'effets secondaires, capables d'être efficaces rapidement après l'injection, et dont les effets seraient durables. L'objectif de notre projet global est de mettre en évidence les effets bénéfiques de l'utilisation locale de différents produits myorelaxants novateurs à effet rapide et durable, sur la contraction musculaire pour les patients souffrant de troubles du mouvement comme la dystonie et la spasticité. Au cours d'une étude princeps, nos travaux préliminaires nous ont permis d'identifier au moins 5 produits présentant une activité myorelaxante d'intérêt. Chacun des produits semble avoir des caractéristiques pharmacologiques différentes : certains induisent une myorelaxation très rapide, et d'autres offrent un effet durable par exemple. Or, selon la maladie neuromusculaire, le besoin clinique est différent, et donc chaque caractéristique est plus ou moins critique. Nous visons ainsi le développement de plusieurs produits, car nous envisageons la possibilité de positionner chacun des produits finaux pour le traitement de différentes maladies neuromusculaires.

A terme, nous démontrerons les bénéfices de nos produits face aux produits de référence utilisés en clinique.

Ce projet expérimental d'optimisation concerne le second produit d'intérêt identifié suite à nos travaux exploratoires. Nous avons lors du projet APAFiS 25796 commencé l'optimisation de ce produit d'intérêt, travaillant notamment sur sa formulation. Ce travail nous a permis d'obtenir un bon bénéfice d'activité par rapport au traitement de référence (+80% selon les valeurs d'AUC).

D'autres paramètres méritent toutefois d'être étudiés pour continuer l'optimisation de ce produit, qui se compose de deux molécules myorelaxantes, FTP-001 et FTP-501 ; en particulier, il nous semble important de tester si deux injections séparées, différées dans le temps, ne pourrait pas encore augmenter l'efficacité de myorelaxation. L'objectif de cette demande est donc d'optimiser les paramètres de la cinétique d'injection des molécules composant le produit pour obtenir l'efficacité maximale. Ainsi dans ce projet, nous étudierons la possibilité d'obtenir un bénéfice d'activité encore plus grand en administrant le composé FTP-501 avant ou après l'administration du composé FTP-001 sur une gamme dynamique de temps de +/- 96h.

Il n'existe à ce jour pas de test in vitro qui permette de tester la pharmacodynamique locale de ces molécules (cinétique de l'effet myorelaxant) qui est l'élément clé de leur valeur clinique, ce qui justifie donc notre étude sur le rongeur. Nous avons au cours d'une étude précédente obtenu des résultats prometteurs, et identifié un produit candidat avec une activité myorelaxante rapide et durable. Nous avons utilisé durant ce pilote le test du « Digit Abduction Score » (DAS), un test reconnu comme pertinent pour mesurer l'activité myorelaxante d'un produit.

Dans cette étude, le produit sera injecté localement aux rats, dans les membres postérieurs pour un suivi du « digit abduction score » (DAS). Cette procédure (injection et test DAS) est brève, indolore, et peu stressante pour les animaux. Notre produit sera comparé au traitement actuel de référence.

Concernant l'application des 3R, le remplacement ne peut pas être assuré dans cette étape du programme de travail, car la pertinence des modèles cellulaires de coculture est aujourd'hui encore débattue, et de tels modèles ne prennent de toute façon pas en compte le paramètre de diffusion (qui est essentiel lorsqu'on s'intéresse au profil pharmacodynamique des composés). Le test DAS nous permet au contraire de mesurer l'activité myorelaxante tout en prenant en compte ce paramètre.

Pour la réduction, l'étude précédemment réalisée nous a donné un certain recul sur la taille des groupes nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement significatifs ; Nous utiliserons donc le nombre minimal d'animaux par groupe permettant d'arriver à une conclusion.

Concernant le raffinement, les animaux seront hébergés en groupe de 2 avec enrichissement du milieu, et surveillés quotidiennement. Nos études précédentes nous ont permis un raffinement du modèle DAS chez le rat : l'injection intramusculaire dans le membre inférieur est réalisée sous contention par un expérimentateur entraîné, et les mesures de DAS sont brèves, indolores et peu stressantes pour les animaux. Au cours de cette étude, nous souhaitons continuer à limiter au maximum le stress des animaux.

En conclusion, cette étude nous permettra donc de continuer l'optimisation de notre second produit, explorant un nouveau paramètre (cinétique), et de quantifier la valeur ajoutée de cette optimisation en utilisant 492 rats au maximum (souche : Sprague-Dawley femelles). Ces données serviront de base à la conception d'essai clinique chez l'homme.

18759 Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) sont des hémopathies malignes qui touchent près de 3/100 000 personnes par an en France. Elles se caractérisent par un blocage de maturation des cellules progénitrices hématopoïétiques et leur prolifération excessive dans la moelle osseuse et le sang. Le traitement actuel repose sur une chimiothérapie visant à réduire la masse des cellules leucémiques et qui conduit dans 50 à 80 % des cas à la rémission complète selon l'âge des patients traités et le type de LAM les affectant. Néanmoins, et malgré des chimiothérapies de consolidation, une rechute peut intervenir dans plus de 50 % des cas dans un délai de 2 à 24 mois. Le développement de thérapies complémentaires s'avère donc nécessaire et, ce projet se focalise sur le développement d'une approche permettant de renforcer la réponse immunitaire afin de favoriser l'élimination des cellules leucémiques. En effet, un répertoire T biaisé en faveur de l'expansion de certaines sous-populations clonales T ainsi qu'un nombre réduit de lymphocytes T naïfs circulants ont été mis en évidence chez les patients. L'objectif de notre étude consiste à mieux comprendre les mécanismes pouvant conduire au déficit immunitaire observé au cours de la leucémie et plus particulièrement, ceux responsables de l'atteinte du thymus, organe géniteur des lymphocytes T.

Il reste difficile de définir les différentes étapes d'évolution de la LAM chez les patients ainsi que le devenir du thymus d'où la nécessité d'un modèle expérimental animal. De plus, les propriétés phénotypiques et fonctionnelles des lignées cellulaires leucémiques diffèrent in vitro et in vivo et l'absence de système in vitro de lymphopoïèse T ne nous permettent pas de remplacer l'utilisation d'un modèle animal expérimental de LAM de souris.

Le modèle animal utilisé dans ce projet est basé sur l'injection d'une lignée leucémique C1498 à des souris syngéniques C57BL/6J ou congéniques C57BL/6J. Ly5. 1. Le nombre de cellules à injecter, les voies d'injection et la cinétique de la maladie ont été bien décrits dans la littérature ce qui nous a permis de réduire le nombre d'animaux pour cette étude à un total de 612 souris (396 syngéniques et 216 congéniques). Les souris sont hébergées en environnement SPF avec enrichissement des cages et manipulées calmement afin de réduire leur stress. Elles sont ensuite injectées par voie intra-péritonéale avec les cellules leucémiques et développent la LAM en 18 à 25 jours. Elles sont surveillées régulièrement dès le lendemain de l'injection puis quotidiennement dès le 15ème jour jusqu'à l'apparition des premiers signes de souffrance suite auxquels elles sont euthanasiées.

Les résultats obtenus à ce jour à l'aide de ce modèle, nous ont d'ores et déjà indiqué que la chimiokine CCL2 contribuait à l'atrophie thymique observée lors des LAM. Nous souhaitons, dans ce projet, approfondir le mode d'action de CCL2 et d'autres mécanismes (quantification et fonctionnalité des progéniteurs lymphoïdes, autres facteurs impliqués dans la mort des cellules thymiques) pouvant conduire à l'atrophie thymique au cours de la LAM in vivo. Nos résultats devraient ouvrir la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques permettant de renforcer la réponse immunitaire anti-leucémique.

18760 Du fait des activités humaines, de nombreuses molécules synthétiques ou non se retrouvent dans l'environnement et notamment dans les milieux aquatiques. Parmi elles, certaines sont qualifiées de perturbateurs endocriniens (PE), c'est-à-dire qu'elles sont capable d'interagir avec le système endocrinien des organismes et d'induire des modifications de fonctionnement des cellules et organes.

De nombreux travaux ont mis en évidence les effets délétères des PE chez les organismes aquatiques adultes avec des altérations de différentes fonctions fondamentales telles que la fonction de reproduction, la croissance, la prise alimentaire.... En revanche, les effets des PE au cours des stades jeunes (larves et juvéniles) sont encore mal connus et c'est particulièrement vrai chez les espèces non modèles de laboratoire.

Le bar (*Dicentrarchus labrax*) est une espèce locale, il passe une partie de son cycle de vie en régions côtières et de ce fait, est soumis aux pollutions côtières. Par ailleurs, du fait de son intérêt économique et du développement de l'aquaculture, cette espèce est très étudiée en termes de physiologie (reproduction, croissance, métabolisme...).

Le présent projet a pour objectif d'évaluer les effets de molécules PE sur le développement des individus, en combinant des études moléculaires et comportementales chez de jeunes individus (20 jours à 60 jours post eclosion). Les études seront réalisées en suivant le principe des 3R (raffiner, réduire, remplacer). Les animaux sont hébergés aux normes requises et observés quotidiennement. Au cours de ce projet de 4 années, 2520 larves de bar seront étudiées. Le nombre d'animaux nécessaires à la réalisation du projet a été réduit à son maximum compte tenu de la sensibilité et du type de méthodes utilisées pour les analyses.

18761 Les individus dépendants de la nicotine deviennent également hypersensibles aux stimuli sensoriels associés à sa consommation, comme par exemple le contexte spatial et temporel, l'odeur de fumée ou encore le goût, car ceux-ci présentent une valeur hédonique (plaisir associé à la consommation) positive à force d'associations. Les fumeurs sont très souvent attachés à « leur » marque de cigarette. L'importance de ces entrées sensorielles dans les effets addictifs de la nicotine est particulièrement soulignée dans le contexte récent avec l'explosion du vapotage, le développement des E-cigarettes et e-liquides avec de multiples arômes développés pour rendre le produit attrayant et spécifique. Néanmoins, les études précliniques qui s'intéressent à caractériser le développement potentiel d'une addiction au vapotage sont quasiment inexistantes du fait du manque de modèle animal. Tout comme les conséquences pulmonaires d'une exposition au vapotage sont méconnues. C'est donc dans ce contexte que nous développons un projet qui a pour objectif scientifique de modéliser chez le rongeur l'exposition à la E-cigarette. Il s'agira d'examiner les aspects motivationnels et hédoniques en réponse à la vaporisation de nicotine avec ou sans arôme afin de tester le potentiel addictif de ces nouveaux composés inhalés.

Dans ce contexte, nous proposons également d'identifier les bases neurobiologiques impliquées dans les processus responsables de la vulnérabilité à développer l'addiction à la nicotine vaporisée. Le tubercule olfactif (OT) et le nucleus accumbens (NAC) (qui forment le striatum ventral) sont des structures régulées par les effets de la nicotine et les propriétés émotionnelles des signaux olfactifs. Par conséquent le projet a pour objectif de questionner les mécanismes sous-jacents par l'utilisation de manipulations virales cellulaires spécifiques des populations neuronales du OT et du NAC impliquées dans les effets de la nicotine. Nous examinerons ces mécanismes par la mise en œuvre d'expériences combinant chez la souris des approches comportementales et chimogénétiques (contrôle des neurones par la clozapine-n-oxyde). Les manipulations virales seront sans conséquences sur le phénotype comportemental des animaux sans l'activation chimique spécifique.

Ce projet implique au total 790 souris mâles et femelles, et nous mettons tout en œuvre pour respecter au mieux le bien-être animal et le principe des 3R. Le modèle animal ne pouvant être remplacé, dans cette étude, par d'autres méthodes alternatives n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants, l'effectif des animaux a été réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiques, et nous avons raffiné nos procédures tout en tenant compte des variations interindividuelles et du pourcentage de perte lors des chirurgies. Les animaux sont hébergés dans

des animaleries thermorégulées et disposent d'un milieu enrichi selon les normes dictées par les Directives Européennes. Les animaux sont manipulés régulièrement afin d'inhiber tout stress et sont observés quotidiennement afin de réagir au plus vite en cas d'apparition de signes de souffrance. Etant particulièrement vigilants à la prise en charge de la douleur, nous avons mis en place des points limites spécifiques et précoces, ainsi que des mesures prophylactiques et analgésiques adaptées.

18762 L'obésité est un problème majeur de santé publique à forte prévalence dans les pays industrialisés. Les dernières données recueillies en France montrent en effet que 32% des adultes sont en surpoids et que 15% sont obèses. En marge des traitements diététiques et d'accompagnement de première intention et des solutions instrumentales ultimes comme la chirurgie bariatrique, l'arsenal thérapeutique actuel est d'autant plus réduit que des médicaments sont retirés des officines. Il est maintenant bien établi que certains neuropeptides jouent un rôle clé dans le contrôle de la prise de nourriture. De fait, nous avons démontré que l'administration intracérébroventriculaire de l'octadécaneuropeptide ODN entraîne une forte diminution de la prise de nourriture et qu'il joue un rôle clé dans l'intégration centrale des variations de la glycémie. L'objectif de notre demande rédigée conformément au guide des 3R – Remplacement, Réduction, Raffinement – est d'étendre la compréhension de la régulation de l'homéostasie glucidique par l'ODN et ses analogues chez la souris pour envisager des nouveaux traitements contre l'obésité et le diabète. Notre choix s'est tourné vers de rongeur pour 2 raisons majeures : 1/ la majorité des études visant à déterminer les mécanismes centraux mis en jeu dans la régulation centrale de l'homéostasie énergétique ont été réalisées chez la souris, et 2/ nous disposons au laboratoire d'une lignée de souris transgéniques chez laquelle le gène codant le précurseur de l'ODN a été spécifiquement invalidé. Notre travail s'oriente vers 3 objectifs principaux, 1/ déterminer le rôle de l'ODN dans le métabolisme glucidique, 2/ étendre sa fonction dans le contrôle de l'homéostasie énergétique et 3/ proposer une voie d'administration acceptable pour le patient de nos molécules synthétisées.

Dans la mesure où aucun modèle de substitution permettant de mener à bien ces différents objectifs physiologiques et pharmacologiques n'est actuellement disponible, l'ensemble de l'étude sera réalisé *in vivo* chez la souris. Le nombre maximal d'animaux nécessaire à cette étude d'envergure est estimé à 580 (380 souris sauvages et 200 souris transgéniques). Seules des souris mâles seront incluses dans les groupes expérimentaux. Les animaux femelles seront soit conservés pour la reproduction soit affectés à d'autres protocoles. Cette répartition permettra d'obtenir des résultats statistiquement analysables et indépendants du cycle ovarien. Les groupes de souris ayant reçu une administration d'ODN ou d'un de ses analogues anorexigènes seront surveillés pendant et après le protocole et une grille décisionnelle d'arrêt sera établie afin de limiter une éventuelle souffrance des animaux due à une perte de poids excessive ou un refus d'alimentation. Dans le but d'améliorer la qualité de vie des animaux et ainsi la reproductibilité de nos résultats, les souris seront maintenues en cage standard conformément à la réglementation avec un enrichissement du milieu de vie constitué de nids en copeau de peuplier. A l'issue du protocole les animaux seront mis à mort humanement en accord avec la réglementation. A terme, cette étude nous permettra d'ouvrir des perspectives thérapeutiques et faciliter la prise en charge des patients souffrant d'obésité.

18763 L'objectif de ce protocole expérimental est de mesurer la pharmacocinétique de composés.

La pharmacocinétique correspond à l'étude du devenir du composé dans l'organisme. C'est une étape obligatoire pour comprendre si le composé est réellement disponible.

Les études de pharmacocinétiques permettent l'adaptation de la dose pour obtenir les concentrations dans le sang (plasmatique) d'un composé entraînant l'effet optimum. On admet en effet qu'aux concentrations trop faibles, le composé est inefficace. L'objectif final des manipulations de pharmacocinétique est d'étudier les variations de concentration d'un composé afin d'améliorer la disponibilité de ce composé dans l'organisme et ainsi de mieux soigner.

La métabolisation et la biodisponibilité de composés (médicament ou ingrédient) sont des mécanismes très complexes qui nécessitent d'être étudiés sur des organismes vivants entiers. Le rat est un modèle de référence dans les études de pharmacocinétique car il permet d'étudier les

mécanismes complexes d'élimination d'un composé par l'organisme. En effet, l'organisme peut réagir vis-à-vis du composé qui lui a été administré en limitant son absorption, en l'inactivant et en l'éliminant par voie rénale, digestive ou pulmonaire.

Dans ce cadre, nous pensons devoir utiliser un nombre maximum de 100 animaux par an sur la base de 5 rats en moyenne par groupe pour évaluer 20 composés à une dose soit 500 animaux sur la totalité du projet.

Dans le respect de la règle des 3R, et lorsque cela est possible ces candidats sont évalués sur culture cellulaire ou organe isolé préalablement aux tests animaux afin de remplacer ou de réduire le nombre d'animaux impliqués dans les protocoles. Nous utiliserons le nombre minimum de souris nécessaire à une analyse statistique en prenant en compte la variabilité inter-individuelle. D'autre part, un raffinement des protocoles sera effectué en fonction des avancées technologiques dans le domaine. Les souris sont hébergées selon les conditions de la nouvelle réglementation 2010/63 en unités individuelles ventilées de type III ou IV avec enrichissement de l'environnement (composants de nidification et igloo). Chaque animal entrant dans une étude disposera d'une fiche individuelle de suivi sur laquelle tout traitement et observation seront reportés. L'état de santé des animaux sera évalué quotidiennement selon des critères d'apparence physique (perte de poids significative, gêne respiratoire...) et comportementaux (souris prostrée, agressivité...) définis en accord avec le comité de suivi du bien-être animal de notre établissement.

18764 Contexte médical et scientifique : L'organisation des cellules immunitaires infiltrant les tissus inflammatoires et cancéreux en structures appelées structures lymphoïdes tertiaires (TLS) est responsable du développement d'une réponse immunitaire qui peut être favorable ou défavorable pour les patients : une forte densité de TLS est associée à une aggravation de l'état de santé des patients dans le cas des maladies auto-immunes et de greffes d'organes, alors qu'elle est associée à une survie plus longue dans les maladies infectieuses et les cancers. Notre projet vise donc à définir et tester les molécules responsables de la formation et du contrôle de ces structures afin d'améliorer le traitement des patients.

Objectifs : Notre objectif principal est d'identifier des molécules capables d'induire la formation de ces TLS ("inducteurs"). Cette identification permettra de concevoir des protéines capables d'induire davantage de TLS dans les cancers pour améliorer le pronostic des patients. Notre objectif secondaire est de combiner ces inducteurs avec des molécules qui accroissent déjà les réponses des patients contre les tumeurs afin d'augmenter l'efficacité thérapeutique de ces dernières chez les patients atteints d'un cancer.

Respect de la règle des 3R : 1. Remplacement : Il n'existe pas actuellement d'approches alternatives in vitro pour provoquer la formation des structures lymphoïdes tertiaires dans les situations inflammatoires et permettant d'évaluer l'impact de l'induction de ces structures sur la réponse anti-tumorale. 2. Réduction : nous utiliserons au maximum un total de 1 551 souris sur quatre années dans les approches expérimentales envisagées. Ce nombre a été calculé au plus juste, afin de permettre des analyses statistiques fiables pour chaque expérience. Quarante-sept expériences (chaque expérience contenant des groupes de souris allant de 5 à 10 pour la quasi-totalité d'entre elles, une seule expérience comportant un groupe de 2 souris et une seule autre de 15 souris) sont prévues sur quatre ans. Ces expériences ne répèteront pas d'expériences publiées antérieurement. 3. Raffinement : transport depuis le lieu du fournisseur agréé et période d'acclimatation d'au moins une semaine avant l'expérimentation, conditions d'hébergement des souris soigneusement contrôlées (litière normale, cages ventilées individuellement, 5 animaux maximum/cage de type-III, éclairage alterné jour/nuit, régime alimentaire classique avec abreuvement automatique et enrichissement du milieu avec nids), locaux d'expérimentation agréés, surveillance quotidienne des animaux en cours d'expérimentation, expériences arrêtées dès les premiers symptômes comportementaux et physiologiques d'une santé altérée apparaissant chez les souris (motricité affectée, perte de poids, vivacité, mobilité, aspect du poil et détresse respiratoire). Un tableau de suivi du poids sera mis en place pour permettre l'euthanasie la plus précoce possible par dislocation cervicale dès l'apparition de ces symptômes. .

Les instillations intra-nasales (i. n.) seront réalisées sur des souris anesthésiées puis remises dans leur cage au moment du réveil contrôlé visuellement. L'injection par voie intraveineuse (i. v.) sera réalisée dans la veine caudale préalablement dilatée.

L'analyse de la croissance tumorale sera réalisée par imagerie IVIS chez des souris anesthésiées. Modèles d'étude : deux modèles seront utilisés : le premier consistera à induire une inflammation pulmonaire très modérée par inhalation d'une molécule d'origine bactérienne ou une souche bactérienne inactivée, classiquement utilisées pour étudier les cellules de l'immunité dans un environnement aérien inflammatoire. Le second consistera à créer des masses tumorales dans les poumons des animaux, ce qui provoque une inflammation accompagnant la croissance tumorale. Ces deux types d'inflammation sont accompagnés de l'apparition de structures lymphoïdes tertiaires que l'on peut ainsi étudier en termes de formation, de maintien, et d'impact sur l'immunité, notamment anti-tumorale dans le second modèle.

18765 Pour qu'un nouveau composé devienne un médicament sûr et efficace, un ensemble d'études expérimentales utilisant des animaux est nécessaire. Ce projet regroupera des études testant les effets de divers principes actifs sur l'organisme. Le but de ce projet étant de détecter, via des études de pharmacocinétique et/ou pharmacodynamie, les principes actifs qui présentent des propriétés de candidats-médicaments. Ces produits pourront alors être promus pour la réalisation de dossier d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) et donc, la réalisation d'études précliniques réglementaires.

REMPLETER : La pharmacocinétique et la pharmacodynamie sont, par définition, l'étude de l'interaction entre l'organisme et un principe actif. Ces interactions ne sont pas des phénomènes isolés : elles impliquent les grandes fonctions de l'organisme (dont le système circulatoire), de nombreux organes et tissus et résultent sont fonction de l'état général de l'organisme dans son environnement. C'est pourquoi, il est nécessaire d'avoir accès à l'animal dans son entier, il n'est donc pas possible de le substituer par d'autres méthodes alternatives.

La souris et le rat seront les espèces utilisées dans ce projet. En effet, ce sont des mammifères dont l'anatomie et la physiologie sont proches de l'Homme et pour lesquelles de nombreuses données existent dans la Littérature. De plus, les rongeurs sont les espèces cibles réglementaires pour les premières études précliniques d'efficacité et de toxicité lors de la réalisation de dossier d'AMM de candidats médicaments. Les études réalisées dans ce projet permettront d'obtenir davantage de données pour ces espèces pour la recherche et pourront aboutir à la mise sur le marché de nouvelles thérapies.

Les études consisteront à administrer des produits à visée thérapeutique et à surveiller pendant une période définie l'apparition d'anomalies cliniques ou modifications physiologiques, puis à mettre à mort les animaux si des études post mortem sont nécessaires.

REDUIRE : Le nombre d'animaux utilisé pour chaque étude sera le plus petit garantissant l'exploitabilité statistique des résultats expérimentaux.

Basé sur nos prévisions d'études, nous estimons utiliser 700 animaux par an avec une répartition de 350 souris et 350 rats. Cela permettra d'évaluer environ une quinzaine de produits par an. 3500 animaux (1750 souris et 1750 rats) seront utilisés pour la totalité du projet.

RAFFINER : Pour raffiner le bien-être des animaux, une période d'acclimatation (>48h) sera réalisée à leur arrivée dans l'animalerie. Leur environnement sera adapté à leurs conditions de bien-être avec enrichissement adapté à leurs besoins. Si les animaux n'ont pas été identifiés préalablement, ils le seront à leur arrivée en zone d'étude, selon les procédures en vigueur des lieux d'expérimentation (tatouage aux phalanges, poinçons et/ou encoches à l'oreille, marqueur sur la queue/le pelage, puces).

Les techniques expérimentales pouvant engendrer du stress seront le plus possible limitées et feront l'objet d'une anesthésie si cela est nécessaire, en accord avec les recommandations éthiques internationales. Les animaux seront observés quotidiennement et pesés tout au long des procédures pour anticiper toute dégradation de leur bien-être. Des mesures spécifiques seront

prises le cas échéant, sur avis du vétérinaire référant si besoin (traitement/soins, enrichissement spécifique, etc.).

Pour éviter toute douleur et/ou souffrance inutile des animaux, des points limites généraux ont été définis et certains points limites spécifiques pourront être fixés au cas par cas en fonction des études et des modèles animaux.

Pour ce projet, les animaux pourront provenir d'élevages standards ou de lignées transgéniques avec ou sans phénotype dommageable. Dans ce dernier cas, des mesures spécifiques seront prises pour limiter les dommages du phénotype, en accord avec les recommandations éthiques internationales et les objectifs de l'étude.

18766 L'hypertension pulmonaire est une maladie progressive grave qui touche les petits vaisseaux sanguins des poumons et dont le symptôme principal est l'essoufflement à l'effort. Ces vaisseaux transportent le sang à partir du cœur vers les poumons, où il se charge en oxygène (O₂) pour alimenter tout l'organisme. La prévalence de cette maladie est estimée de 15 à 25 cas pour un million d'habitants et le pic de fréquence se situe entre 30 et 40 ans. L'évolution naturelle de cette maladie varie fortement d'un individu à l'autre, mais elle conduit à une insuffisance cardiaque droite responsable du décès du patient seulement quelques années après la déclaration de la maladie. De nombreux médicaments permettent de réduire les symptômes de l'hypertension pulmonaire, cependant aucun permet à ce jour un traitement complet de la maladie. Lorsque l'hypertension pulmonaire menace la vie du patient, ces patients peuvent subir une greffe cœur-poumon. Ainsi, la découverte de nouveaux médicaments apparaît primordiale afin de lutter ou diminuer le développement de cette maladie. Avant de tester ces molécules thérapeutiques chez les patients atteints d'hypertension pulmonaire, il est crucial d'appréhender au préalable la posologie et l'efficacité de ces molécules sur un modèle animal. Toutes les procédures seront pratiquées en utilisant des anesthésiques et des analgésiques. Les fonctions cardiovasculaires seront étudiées par des méthodes non invasives permettant de limiter le nombre d'animaux utilisés. Les animaux sont mis à mort en fin d'expérimentation et les tissus prélevés sont partagés afin de minimiser encore le nombre d'animaux utilisés. Des expériences de biochimie et de biologie moléculaire à partir des différents tissus collectés et des études sur cellules isolées seront effectuées dans la mesure du possible afin de réduire le nombre d'animaux utilisés. Ainsi, toutes les procédures de ce projet sont conçues pour respecter le principe de 3 R (Réduction, Raffinement, Remplacement). De l'enrichissement sera ajouté dans les cages des animaux. Les animaux seront surveillés quotidiennement et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer que les animaux ne subissent aucun stress. Le nombre total de rats utilisés sera de 200 sur l'ensemble de l'étude en combinant plusieurs approches expérimentales par différents expérimentateurs sur le même animal.

18767 La maladie de Menkès est une maladie rare dont l'incidence est estimée à 1 patient pour 250 000 naissances. Cette maladie est provoquée par une mutation d'un gène localisé sur le chromosome X. L'absence du transporteur intestinal et cérébral du cuivre (ATP7A) entraîne, chez l'enfant, une carence généralisée en cuivre, générant une hypotrophie sévère, des cheveux caractéristiques fins et tortillés et une encéphalopathie convulsivante sévère qui est la cause du pronostic grave de cette maladie. En effet, le cuivre est un métal impliqué dans un grand nombre de réactions biochimiques intervenant dans la respiration cellulaire, le métabolisme du fer, le métabolisme des pigments, des neurotransmetteurs, la synthèse de certaines protéines, de certains tissus conjonctifs et les réactions anti-oxydantes. Ainsi, une carence en cuivre s'exprime par un déficit de ces différentes activités biologiques.

Dans ce contexte, il existe plusieurs modèles murins de la maladie de Menkès, dont un qui présente une mutation sur le gène ATP7A, entraînant ainsi une carence en cuivre chez les mâles, et responsable de l'apparition d'un phénotype spécifique comprenant un pelage clair avec des poils anormaux, des tremblements et une apathie importante. Ces mâles peuvent également souffrir de graves troubles aortiques et squelettiques, souvent responsable de leur mortalité. En effet, la

mortalité périnatale des mâles atteints est importante avec une durée de vie pouvant varier de 3 à 5 semaines.

Le seul traitement actuel pour les patients atteints réside dans l'administration d'histidinate de cuivre permettant une normalisation des concentrations en transporteur plasmatique du cuivre mais sans amélioration de l'état clinique neurologique des patients. Cette absence d'amélioration clinique s'explique par l'impossibilité pour le cuivre seul de passer la barrière hémato-méningée qui entoure le cerveau. C'est pourquoi, notre projet vise à tester chez la souris une nouvelle thérapeutique basée sur l'administration sous-cutanée d'un transporteur synthétique du cuivre (TSC) capable de franchir la barrière hémato-encéphalique. Nous avons déjà vérifié, dans une étude précédente, la bonne tolérance et le passage cérébral de cette nouvelle molécule. Plus précisément, les résultats ont montré un assombrissement du pelage qui est un indicateur du métabolisme correct du cuivre, ainsi qu'une amélioration de l'activité physique globale et une augmentation de l'espérance de vie jusqu'à au moins 8 semaines, période d'arrêt déterminée initialement au cours du projet précédent. Ces premières études ont permis de déterminer une dose et un rythme d'administration optimaux. C'est pourquoi, la phase 2, objet de la présente demande, vise à évaluer l'efficacité de ce traitement sur l'espérance de vie, l'évolution du poids, l'activité motrice et cognitive par le biais des tests neurocomportementaux et par les analyses biochimiques, anatomopathologiques et enzymologiques à effectuer sur les tissus des animaux de l'étude.

1. Remplacement : Il n'existe pas d'alternative d'approche in vitro car le projet porte sur l'étude de l'allongement de la durée de vie et l'amélioration du comportement de l'animal porteur de la maladie de Menkès en fonction de la réponse au traitement.

2. Réduction : L'étude comportementale portera sur 50 souris de laboratoire, réparties en 5 groupes de 10 mâles dont 2 groupes de 10 souris saines (sauvages) et 3 groupes de 10 souris mutantes (hémizygotés). Cette cohorte de 50 souris mâles sera étudiée et mise à mort une fois les tests comportementaux terminés, à l'âge de 2 mois. L'étude sera réalisée avant 2 mois si les points limites sont atteints avant cette échéance. Il s'agit du nombre d'animaux nécessaires pour mener à bien cette étude afin d'obtenir une puissance statistique suffisante.

3. Raffinement : Toutes les procédures expérimentales (10 procédures seront appliquées : la gestion de la lignée mutante qui présente un phénotype dommageable pour l'animal, l'injection du TSC en sous-cutanée et répétée 5 fois par semaine, et 8 tests pour l'étude comportementale, mise à mort) auront lieu dans l'animalerie, dans un environnement sécurisant pour l'animal. Une procédure d'estimation et suppression de la douleur est mise en place : différents éléments visuels chez l'animal sont évalués afin d'établir un score qui permet d'anticiper et d'éviter d'atteindre les points limites déterminés au préalable, et qui tient compte des signes éventuels de mal-être (isolement, yeux fermés, dos voûté, poils hérissés, immobilité, perte de poids, yeux et abdomen creux). En fin de protocole, les animaux seront mis à mort et des organes prélevés pour permettre des analyses biochimiques, enzymologiques et anatomopathologiques.

18768 Le microbiote intestinal, anciennement appelé flore intestinale, est l'ensemble des micro-organismes du tractus digestif des animaux. Un microbiote intestinal en équilibre assure la santé intestinale, le développement physiologique et le bien-être de l'individu. En particulier, le microbiote intestinal et ses métabolites contribuent au développement et au fonctionnement du système immunitaire. Toute perturbation dans cette communication favorise les maladies et les infections.

Bien que largement étudiés chez les mammifères, ces concepts sont mal définis chez le poulet, qui représente la source de protéine animale la plus consommée au monde. Dans les couvoirs industriels, les poussins sont éclos dans des environnements extrêmement propres, ne permettant pas la transmission naturelle du microbiote par les poules, ce qui empêche la mise en place précoce d'un microbiote intestinal bien équilibré. Il s'avère donc essentiel d'étudier comment le microbiote intestinal contribue au développement immunitaire et à la robustesse des poulets.

En comparant des oiseaux avec microbiote (holoxéniques) et sans microbiote (axéniques) de différents âges, ce projet vise à définir l'impact du microbiote intestinal sur le développement du

système immunitaire et de son fonctionnement vis-à-vis des infections virales de l'élevage telles que l'influenza aviaire.

Nos objectifs sont (i) de définir dans quelle mesure le microbiote intestinal (présence versus absence) promeut l'immunité innée suivant un « axe intestin-poumon »; (ii) d'identifier, en particulier, les métabolites produits par le microbiote intestinal qui atteignent les organes périphériques (dont le poumon) et d'étudier leur activité sur les cellules de l'immunité innée et (iii) d'explorer le rôle du microbiote intestinal (via le renforcement de l'immunité innée) dans la résistance du poulet à l'infection respiratoire par les virus influenza aviaries.

Ainsi, il sera possible de proposer des pratiques d'élevage plus rationnelles visant à favoriser l'implantation précoce d'un microbiote intestinal favorable à une santé robuste comme défini d'après les données obtenues sur le lien microbiote intestinal-métabolites-immunité. L'objectivation de critères précis permettra d'évaluer l'effet du contact précoce avec le microbiote de la poule ou de l'alimentation, et de définir de nouveaux probiotiques.

Ce projet utilisera 601 poulets de la souche de poule pondeuse PA12 White Leghorn sur une durée de 5 ans.

Ces expérimentations répondent aux exigences de la règle des 3 R :

Remplacement: Le dialogue microbiote-réponse immunitaire-influenza aviaire résulte d'un ensemble complexe de paramètres qu'il est impossible de remplacer par des approches in vitro ou in silico.

Réduction : Le nombre d'animaux par lot sera adapté aux buts de l'expérimentation et permettra d'identifier les paramètres immunitaires régulés par le microbiote intestinal. Ce nombre d'animaux est optimisé en s'appuyant sur les résultats obtenus lors d'autres expérimentations. D'autres équipes de recherche seront informées des expérimentations afin qu'elles puissent réaliser des prélèvements autres que les nôtres sur les animaux non infectés.

Raffinement : Les animaux seront maintenus en groupe dans des cages ou des isolateurs adaptés en nombre et en taille, dans des conditions environnementales contrôlées, avec nourriture et boisson à volonté. Ils bénéficieront d'un enrichissement social (élevés en groupe) et du milieu avec des jouets à picorer et des petits perchoirs.

18769 Les tumeurs cérébrales appelées glioblastome étant de très mauvais pronostic, des recherches restent indispensables pour améliorer leur diagnostic et pour aider à la prise en charge des patients. La détection de ces tumeurs est réalisable grâce à l'utilisation de l'imagerie combinée TEP/NIRF (tomographie par émission de positons / fluorescence proche infrarouge) qui offre un potentiel indéniable pour effectuer à la fois une cartographie des cellules tumorales et un ciblage de celle-ci. Une telle combinaison conjugue le diagnostic non invasif de l'imagerie corps entier par TEP avec la chirurgie intra-opératoire guidée par l'imagerie de fluorescence ou l'histopathologie ex vivo. Pour mettre en œuvre cette double approche diagnostique, nous avons développé des molécules d'imagerie bimodale que nous souhaitons évaluées pour leur caractère innovant.

Nos molécules sont des outils originaux d'imagerie bimodale pour l'imagerie combinée TEP/NIRF élaboré sur la base de marqueurs ayant une structure chimique unique rassemblant un dérivé de la cyanine et de fluor-18 (radiotracer) lié à un centre de carbone. Un peptide ciblant les intégrines est utilisé ce qui rend notre molécule spécifique aux tumeurs de glioblastome.

Nos molécules ont fait l'objet d'une étude in vitro préalable dont la pertinence des résultats à déterminer la réalisation de cette étude in vivo. Cette étude ne peut cependant pas être modélisée exclusivement à l'aide de cultures cellulaires in vitro et la mise en œuvre de modèles in vivo, tels que les modèles de greffes intracérébrales de tumeurs humaines chez la souris, est nécessaire pour valider au niveau préclinique les stratégies combinant le diagnostic d'une tumeur (à l'aide de la TEP) et son traitement par chirurgie intra-opératoire guidée par l'imagerie de fluorescence et ceci en utilisant un seul produit (Remplacement). La difficulté posée par l'utilisation des modèles de tumeurs intracérébrales in vivo reste le suivi de la croissance tumorale au cours du temps ainsi que son ciblage.

L'objectif du projet est de caractériser la meilleure molécule innovante développée pour l'imagerie bimodale TEP/NIRF et pré-sélectionnée in vitro, sur un modèle de glioblastome humain (lignée cellulaire U87-MG) greffé chez la souris nude. L'évaluation portera sur sa biodistribution sur corps entier au cours du temps par fluorescence (1h à 24h) ainsi que sa sélectivité tumorale sur des modèles de tumeurs intracérébrales (fluorescence et TEP).

Les techniques d'imagerie non-invasives permettront de réduire le nombre d'animaux utilisés en expérimentation puisqu'elles permettent de réaliser des suivis dans le temps sur un même animal (Réduction).

Ainsi, au maximum 48 souris immunodéficientes recevront une greffe de cellules cancéreuses U87-MG selon des protocoles maîtrisés par le laboratoire. Le développement des tumeurs implantées en sous cutanée permettra une première évaluation de la biodistribution sur corps entier par imagerie de fluorescence avant d'envisager une étude de la sélectivité tumorale sur des tumeurs intracérébrales de plus petit volume qui seront suivies par microscopie intravitale de fluorescence. De même une imagerie corps entier des souris sera réalisée par TEP pour évaluer la possibilité d'utiliser l'imagerie bimodale avec cette molécule. Le bien-être des animaux fera l'objet d'un suivi quotidien, les souris seront anesthésiées lors des procédures d'implantation des tumeurs et d'imagerie limitant ainsi le stress de animaux ainsi que le choix de points limites suffisamment précoces comme par exemple une perte de poids de plus de 10% sur 3 jours (Raffinement). Tous les animaux seront mis à mort à la suite des séquences d'imagerie soit 48h après l'administration des molécules d'imagerie.

18770 Les cellules dendritiques sont des cellules phagocytaires qui jouent un rôle clef dans l'initiation des défenses immunitaires contre les tumeurs. En effet, les cellules dendritiques des tissus capturent les cellules tumorales et présentent les antigènes tumoraux aux lymphocytes T pour déclencher la réponse immunitaire. Les monocytes quant à eux sont les précurseurs directs d'une autre population de cellules phagocytaires appelée macrophages et qui, au contraire des cellules dendritiques, peuvent inhiber la réponse immunitaire anti-tumorale. Un enjeu primordial de la recherche contre le cancer est de mieux comprendre les interactions moléculaires et cellulaires entre la tumeur et les cellules phagocytaires qui l'infiltrent. En particulier, dans le cadre des thérapies anti-cancéreuses, nous souhaitons 1) augmenter la quantité des cellules dendritiques favorables aux réponses immunitaires dirigées contre le cancer ; et 2) diminuer la production des macrophages qui favorisent la croissance tumorale. Cela est possible en étudiant les mécanismes de production de ces cellules qui ont lieu dans la moelle osseuse à partir des cellules souches dites hématopoétiques (HSC).

Dans ce projet, nous étudierons les mécanismes moléculaires et cellulaires qui permettent aux HSC de la moelle osseuse de produire des cellules dendritiques et des macrophages lors du développement tumoral.

Cette question sera adressée grâce à l'utilisation de modèles murins de tumeur de la glande mammaire. En effet, chez l'homme et la souris, les tumeurs mammaires sont largement infiltrées par les macrophages alors que les cellules dendritiques restent une population minoritaire. Nous allons étudier les HSCs de la moelle osseuse de souris développant des tumeurs du sein, mesurer leur renouvellement et leur capacité à produire des cellules dendritiques et des macrophages. Nous étudierons également les signaux émis par les tumeurs qui impactent la production des cellules dendritiques et des macrophages par les HSCs. Ce projet permettra de mieux comprendre les mécanismes de production des cellules dendritiques et des macrophages et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques permettant d'inhiber la production des macrophages et d'augmenter la production de cellules dendritiques. En parallèle, nous nous intéresserons aussi aux mécanismes par lesquels les macrophages inhibent les réponses immunitaires dans la tumeur. Nous développerons des stratégies pour bloquer l'effet inhibiteur des macrophages.

En conclusion, ce projet nous permettra de mettre en lumière les mécanismes tumoraux qui activent la production des macrophages. Cela nous permettra de mieux les cibler dans le cadre d'interventions thérapeutiques visant à augmenter les réponses immunitaires contre les cancers.

Nombre d'animaux pour ce projet sur 5 ans : 627

Remplacer : La production des cellules dendritiques et des macrophages a été étudiée chez la souris *in vitro* et *in vivo* dans des situations non-pathologiques ou d'infection par des pathogènes. Cependant les mécanismes de production des cellules dendritiques et des macrophages lors du développement tumoral restent mal connus. Ni les modélisations mathématiques, ni les systèmes *in vitro* ne permettent d'étudier la production et la circulation des cellules phagocytaires (cellules dendritiques et macrophages) dans le sang et les mécanismes de leur entrée et leur différenciation dans les tumeurs.

Réduire : les résultats attendus à l'issue de ce projet n'ont pas été publiés à ce jour dans la littérature scientifique. Le nombre d'animaux utilisés pour mener à bien ce projet a été réduit au minimum pour chaque modèle tout en assurant des résultats statistiquement interprétables.

Raffiner : La lignée de souris utilisée développe des tumeurs mammaires très progressivement sur 5 mois. Les animaux seront suivis régulièrement afin d'assurer leur bien-être et pour suivre les éventuels signes de souffrance ou de stress. Des soins supports tels les aliments gélifiés et la réhydratation seront introduits dans les cages en cas de souffrance. Les expérimentations seront arrêtées avant l'atteinte des points limites définis.

18771 Les glioblastomes (GBM) sont les tumeurs cérébrales les plus fréquentes et les plus agressives chez l'adulte. Malgré un traitement lourd associant chirurgie, chimiothérapie et radiothérapie, la survie moyenne des patients n'excède pas 15 mois en raison de l'apparition quasi-systématique de récurrences.

La très grande hétérogénéité et la forte plasticité de ces tumeurs contribuent à ce mauvais pronostic. Un autre facteur clé dans la croissance tumorale et sa réponse au traitement est le microenvironnement tumoral (cellules non tumorales entourant et interagissant avec la tumeur).

Bien que de nombreux modèles d'étude *in-vitro* aient été développés, leur principale limite est la conservation de l'hétérogénéité tumorale et l'absence fréquente du microenvironnement tumoral. C'est pourquoi les études en cancérologie requièrent encore l'utilisation d'un grand nombre d'animaux dans des études *in-vivo*. Néanmoins depuis quelques années une nouvelle approche expérimentale permettant de concilier conservation du micro environnement et test de plusieurs conditions expérimentales sur une tumeur dérivée d'un même animal s'est développée : l'utilisation d'organoïdes. Le principe général de cette approche est de faire croître des tumeurs dans un nombre réduit d'animaux, de les sacrifier avant l'apparition de symptômes puis de mettre en culture ces tumeurs avec leur microenvironnement. Ces cultures peuvent être maintenues plusieurs semaines et conservent entièrement l'hétérogénéité de la tumeur parentale ainsi que le microenvironnement qui peut varier d'un individu à l'autre. Ainsi, à partir d'une même tumeur et son microenvironnement propre plusieurs conditions expérimentales peuvent être testées et analysés, ce qui est un avantage important par rapport aux études *in-vivo* classiques dans lesquelles chaque tumeur et microenvironnement sont sujets à de fortes variations. A minima une condition expérimentale et son contrôle pourront donc être étudiées *in-vitro* à partir de la même tumeur, réduisant le nombre d'animaux nécessaires pour pallier à la variabilité inter-individus.

Ce projet, d'une durée de 5 ans, a pour but d'utiliser le modèle d'organoïdes pour étudier le rôle du microenvironnement et de la plasticité tumorale en réponse aux traitements.

L'hypothèse de travail est que le microenvironnement favorise la plasticité des cellules tumorales, leur conférant des capacités supérieures d'adaptation aux thérapies, et donc une meilleure survie.

Pour répondre à cette question, des cellules de glioblastome seront greffées dans le cerveau de souris adultes sous anesthésie et analgésie afin d'induire des tumeurs. Pour mieux étudier l'hétérogénéité tumorale, 5 types différents de cellules de glioblastome seront utilisés. Les tumeurs seront ensuite récupérées avant l'apparition de tout symptôme et mises en culture *in-vitro* sous forme d'organoïdes.

Pour pouvoir étudier l'influence du microenvironnement, ces organoïdes seront comparés à un autre modèle complémentaire qui n'a pas de microenvironnement, des sphéroïdes de matrigel réalisées avec la même lignée cellulaire que celle qui est greffée dans les souris.

La croissance des tumeurs chez la souris sera contrôlée par l'analyse régulière d'un marqueur urinaire et/ou sanguin, et les souris seront sacrifiées avant d'observer des effets délétères (pertes de poids/apathie) à un seuil de marqueur préalablement défini.

Le nombre de souris pour ce projet est estimé à 495 car il inclut les mises au point de ce modèle ainsi que les différentes expériences avec un nombre de réplicas suffisants, pour les 5 lignées différentes.

Cette approche nous permettra de :

Remplacer : A partir d'une seule tumeur, un grand nombre d'expériences peut être réalisé là où il en fallait plusieurs.

Réduire : Ce modèle permet d'obtenir du matériel amplifiable, réduisant la quantité d'animaux nécessaire à l'étude.

Raffiner : Nous sacrifierons les animaux avant l'apparition de tout symptôme et de toute souffrance, améliorant ainsi fortement la qualité de vie des animaux en comparaison à des études classiques en cancérologie. Les opérations auront lieu dans les conditions d'anesthésie et d'analgésie les plus rigoureuses. En accord avec les recommandations internationales, en particulier dans le domaine de la cancérologie, les animaux sont suivis individuellement et régulièrement (de 2 fois par semaine à quotidiennement selon les modèles) afin d'assurer leur bien-être. Celui-ci sera évalué selon une grille de score. Les expérimentations seront stoppées à l'apparition de toute marque de souffrance.

18772 Les maladies parasitaires liées aux vers parasites touchent aussi bien l'Homme que les animaux. L'impact de ces vers parasites sur la santé animale est significatif puisqu'ils sont responsables de symptômes cliniques de type perte de poids, anémie, diarrhée voire la mort des animaux les plus atteints. L'utilisation massive de vermifuges a conduit à l'apparition de vers résistants aux traitements et rend actuellement le contrôle de ces parasites relativement limité pour l'élevage moderne conventionnel. Quant à l'agriculture biologique, elle favorise la mise en place de mesures de prévention et proscrit en préventif l'utilisation de médicaments vétérinaires allopathiques chimiques de synthèse. Que ce soit dans l'un ou l'autre de ces systèmes de production, la santé des animaux peut être mise à mal par les parasites entraînant un mal-être important voire une souffrance dans les cas les plus extrêmes. Il est donc urgent de trouver de nouvelles solutions de contrôle efficaces, plus naturelles et respectueuses de l'environnement.

Pour cela, nous développons des projets de recherche qui visent à mieux comprendre la biologie du parasite ainsi que les mécanismes impliqués dans l'apparition de vers résistants mais également l'effet antiparasitaire de produits naturels. Au laboratoire, le modèle ovin est couramment étudié mais dans l'optique de tester de nouvelles molécules aux propriétés antiparasitaires, le modèle murin est très pertinent. En effet, il est possible d'utiliser la souris que ce soit pour les tests in vitro de première intention (mise en évidence de produits actifs sur les stades libres du parasite) ou les preuves de concept menées in vivo. Ce modèle présente de nombreux avantages comparé au modèle ovin (infrastructures, quantités de produits naturels à tester, approvisionnement en animaux, coût. . .). Nous avons donc mis au point un modèle murin sur lequel nous pouvons inoculer un nématode gastro-intestinal, *Heligmosomoïdes polygyrus bakeri*, phylogénétiquement proche des parasites ovins. Dans un second temps, les résultats pourront être généralisés à l'ensemble des trichostrongles avec un retour sur les espèces cibles.

Actuellement, les macro algues sont sujettes à un fort engouement en nutrition et santé humaine, par leur richesse en nutriments et l'effet avéré de certaines molécules sur la protection de l'organisme : activités anti-oxydante, antimicrobienne, antivirale, antiparasitaire... Cet intérêt pour leur potentiel touche également le secteur de la nutrition animale. De plus, les effets bénéfiques de certains composés des macro algues sur la santé des organismes peuvent également constituer une alternative à l'utilisation des traitements médicamenteux en élevage. Cependant, les effets de

l'introduction des macro algues dans la ration sur les performances et la santé des animaux d'élevage restent à documenter.

En première intention, une série de tests in vitro a permis de mettre en évidence une activité antiparasitaire de plusieurs extraits de macro algues. Le protocole proposé ici est une étude préliminaire qui vise à choisir le meilleur candidat parmi 4 extraits sélectionnés in vitro en servant de preuve de concept (rechercher si les extraits interagissent avec la cible souhaitée et s'ils agissent sur l'affection concernée).

Deux critères seront évalués : - Effet sur les performances zootechniques (croissance des animaux dans un contexte infectieux) - Effet sur la sensibilité à un pathogène (niveau de contamination : nombre d'œufs de parasite excrété dans les fèces au cours du temps et/ou nombre de vers hébergés par la souris). Les effets seront étudiés par comparaison à un groupe recevant un aliment standard pour souris également soumis à l'infestation par le parasite.

Dans ce projet nous utiliserons des souris C57BL/6J mâles âgées de 4 semaines. Nous envisageons d'utiliser un total de 50 souris C57BL/6J pour cette expérience. Ce nombre d'animaux a été réduit au minimum. Il correspond au nombre minimal permettant d'obtenir des résultats significatifs avec les tests statistiques utilisés.

Remplacement : le ver parasite *Heligmosomoides polygyrus bakeri* est un parasite obligatoire dont le cycle de développement ne peut être réalisé in vitro.

Réduction : afin de minimiser au maximum les nombres d'animaux nécessaire, une série de tests in vitro a permis de sélectionner les extraits de macro algues les plus prometteurs (4 parmi 30 candidats), d'autre part la mise au point du modèle murin permet de limiter le recours aux ovins (les 2 parasites étant phylogénétiquement très proche)

Raffinement : les souris (5 par cage) sont hébergées en portoirs ventilés dans des cages contenant du sopalin pour enrichir le milieu (leur permettant de réaliser un nid). Elles seront suivies sur une base quotidienne. Si nous constatons des signes d'inconfort liés au traitement (trouble du comportement, perte de poids supérieure à 20%...), les souris concernées seront immédiatement sorties de l'expérience.

18773 Contexte et objectifs :

Le projet a pour but d'évaluer l'innocuité et/ou l'immunogénicité de candidats médicaments chez les espèces bovine, caprine, ovine et porcine ainsi que leurs impacts sur l'environnement (animaux en contact).

Pour qu'un médicament soit commercialisé, il faut démontrer que celui-ci présente un bilan risques/bénéfices favorable. Les études nécessaires comprennent, entre autres, des études menées sur les animaux. Ces études sont réalisées sur l'espèce cible du produit développé (ici les ruminants et les porcins) ou sensible à la (aux) souche(s) utilisée(s) (espèces potentiellement différentes de celle de l'espèce cible), ce qui permet de s'approcher au maximum des conditions réelles d'utilisation.

Ces différentes études sont, pour beaucoup, exigées par la Pharmacopée Européenne et les réglementations nationales et internationales concernant les vaccins.

Avantages/dommages :

La finalité de ces études est la mise au point de médicaments d'un niveau d'innocuité et d'efficacité satisfaisant. Ceux-ci sont essentiels en élevage afin de protéger les animaux contre les maladies infectieuses et de garantir les performances zootechniques et économiques.

Les procédures peuvent occasionner du stress et de la gêne en fonction de l'occurrence des prélèvements et administrations. Afin de limiter les contraintes engendrées par ces actes, les procédures sont réalisées par des opérateurs hautement qualifiés.

Informations sur les espèces utilisées :

En se basant sur l'historique des produits testés, sur les exigences réglementaires et les projets de Recherche et Développement à venir, le nombre d'animaux utilisés sur 5 ans est estimé, au plus, à 2600 bovins, à 1300 caprins, à 1450 ovins et à 3500 porcs.

Mise en œuvre des 3R's :

Remplacement : Lorsque cela est possible, une première étape consiste à tester in vitro différents candidats. Ceci permet une première sélection de ces derniers, réduisant ainsi le nombre d'animaux utilisés. Une série de tests analytiques permet de garantir un certain niveau de sécurité pour les animaux recevant le produit. Un recueil d'informations est aussi apporté par la bibliographie lorsque cela est possible.

Réduction : Concernant les études réglementaires, le nombre minimum d'animaux à inclure est fixé par les textes. En amont, lors des phases recherche, les effectifs sont évalués au plus juste (historique, définition des objectifs, tests statistiques de puissance...) de façon à limiter le nombre d'animaux et les études non conclusives.

Raffinement : Dans ce projet, aucune douleur ou souffrance n'est attendue. Le personnel est formé et compétent pour identifier les cas dans lesquels l'animal n'est plus dans son état physiologique optimal. Les conditions d'hébergement sont adaptées à l'espèce et à l'âge des animaux afin de maximiser leur confort et leur bien-être. Dans la majorité des cas, les animaux sont hébergés en groupe. La Structure en charge du Bien-Etre Animal (SBEA) garantit l'amélioration des techniques de soins et des conditions de vie pour les animaux.

18774 De nombreuses études scientifiques ont considéré l'importance des stades précoces pour la relation homme-cheval ultérieure et ont traité des questions telles que quand et comment manipuler les poulains. Cependant, bien que le jeune âge soit connu chez les Mammifères pour avoir un impact durable sur le comportement, bon nombre des comportements d'un individu est déjà impacté par son expérience prénatale. Par exemple, les systèmes sensoriels se mettent en place pendant le développement embryonnaire et de fait les stimulations externes perçues pendant la phase prénatale peuvent déjà moduler le comportement ultérieur d'un individu. De plus, le développement embryonnaire se déroulant au sein de l'organisme maternel chez la grande majorité des mammifères (dont le cheval), l'embryon peut aussi être influencé par l'état interne de sa mère. Dans ce présent projet mené chez le cheval, nous envisageons donc d'examiner si le poulain est (1) capable de percevoir et mémoriser des voix humaines auxquelles il est exposé au cours de la vie fœtale, et si (2) l'état émotionnel (positif ou négatif) de la mère (gestante) lors de la diffusion d'une voix donnée peut moduler les réactions ultérieures du poulain vis-à-vis de cette voix. Cette étude sera réalisée sur 25 dyades (mère-jeune). En fin de gestation, les juments gestantes seront soumises de manière répétée à des traitements associant des contacts humains positifs et négatifs avec la diffusion d'une voix par hautparleur. Une voix sera associée à un stimulus positif (distribution de nourriture) pour la jument, l'autre à un stimulus négatif (frustration alimentaire). Nous étudierons pendant le traitement les réactions comportementales (comportements d'approche, de retrait, agressivité...) des juments afin d'évaluer leur état interne. Après la naissance des jeunes, nous mesurerons les réactions comportementales (approchement, évitement) des poulains lors de la diffusion d'une voix non familière et des voix humaines associées respectivement à une expérience positive et négative de la mère pendant la gestation. Différentes situations de test seront ainsi réalisées au cours du premier mois de vie : test de repasse, test de choix entre deux voix, test de diffusion en présence d'un humain. Dans le respect de l'éthique, notre projet respecte au mieux la règle des 3R. **Remplacement** : étant donné que nous nous intéressons au comportement, nous ne pouvons pas éviter l'utilisation d'animaux vivants. **Réduction** : le nombre d'animaux utilisés (25 dyades mère-jeune) permettra la prise en compte de possibles variations individuelles, chaque individu sera également son propre témoin ce qui permet de limiter le nombre d'animaux utilisés. **Raffinement** : notre étude n'implique aucune méthode invasive ou douloureuse. Les animaux évoluent dans des conditions d'élevage classique et seront suivis quotidiennement pendant toute la durée du protocole par du personnel formé et expérimenté afin de s'assurer de leur bon état de santé physique et mentale.

18775 Parmi les tissus des organismes vertébrés, le muscle squelettique est l'un des plus remarquables parce qu'il possède de grandes capacités régénératrices, ce qui font de lui un organe très plastique. À l'origine de cette plasticité musculaire se trouve un réservoir de cellules souches, dont les plus

étudiées à ce jour sont les cellules satellites qui, comme leur nom l'indique, se localisent en périphérie des fibres musculaires. La maintenance de la population des cellules satellites est cruciale à la régénération musculaire. Avec ce projet, nous souhaitons étudier le rôle des protéines Hira et Daxx qui sont impliquées dans l'organisation structurel de l'ADN. Le maintien de cette structure est déterminant pour les fonctions de la cellule et pour l'identité cellulaires. Notre projet est d'étudier le rôle de Hira et Daxx pendant la régénération du muscle squelettique. Dans un but de suivre le principe des 3R et de réduire et remplacer l'utilisation excessif d'animaux impliqués dans ces expériences nous avons établi des protocoles in vitro (sans utilisation d'animaux) basés sur des cellules musculaires immortalisés que nous avons modifié au niveau de l'ADN pour annuler les fonctions de Hira ou Daxx. Nous avons caractérisé et étudié ces lignées pour cibler les expériences les plus pertinentes à développer chez la souris ce qui permet la réduction du nombre d'animaux à utiliser. Les procédures décrites visent à analyser et caractériser les fonctions de Hira et Daxx sur les cellules satellites et sur les fibres musculaires au cours de la régénération du muscle. Pour essayer de minimiser la souffrance et le stress induit aux animaux, des analgésiques seront administrés avant et après la procédure d'induction de la régénération musculaire. De plus, de la nourriture humidifiée sera ajoutée dans les cages les 3 premiers jours pour faciliter l'alimentation des animaux qui peuvent présenter une mobilité réduite pendant cette période. Notre étude fera appel à un total de 600 souris utilisées sur une procédure expérimentale.

18776 Clostridioides difficile (*C. difficile*) est la première cause de diarrhées bactériennes associées aux soins chez l'adulte dans les pays développés et en particulier en France (24000 cas par an, dont 14 % de formes compliquées). La mortalité associée aux infections à *C. difficile* (ICD) est de l'ordre de 3%. Les ICD peuvent évoluer sur un mode épidémique avec la survenue de cas groupés d'infection. Elles représentent un coût sanitaire important pour nos sociétés, en raison de l'augmentation des durées moyennes de séjours hospitaliers et des surcoûts associés à leur prise en charge spécifique.

Trois molécules antibiotiques sont utilisées dans le traitement des ICD ; elles sont généralement efficaces mais chacun de ces traitements présente des inconvénients (échecs de traitement ; risque de sélection de bactéries résistantes ; coût important d'une des molécules). De plus, l'infection à *C. difficile* est caractérisée par un taux de récurrences important (20%), avec parfois des épisodes de récurrences multiples, ce qui peut être très invalidant pour les patients avec une perte en qualité de vie significative.

Les antibiotiques font partie des médicaments les plus prescrits à travers le monde et peuvent induire une modification du microbiote. La perturbation du microbiote intestinal, appelée dysbiose, est un facteur de risque d'infection à Clostridioides difficile.

Plusieurs stratégies peuvent être envisagées pour prévenir ou traiter les ICD et éviter les récurrences. Des thérapies émergentes visent à limiter la perturbation du microbiote intestinal et / ou à rétablir le microbiote dans son état pré-morbide, restaurant l'effet barrière du microbiote et réduisant ainsi la colonisation du tractus intestinal par des souches toxigènes de *C. difficile*.

Ces stratégies préventives incluent notamment l'utilisation de probiotiques, définis comme des microorganismes vivants qui, ingérés en quantité suffisante ont un effet bénéfique sur la santé. Certains probiotiques se sont révélés utiles dans les cas de la perturbation du microbiote, en particulier dans les affections intestinales associées aux antibiotiques. Diverses souches bactériennes et différentes combinaisons de probiotiques ont été testées, avec des effets variables pour traiter et prévenir les ICD.

Ce projet de recherche porte sur le développement de stratégies de lutte contre cette colonisation intestinale par l'utilisation de probiotiques ayant des propriétés différentes, tous les probiotiques n'ont pas le même mécanisme d'action. L'intérêt des probiotiques testés ici a été prouvé par des essais préalables in vitro. Les probiotiques ainsi sélectionnés sont retenus pour des essais pré-cliniques chez des rongeurs (souris). Nous déclenchons alors chez les animaux une infection à *C. difficile*, mimant ce qui se passe chez l'homme et nous évaluons la capacités des probiotiques sélectionnés à prévenir la colonisation intestinale par *C. difficile* ainsi qu'à réduire les signes

cliniques associés. Nous souhaitons également mieux comprendre les modes d'action de ces probiotiques et la manière dont ils interagissent avec l'hôte et/ou son microbiote.

Dans ce projet qui inclut des rongeurs (souris), nous estimons avoir besoin d'utiliser au maximum 342 animaux au total. Sur la base de notre expérience et de la littérature conséquente déjà disponible, nous avons déterminé le nombre d'animaux nécessaire et suffisant à l'obtention de résultats statistiquement robustes.

Nous réduisons également au maximum le nombre de répétition des essais.

Les procédures effectuées seront les suivantes: après induction d'une dysbiose chez les animaux, nous administrerons par voie orale une souche virulente de *C. difficile* afin de reproduire ce qui se passe chez l'homme. Les probiotiques seront alors administrés également par voie orale tous les jours suivant l'infection.

Dans tous les cas, l'état de santé des animaux sera surveillé quotidiennement afin de suivre l'évolution de l'infection et optimiser le bien-être des animaux. Des points limites ont été établis et mèneront à l'euthanasie des animaux si nécessaire. L'environnement des animaux est enrichi par l'ajout de feuilles de cellulose dans les cages.

Toutes les procédures de ce projet ont été conçues pour respecter le principe des 3 R (Réduction, Raffinement, Remplacement).

Remplacement : plusieurs tests *in vitro* en milieu de culture liquide et sur un modèle de cellules de l'intestin ont permis de démontrer la présence d'une activité antibactérienne des probiotiques testés vis-à-vis de *Clostridioides difficile*. L'étape de vérification de son activité *in vivo* est exigible réglementairement avant toute nouvelle phase de développement clinique. Le recours à l'animal est indispensable pour étudier tous les aspects d'un processus infectieux et valider la stratégie de prévention de ces infections car il n'existe à ce jour aucun modèle *in vitro* ou *in silico* capable de reproduire la complexité du processus infectieux dans son intégralité.

Réduction : une planification statistique minutieuse a permis de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en préservant la validité statistique de l'étude afin d'avoir une puissance statistique suffisante pour observer un effet. Les groupes contrôles des animaux ont été mutualisés aussi souvent que possible. Au total, un nombre maximal de 342 souris sera nécessaire pour les différentes procédures de cette étude.

Raffinement : les animaux seront surveillés quotidiennement et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer que les animaux subissent le minimum de stress possible. En particulier, les litières seront changées quotidiennement et les animaux auront un accès direct et illimité à l'eau de boisson et à la nourriture. La procédure sera pratiquée si nécessaire en utilisant des anesthésiques permettant de limiter la souffrance des animaux qui bénéficieront d'une procédure d'euthanasie anticipée et une sortie d'étude prématurée en cas d'atteinte des points limites éthiquement non acceptables. Les résultats de cette étude permettront d'envisager de nouvelles stratégies de prévention de l'infection à *C. difficile* ainsi que des récurrences associées.

18777 L'hémophilie B est une maladie hémorragique rare affectant principalement les hommes (1 naissance de garçons sur 25-30 000). Il s'agit d'une maladie génétique et le gène affecté est celui du facteur IX, une protéine jouant un rôle crucial dans la cascade de la coagulation. Il existe plusieurs types d'hémophilie B (mineure, modérée et sévère) en fonction du taux résiduel de facteur IX. L'hémophilie B sévère est due à une absence totale de facteur IX et si la maladie n'est pas traitée, l'espérance de vie est en moyenne de 15 ans. Actuellement le traitement standard de l'hémophilie B repose sur l'injection intra-veineuse régulière (2 fois/semaine) de facteur IX soit recombinant, soit purifié à partir de plasma. Ce traitement est coûteux et 70% des patients hémophiles dans le monde n'y ont pas accès. Actuellement des approches de thérapie génique sont testées dans des essais cliniques. Dans cette approche, un vecteur viral portant une copie normale du gène du facteur IX est injecté aux patients et ce vecteur qui cible les cellules du foie (l'organe physiologique de fabrication du facteur IX) va permettre à l'organisme du patient de produire du facteur IX actif afin de restaurer une coagulation normale. Dans la pratique, l'obstacle

principal au succès de cette approche est le taux d'expression de la protéine qui n'est pas toujours produite en quantité suffisante pour assurer une hémostasie normale. Afin de contourner cet obstacle et d'optimiser ces approches de thérapie génique, deux variants de facteur IX avec une demi-vie prolongée ont été testés et décrits dans la littérature scientifique. Toutefois, les variants testés se sont révélés très décevants car peu exprimés. En nous basant sur notre connaissance de la molécule de facteur IX, nous avons donc entrepris de construire 10 nouveaux variants de facteur IX comportant des éléments susceptibles de prolonger sa demi-vie. Notre projet consiste donc à tester ces différentes molécules de facteur IX modifiées afin de sélectionner celle qui alliera la plus forte expression ainsi que la demi-vie la plus longue. Le développement d'un tel variant permettrait de réduire la quantité de vecteurs injectés pour la thérapie génique ce qui réduirait aussi les risques de toxicité au niveau du foie. Pour ce projet, nous avons donc besoin de tester nos différents facteurs IX dans un modèle murin d'hémophilie B. Afin de réduire le nombre de souris utilisées, nous allons procéder pas à pas afin de réduire le nombre de variants différents qui devront être testés dans les différentes procédures.

Nous anticipons un nombre de 264 souris pour l'ensemble du projet. En fonction de la procédure, des groupes de 3 à 10 souris/variant sont prévus afin d'assurer une réponse statistiquement analysable. Les souris seront randomisées pour les attribuer aux différents groupes. [SEP] Afin de répondre à la règle des 3Rs, les procédures utilisées se feront dans le cadre adapté d'un hébergement agréé, respectant au maximum le bien-être des animaux avec un enrichissement du milieu (morceaux de bois à ronger, filaments de papier kraft pour faire un nid), et en limitant la souffrance par le respect des méthodes anesthésiques et analgésiques. L'ensemble des expériences sera effectué par une personne habilitée à expérimenter sur animaux.

18778 Les accidents vasculaire cérébraux (AVC), sont une cause majeure de handicap à long terme dont les séquelles peuvent être fonctionnelles (déficit moteur, trouble du langage...), cognitives (troubles de mémoire, ralentissement psychique...) et psychologiques (dépression, anxiété). Il est bien établi que le volume de l'infarctus cérébral ne prédit qu'imparfaitement les séquelles post-AVC, laissant penser que d'autres mécanismes survenant à distance de l'AVC pourraient jouer un rôle.

Une étude en imagerie par résonance magnétique (IRM), que nous avons récemment réalisée sur plus de 400 patients victimes d'un AVC, indique que du fer s'accumule dans des régions du cerveau, initialement épargnées par l'infarctus, comme le thalamus. Nos données suggèrent fortement que l'excès de fer dans ces régions a un impact péjoratif sur l'évolution clinique à long terme, indépendamment des autres facteurs pronostiques. Autrement dit, plus l'accumulation de fer dans le thalamus est importante dans les suites d'un AVC et plus la récupération risque d'être mauvaise. Ces résultats ont été retrouvés lors d'une étude préclinique pilote qui a permis de prouver l'accumulation de fer dans le thalamus et le lien avec une activation inflammatoire locale pouvant être délétère. En se basant sur ces résultats préliminaires, nous faisons l'hypothèse, qu'éviter l'accumulation de fer par des traitements, notamment chélateurs du fer, pourrait protéger les régions cérébrales impactées par l'AVC (comme le thalamus) et ainsi avoir un effet bénéfique, notamment vis-à-vis de l'apparition de nouveaux symptômes après l'AVC.

Avant d'envisager un essai thérapeutique chez l'homme, il convient de confirmer chez l'animal que du fer s'accumule progressivement dans les régions déconnectées par l'AVC (comme le thalamus) et que celui-ci induit des dommages cellulaires. Il convient également d'apporter des premiers éléments sur l'effet possible du traitement. Ce projet vise donc à quantifier le fer et les dommages cellulaires induits par l'excès de fer au sein du thalamus sur un modèle murin d'AVC et à tester plusieurs médicaments visant à diminuer cette charge en fer et les effets sur les cellules du cerveau induits par son accumulation

Pour réaliser cette étude, 252 souris C57BL/6J seront utilisées. L'AVC sera induit par la méthode de photo-thrombose chez la souris - qui est actuellement la méthode la moins invasive pour reproduire la pathologie humaine -. Il n'existe actuellement pas de modèle in vitro et donc pas de méthode alternative permettant de REMPLACER les animaux. Aujourd'hui, le fer est quantifié au sein du cerveau des patients grâce à l'IRM. Nous utiliserons donc aussi cette méthode dans notre projet. Un des avantages majeurs de l'IRM est d'être non-invasive, ce qui permet de suivre un

animal dans le temps. Afin de respecter la règle des 3R, nous avons REDUIT à 252 le nombre total d'animaux que nous prévoyons d'utiliser sur une période de 36 mois. Il s'agit du nombre minimal d'animaux nécessaire à l'obtention de données de qualité exploitables et permettant une analyse statistique fiable. Nous avons par ailleurs favorisé une étude longitudinale, permettant de suivre les souris régulièrement, notamment par IRM, réduisant ainsi le nombre de souris nécessaires pour évaluer les différents temps d'analyse de notre projet.

Des mesures de RAFFINEMENT seront mises en place durant toute la durée du projet. Les animaux seront hébergés au sein d'un établissement utilisateur agréé dans des conditions d'hébergement favorisant leur bien-être (enrichissement, suivi quotidien par du personnel qualifié). Enfin, des points-limites ont été établis entraînant une prise en charge de l'animal afin d'anticiper toute souffrance et réduire au mieux l'inconfort des animaux (anesthésie, analgésie, gel oculaire, tapis chauffant.). Ce travail est le prérequis indispensable à la conduite ultérieure d'essai thérapeutique pour moduler la charge en fer chez l'homme dans les suites d'un AVC.

Ce projet est multi sites (2 établissements utilisateurs) et 1 autre demande y sera rattachée.

18779 Le tremblement essentiel, forme la plus courante des tremblements, est un trouble neurologique progressif très fréquent chez les personnes âgées. Sa prévalence est de 4 à 6% après quarante ans, son évolution est lente mais inexorable avec une augmentation de l'amplitude des tremblements ainsi qu'une extension topographique : dans la majorité des cas, l'atteinte initiale est bilatérale et concerne les mains et les avant-bras, entraînant une invalidité des patients au quotidien. Il est à différencier du tremblement parkinsonien qui est, lui, un tremblement de repos. L'approche médicamenteuse actuelle n'est pas spécifique et reste restreinte, tout en entraînant des effets secondaires souvent gênants. En première intention, un bêtabloquant, le propranolol est proposé puis un antiépileptique, la primidone mais l'efficacité moyenne des traitements est d'environ 50% seulement. L'évaluation de leur efficacité est basée principalement sur des critères cliniques subjectifs liés à la gêne ressentie par le patient dans son quotidien. L'apport d'une technique non-invasive telle que l'électroencéphalographie pour une quantification objective serait indéniable.

L'objectif de notre étude est, d'une part, d'évaluer la pertinence de l'utilisation de l'électroencéphalographie (EEG) comme biomarqueur robuste et sensible pour le tremblement essentiel par rapport à la mesure d'électromyographie (EMG) et, d'autre part, d'évaluer le potentiel thérapeutique de nouvelles molécules sur le tremblement essentiel. Dans ce projet, le modèle de rat Harmaline sera utilisé. Il s'agit d'un modèle classique de tremblement essentiel : une injection d'harmaline induit des tremblements dits d' « action » à la même fréquence que ceux observés chez l'humain et surtout, présente une pharmacosensibilité similaire.

Pour ce projet, nous allons utiliser 365 rats sur 5 ans.

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

Raffinement : Le projet implique la mise en place d'un système d'enregistrement EEG et d'un système d'enregistrement EMG chez le rongeur avec une chirurgie de classe modérée. Les expérimentateurs formés porteront une attention particulière au raffinement des procédures afin de limiter la douleur, la soulager si elle ne peut être évitée par l'utilisation d'antalgiques les plus adaptés à chaque étape. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de douleur. Cette grille nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance et de procéder à l'arrêt de l'expérience si le point limite est atteint.

Remplacement : Ce projet a pour but de mesurer l'efficacité de composés sur des marqueurs pathologiques dans un organisme complet et complexe. De ce fait, il est impossible de remplacer notre préparation in vivo par un modèle cellulaire ou une simulation computationnelle.

18780 La castration chirurgicale des porcelets mâles est toujours une pratique courante en élevage dans le but notamment de réduire la fréquence d'occurrence de carcasses odorantes, de comportements

agressifs et des blessures qui en découlent et de pouvoir élaborer des viandes de qualité supérieure. C'est une pratique douloureuse et stressante et le législateur impose au 31 décembre 2021 un arrêt de la castration chirurgicale à vif des porcelets, qui ne pourra être réalisée qu'avec anesthésie et analgésie. L'efficacité du Tri-Solfen, qui associe Lidocaine (50 g/L), Bupivacaine (5 g/L), Adrenaline (0,048 g/L) et Cetrimide (5g/L) dans la gestion de la douleur lors de la castration chirurgicale de porcelets mâles de moins de 7 jours a déjà été rapportée dans la littérature. L'objectif de ce projet qui se situe dans le prolongement d'un autre projet étudiant l'efficacité de différents protocoles de prise en charge de la douleur lors de castration des porcelets mâles en station expérimentale, est de vérifier les résultats relatifs à l'emploi du Tri-Solfen dans les conditions d'élevage françaises de terrain. La prise en charge de la douleur sera, dans notre étude, élargie avec une utilisation de glucose 30 % par voie orale avant intervention et de meloxicam 5mg/mL en intra-musculaire pour prolonger la prise en charge de la douleur en post opératoire sur des porcelets mâles de moins de 7 jours d'âge. Le suivi des animaux sera réalisé avant l'intervention puis au moment de leur prise en charge, de l'application du protocole d'anesthésie, de l'acte chirurgical et dans les 30 heures suivantes. Le suivi portera sur l'observation du comportement et les vocalisations, ainsi que les réponses motrices nociceptives.

Remplacement : sachant que le projet porte sur l'évaluation de la douleur ressentie par les animaux, il n'est pas possible de mettre en place une méthode de substitution qui évite l'emploi d'animaux vivants.

Réduction : 100 porcelets, au maximum, seront intégrés à ce projet. Cet effectif a été calculé sur la base d'études similaires, pour réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en conservant un effectif suffisant pour pouvoir tirer des conclusions sur l'efficacité du protocole anesthésique et analgésique utilisé.

Raffinement : Les animaux seront logés conformément aux réglementations définissant les conditions de vie des porcs d'élevage. Lors des interventions, les animaux ne seront jamais isolés de leurs congénères : les animaux de la portée auxquels seront administrés les traitements seront placés ensemble dans une caisse puis remis directement dans la loge avec leur mère, une fois l'intervention réalisée. Les procédures utilisées sont des pratiques habituelles d'élevage (castration). Les castrations seront réalisées par une personne qualifiée en respectant les règles d'hygiène et de sécurité.

18781 UNE AUGMENTATION DE L'ADIPOSE MEDULLAIRE EST DEMONTREE DANS DIFFERENTS TYPES D'OSTEOPOROSE : POST-NENOPAUSIQUE OU LIEE AU VIEILLISSEMENT, CORTICO-INDUITE ET DE L'ANOREXIE MENTALE (AM).

Des études récentes MONTRENT UN ROLE des sirtuines (enzymes régulant l'expression de certains gènes) dans la régulation de la masse osseuse. En particulier, Sirt1 est connue comme étant un agent pro-ostéogénique et anti-adipogénique.

Objectif: Dans un modèle murin de déficit énergétique, développé dans notre laboratoire, basé sur la séparation couplée à la restriction alimentaire et mimant les conséquences de l'AM (modèle SBA : Separation Based-Anorexia), nous avons MONTRE une diminution (-80%) de l'expression de Sirt1 dans les cellules stromales (CS) de la moelle osseuse des souris SBA par rapport aux CS des souris contrôles. Ceci s'accompagne d'une augmentation de l'adipogenèse au détriment de l'ostéogenèse.

L'HYPOTHESE DE CE PROJET EST que la diminution de l'expression de Sirt1 dans la moelle serait en partie due à des modifications épigénétiques dans le promoteur de Sirt1.

L'objectif principal de ce projet est DE DETREMINER LES MECANISMES MOLECULAIRES RESPONSABLES DE LA DIMINUTION DE L'EXPRESSION DE SIRT1 EN UTILISANT 2 APPROCHES :

- UNE APPROCHE EPIGENETIQUE : EN REALISANT UN SEQUENÇAGE DES ARNs ISSUES DES CELLULES SOUCHES DES SOURIS SBA ET CONTROLES ;

• UNE APPROCHE NON EPIGENETIQUE (ETUDE DE LA VOIE AMPK/LKB1, REGULATEUR CLE DE SIRT1).

MODELES ANIMAUX : DES SOURIS FEMELLES C57BL6 AGEES DE 6 SEMAINES SERONT UTILISEES. VU QUE CES MECANISMES AYANT DES ORIGINES PHYSIOLOGIQUES COMPLEXES (HORMONALES, METABOLIQUES), IL N'EST PAS POSSIBLE D'ADAPTER OU DE REALISER CETTE ETUDE VIA DES APPROCHES IN VITRO. EN PLUS, DU FAIT DE LA TRES GRANDE DIFFICULTE D'OBTENIR DE PRELEVEMENTS DE LA MOELLE OSSEUSE CHEZ LES PATIENTES ANOREXIHUES, L'UTILISATION D'UN MODELE MURIN EST INCONTOURNABLE.

Le NOMBRE TOTAL D'ANIMAUX UTILISES DANS CE PROJET EST EGAL A 104 SOURIS PERMETTANT D'OBTENIR DES RESULTATS SIGNIFICATIFS.

METHODES DE MISE EN ŒUVRE POUR :

*le "Remplacement":

L'objectif du projet étant d'étudier les phénomènes liés à la physiologie, aux balances hormonales, et aux boucles de régulation en réponse à la perte de poids corporel dans des conditions mimant les conséquences de l'anorexie mentale, il n'est pas possible de remplacer l'expérimentation animale par une autre approche pour répondre aux questions posées

*la "Réduction":

Plusieurs échantillons déjà obtenus lors d'un précédent protocole seront réutilisés pour la réalisation de ce projet. Seuls sont prévus les animaux nécessaires pour générer de nouveaux échantillons ou de nouvelles approches.

*le "Raffinement »

Les conditions d'hébergement comprennent un enrichissement du milieu à base de ouate compressée à effiloche. Les souris sont acclimatées à leur environnement avant toute intervention. Durant le protocole SBA, chaque animal est pesé et observé quotidiennement afin de déterminer s'il n'est pas dans une situation critique (prostration, tremblements, difficultés à s'alimenter). Si c'est le cas, l'animal reçoit un supplément d'alimentation et après 48h, si son état ne s'est pas amélioré, il est retiré de l'étude et mis à mort.

18782 Suite à une agression d'origines diverses, la peau met en place un mécanisme de défense: l'inflammation.

L'objectif du projet est d'étudier les médiateurs exprimés lors de l'inflammation cutanée et leur source cellulaire et de comprendre les réponses impliquées. La source cellulaire et l'effet de ces médiateurs ou de leur inhibition peuvent ensuite être caractérisés plus précisément, soit in vitro sur des cellules de la peau, les kératinocytes, soit ex vivo sur des cellules épithéliales primaires, ou bien encore in vivo chez la souris modifiée de manière conditionnelle sur certains types cellulaires. Le projet étudie les mécanismes de l'inflammation de la peau induite par irritation mécanique, allergique ou chimique. La peau est constamment exposée à des traumatismes et irritants donc une étude mécanistique est importante pour comprendre ses moyens de défense.

Pour cette étude de la réponse inflammatoire cutanée trois axes sont considérés:

1. Irritation mécanique: Lésion par scotch pour l'étude de la réparation.
2. Réaction aux allergènes: Exposition aux allergènes protéasiques comme la papaïne, l'ovalbumine ou l'extrait du champignon *Alternaria*
3. Réactions inflammatoires aux médicaments comme calcitriol et imiquimod qui constituent respectivement des modèles de dermatite atopique/excéma ou de psoriasis.

La durée globale d'une procédure est de 2 à 10 jours: Dans les différents axes (1-3), les souris seront exposées journalièrement une à cinq fois pendant cinq jours consécutifs et analysées 1 à 5 jour après la dernière exposition, selon que l'on étudie une réponse aiguë (1 fois) ou plus chronique/répétée (jusqu'à 5 fois), et l'inflammation induite immédiatement (à 1 jour) ou la résolution

de l'inflammation (à 5 jours après la dernière exposition). Il est prévu d'analyser la réponse à 2 temps T1 et T2 pour chaque expérience, dépendant de la question posée.

Les expositions consistent en (1) Irritation mécanique: Une seule exposition consistant en l'application successive 20 fois d'un scotch sur la peau et retrait après attente de 15 secondes sous anesthésie légère; (2) Une à 5 expositions journalières aux allergènes des souris vigiles par étalement de crème ou sous anesthésie légère par injections intradermiques ou sous cutanées; ou (3) exposition 4 jours consécutifs au calcitriol ou l'imiquimod par application cutanée sur l'oreille ou sur le dos des souris épilées sous anesthésie.

Dans la partie 1, pour comprendre l'importance des voies impliquées dans les réponses inflammatoires, nous étudierons le déroulement de la maladie chez des souris déficientes pour les gènes correspondants. Les animaux immunodéficients utilisés ne présentent pas de phénotypes dommageables dans les conditions d'hébergement de l'animalerie. Dans la partie 2, des composés de type anti-inflammatoires seront testés pour déterminer leur efficacité à réduire l'inflammation cutanée.

Les dommages attendus pour les souris après irritation mécanique ou exposition cutanée aux allergènes, au calcitriol ou à l'imiquimod sont des démangeaisons et des lésions cutanées 1 à 3 jours après l'exposition, et se résorbant à 5 jours.

Une surveillance quotidienne des animaux est effectuée pendant la période d'acclimatation et d'expérimentation. Les conditions d'hébergement sont celles requises par l'annexe II de l'arrêté relatif à l'agrément des EU. Les animaux seront mis à mort selon la réglementation en vigueur. Le projet représente un ensemble d'études types. Le projet pourra comporter jusqu'à 36 études, soit 1800 souris au total.

Positionnement du projet et règle des 3R

A ce jour, l'animal de laboratoire reste le seul recours fiable et pertinent permettant d'étudier les mécanismes d'inflammation et de régulation à l'échelle de l'organisme. Ce projet sera réalisé en respectant la règle des 3R :

Remplacement : le modèle animal est fondamental dans notre cas, puisque l'étude de l'inflammation et de la pathologie ne peut se faire que sur un organisme vivant entier. Plusieurs niveaux de complexité sont nécessaires, impliquant des interactions entre différents types cellulaires et organes, qui ne peuvent être développés in vitro ou in silico.

Raffinement : Une anesthésie est réalisée lors de l'épilation ou d'administrations par voie intranasale ou intratrachéale. Une surveillance quotidienne des animaux est réalisée. Elle consiste en l'observation de l'aspect général de l'animal, de son comportement et de sa mobilité et une grille de score clinique est renseignée. Si des animaux présentent des signes de souffrance et atteignent le point limite, ils seront mis à mort.

Réduction : le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement pertinents et reproductibles. Chaque expérience comprend 50 souris, pour la partie 1 et pour la partie 2, étude préclinique de candidats médicaments.

Il est prévu d'étudier dans la partie 1: 900 souris et partie 2: 900 souris, soit 1800 souris au maximum pour 5 ans.

18783 Les ions métalliques sont impliqués dans de nombreux processus biologiques fondamentaux et sont des éléments essentiels pour la croissance et le développement de tous les organismes vivants. Les cellules régulent étroitement l'accumulation, le transport, la distribution et l'exportation de métaux, et une mauvaise régulation de la quantité d'ions métalliques peut être signe de pathologie comme les maladies cardiaques, le cancer, le diabète et les maladies neurodégénératives.

Le zinc revêt un intérêt particulier car il s'agit d'un micronutriment essentiel requis pour plus de 300 processus cellulaires différents. La teneur en zinc est particulièrement importante dans le pancréas et est impliquée dans le diabète de type 1 : le zinc est relargué avec l'insuline dans le milieu extracellulaire, en cas de stimulation par le glucose.

L'objectif de cette demande est d'évaluer les possibilités de détecter et quantifier le zinc par Tomographie d'émission monophotonique (TEMP), grâce à des agents de contraste, dans des souris modèles de diabète de type 1.

Les souris modèles de diabète de type 1 seront obtenues par injection intrapéritonéale d'une dose unique de streptozotocine (STZ) inférieure au seuil de toxicité et bien tolérée. Ce modèle est déjà décrit dans la littérature. La lignée de souris utilisée sera la lignée C57BL/6JRj. Les souris témoins ne recevront pas d'injection de STZ.

Les souris seront étudiées 6 jours après induction du diabète.

La STZ est un antibiotique qui est diabétogène chez la souris. Cette molécule rentre dans les cellules β pancréatiques, via leur transporteur de glucose (GLUT2), et induit une toxicité locale les détruisant, ce qui entraîne une diminution de capacité de production d'insuline.

Le projet comportera 3 phases, pour un maximum de 480 souris sur 5 ans :

1- induction de diabète type 1 sur des souris C57/BL/6JRj par injection intrapéritonéale d'une dose unique de streptozotocin (STZ). L'ensemble des souris induites seront utilisées dans les phases 2 et 3.

2- une phase d'imagerie TEMP qui vise à valider la biodistribution in vivo des agents de contraste développés, après induction d'une hyperglycémie (injection intrapéritonéale d'une solution de glucose) 10 minutes avant l'administration de l'agent de contraste.

3- les agents de contraste qui auront un profil de biodistribution in vivo intéressant seront ensuite validés par une étude de biodistribution ex-vivo.

Pour les souris diabétiques, les dommages potentiels obtenus par le STZ et le diabète sont faibles à 7 jours. Quelques cas de pertes de poids et/ou des diarrhées ont été recensés dans la littérature.

Nous mettrons en place un suivi ainsi que des points limites pertinents permettant d'anticiper toute douleur ou stress qui pourrait être provoqué chez l'animal. Concernant la douleur infligée par l'injection de la STZ, de glucose et de l'agent de contraste, elle doit correspondre à celle d'une piqûre d'aiguille. Les examens d'imagerie ainsi qu'un prélèvement de sang seront réalisés sous anesthésie gazeuse et les prélèvements réalisés post mortem.

Le projet sera réalisé en respectant les principes fondamentaux de l'expérimentation animale:

Remplacement: le modèle animal souris est fondamental dans notre cas, puisqu'à notre connaissance il n'existe pas de modélisation capable de représenter le relargage du zinc et de l'insuline in vitro ; cette étude ne peut se faire que sur un organisme vivant entier.

Raffinement: les animaux seront observés scrupuleusement quotidiennement, des points limites ont été définis afin de respecter leur bien-être et d'éviter au maximum la douleur au moment de l'expérimentation. Les explorations in vivo seront réalisées uniquement par imagerie in vivo non invasive et non douloureuse, et sous anesthésie, ce qui limite le stress aux animaux.

Réduction: le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement pertinents et reproductibles.

18784 Les tumeurs solides ne sont pas seulement composées de cellules tumorales, mais également de fibroblastes, de cellules immunitaires telles que les lymphocytes ou les cellules myéloïdes et de matrice extracellulaire, un ensemble de molécules extracellulaires sécrétées par les cellules qui fournissent un support structural et fonctionnel ; le tout formant ce que l'on appelle communément le microenvironnement tumoral (TME). Parmi les cellules immunitaires, les macrophages appelés dans ce contexte « macrophages associés aux tumeurs » ou TAM sont notamment retrouvés dans une proportion élevée et les observations cliniques ont établi une corrélation claire entre l'abondance de TAM et la sévérité du pronostic. Des études récentes notamment basées sur des approches bio-informatiques ont révélé une grande plasticité des macrophages dans les tissus sains et les tumeurs. Ces observations ont maintenant besoin d'être validées in vivo, étape nécessaire avant la mise au point de traitements ciblant spécifiquement les TAM humains soutenant le développement des tumeurs.

Pour étudier la plasticité TAM dans ce contexte préclinique, l'utilisation d'animaux vivants est indispensable pour récapituler le TME et corroborer les résultats précédant établis par des approches *in vitro*, *in silico* (bioinformatique) et *ex vivo*. Dans le cadre de ce projet, le modèle souris sera utilisé car de nombreux outils génétiques sont disponibles, des modèles de développement tumoral sont déjà établis et les résultats générés pourront être aisément utilisés en clinique humaine, comme l'ont déjà montré les premiers succès de l'immunothérapie par inhibiteurs de points de contrôle permettant de réactiver les cellules immunitaires préalablement désactivées par les cellules tumorales, développés en grande partie chez la souris.

Il a été établi depuis des décennies que l'abondance des macrophages dans les tumeurs était un marqueur de pronostic pour les patients atteints de cancer et ce quel que soit le cancer considéré. En clair, plus la tumeur contient de macrophages, plus le pronostic est mauvais. Mais ces observations cliniques restent en grande partie inexplicables en raison de notre méconnaissance des fonctions des macrophages associés aux tumeurs. C'est l'objet de ce projet d'explorer les mécanismes expliquant ce phénomène primordial pour les thérapies anticancéreuses (études des sous-population de TAM et cartographie précise pour déterminer des cibles thérapeutiques potentielles).

La réalisation de ce projet nécessitera 2,016 souris. L'ensemble des expérimentations sera mis au point afin de respecter les exigences de réduction et raffinement et les groupes expérimentaux seront constitués d'un minimum d'animaux assurant la fiabilité des résultats en termes de statistiques. Les conditions d'hébergement seront adaptées le cas échéant aux procédures (les animaux disposant d'un milieu est enrichi et de moyens et méthodes spécifiques pour les procédures). Le personnel impliqué assure également une veille scientifique continue, évitant toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature. Après injection de différents modèles de tumeurs dans les animaux, les prélèvements seront optimisés afin d'étudier le plus de paramètres possibles simultanément. Le développement tumoral sera suivi 3 fois par semaine par inspection visuelle, mesures et palpation. Des points limite ont été définis et seront strictement appliqués.

18785 Le développement d'un embryon nécessite toute une série d'étapes qui doivent être très finement contrôlées afin d'assurer la mise en place correcte des différents tissus qui composeront l'individu en devenir. La connaissance fine de ces premières étapes essentielles du développement est indispensable pour l'amélioration de la fertilité humaine et de la procréation médicalement assistée. Depuis quelques années, la biologie du développement s'intéresse aux mécanismes qui modulent l'expression des gènes en fonction du contexte : c'est l'épigénétique. Nous nous intéressons aux mécanismes épigénétiques qui contrôlent le devenir des cellules embryonnaires, et plus spécifiquement, des cellules pluripotentes. Ces cellules sont à l'origine de tous les types cellulaires qui composent l'organisme. Nous savons cultiver ces cellules *in vitro*, tout en conservant leurs propriétés pluripotentes. Ce sont les cellules embryonnaires souches, ou cellules ES. Elles permettent donc de reproduire *in vitro* certains événements fondamentaux du développement. Cependant certains mécanismes nécessitent d'être étudiés *in vivo*, pour prendre en compte les interactions de ces cellules pluripotentes, d'une part avec les tissus nourriciers qui les entourent dans l'embryon, et d'autre part avec les tissus maternels. Pour cela on peut tirer parti de la propriété des cellules ES de souris de pouvoir être aisément modifiées génétiquement en culture, puis réintroduites dans un embryon hôte dans lequel elles se développent comme les cellules pluripotentes endogènes. On peut alors suivre le devenir des cellules introduites et l'effet d'une mutation d'intérêt dans les étapes ultérieures du développement. Nous nous proposons d'utiliser différentes cellules ES dans lesquelles certains mécanismes épigénétiques sont affectés et qui seront agrégées à des embryons hôtes. Ces embryons modifiés seront réimplantés dans des souris receveuses afin d'y poursuivre leur développement pendant 6 à 8 jours, jusqu'à l'euthanasie des souris porteuses. Les embryons récupérés seront alors étudiés pour déterminer les conséquences de la perturbation sur le cours du développement. En parallèle, nous prévoyons de comparer les résultats obtenus avec ceux issus d'une méthode alternative réduisant le recours au transfert d'embryons : en effet il a été récemment mis au point une méthode de culture prolongée des embryons *in vitro*, permettant un développement correspondant à la période peri-implantatoire.

Cette méthode est prometteuse mais à l'heure actuelle un examen rigoureux de la validité des résultats que l'on peut obtenir en l'utilisant est nécessaire, et son efficacité doit être améliorée. Notamment les aspects épigénétiques, que l'on sait être sensibles à l'environnement, doivent être précisément évalués. Ainsi une comparaison d'embryons en culture prolongée avec ceux développés in vivo est nécessaire pour pouvoir sereinement utiliser cette méthode et éviter le recours au transfert d'embryons.

Ce projet portant sur le développement embryonnaire, il nous est impossible de remplacer l'animal par un modèle cellulaire ou par une simulation informatique. Le stade de développement qui nous intéresse correspond à la période juste après l'implantation, quand les cellules pluripotentes se différencient pour former les différents lignages embryonnaires. Ces animaux sont nés en captivité et ont été élevés à des fins expérimentales par des éleveurs agréés et reconnus dans l'expertise d'élevage de rongeurs. Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux, nous avons choisi d'utiliser une lignée de souris qui portent naturellement un grand nombre de petits (plus de 10). Nous prévoyons d'utiliser 160 souris femelles sur 5 ans. Le nombre a été calculé de façon à pouvoir conduire à des résultats interprétables d'un point de vue statistique. Les animaux sont hébergés par l'établissement utilisateur agréé dans des conditions protégées EOPS (Exempt d'Organisme Pathogène Spécifique) et avec un enrichissement du milieu (possibilité de construire des nids, d'utiliser des petits objets en bois pour grimper). Le transfert d'embryons se fait sous anesthésie générale, selon un protocole qui permet une sédation profonde et un réveil rapide. L'intervention est courte (10-15 minutes), est considérée comme de gravité modérée, et le réveil de l'animal après anesthésie est surveillé. L'état de santé général des animaux est surveillé régulièrement par les animaliers et éventuellement un.e vétérinaire en cas de signes de faiblesse ou de souffrance, et toute dégradation irréversible de celui-ci donnera lieu à une euthanasie. A la fin de l'expérimentation, ces animaux sont euthanasiés de façon réglementaire afin de collecter les embryons.

18786 L'obésité est une maladie associée à de nombreuses complications telles que l'hypertension, des troubles cardiovasculaires ou bien le diabète de type II. Sa prévalence est de plus en plus importante, notamment dans nos sociétés occidentales où le mode de vie est sédentarisé et où l'alimentation est de plus en plus riche en sucres et en matières grasses. Bien que l'étiologie de l'obésité reste controversée, il est admis qu'elle résulte d'un déséquilibre entre l'énergie apportée par la nourriture, et l'énergie dépensée pour maintenir le bon fonctionnement de l'organisme et une activité physique.

Le cerveau est largement responsable de la régulation de cette balance énergétique, et il contrôle la sensation de faim et le besoin de se dépenser. Une région du cerveau, appelée hypothalamus, est notamment très importante dans le maintien d'un poids stable, et les neurones qui se trouvent dans cette région sont aujourd'hui largement étudiés. Parmi les cellules localisées dans l'hypothalamus, on trouve également des cellules fondamentales car elles organisent les connexions entre neurones, et apportent les nutriments nécessaires à leur survie. Ces cellules, appelées astrocytes, ont un rôle encore méconnu. On sait déjà qu'elles peuvent réguler les communications entre neurones, et qu'elles réagissent différemment selon la quantité de nutriments (sucres et graisses notamment) qui leur sont apportées. Nous voulons savoir quel est le mécanisme de ces cellules, et comprendre quels dérèglements de ces mécanismes peuvent aboutir à une surcharge pondérale. En particulier nous faisons l'hypothèse qu'en manipulant directement ces cellules nous pourrions prévenir certaines pathologies associées à l'obésité.

Pour cela, nous avons choisi de travailler avec des modèles de souris génétiquement modifiés qui nous permettront de comprendre comment l'astrocyte s'adapte à des régimes trop riches et comment la manipulation de l'astrocyte peut permettre de corriger les problèmes métaboliques associés à l'obésité. Les animaux auront de la nourriture enrichie en gras dans leur milieu afin qu'ils développent une obésité. Ils subiront une chirurgie stéréotaxique afin d'injecter des virus et d'y implanter une fibre optique pour faire de l'enregistrement nerveux, ou une canule pour l'injection de composés par la suite. Puis après une phase de repos d'un mois environ ils seront suivis au niveau métabolique.

La règle des trois R sera respectée, le nombre d'animaux sera réduit au minimum en optimisant au maximum les groupes expérimentaux (réutilisation des animaux dans différentes procédures n'entraînant pas de douleur ou de stress) et en raffinant les procédures pour réduire au minimum la douleur, la souffrance et l'anxiété des animaux. Nous effectuerons lorsque nécessaire l'administration d'analgésique lors des procédures de chirurgies, ainsi que d'antalgique en post opératoire, si besoin. Les gestes chirurgicaux seront effectués sous anesthésie générale et analgésie pré, per et postopératoire. Les cages sont agrémentées d'un nid végétal et d'objets pour le confort de l'animal.

Un total de 1340 souris sera utilisé pendant les 5 ans d'étude du projet. Le bien-être animal est pour nous primordial vis-à-vis de l'animal mais aussi de nos expérimentations, les résultats de comportement ne peuvent être valable que si l'animal est bien portant.

Des points limites spécifiques d'évaluation de la douleur à chaque procédure sera mise en place. L'atteinte d'un de ces points limites entrainera la mise à mort anticipée de l'animal concerné. Enfin, cette étude ne peut être remplacée par d'autre moyen, comme la culture cellulaire, car nous regardons le comportement, le métabolisme et les réponses neuronales de l'animal.

18787 La microchirurgie consiste à réaliser des gestes chirurgicaux de précision telles que des connections entre vaisseaux sanguins ou des sutures de nerf, sous un microscope.

La microchirurgie ne peut pas être pratiquée chez l'homme sans un apprentissage préalable sur des modèles non humains. Cet apprentissage sur modèles apporte la dextérité et l'aisance requise pour la réalisation de procédures chirurgicales chez l'homme. L'apprentissage de la microchirurgie se fait en 2 étapes : 1) préparation et utilisation du matériel de chirurgie (pinces, ciseaux, aiguilles, clamps, écarteurs. . .) sous microscope, sur différents modèles inertes (gaze, tube en silicone, cuisse de poulet. . .) puis 2) mise en application sur l'animal, non humain, anesthésié. La première étape permet de maîtriser les gestes de base sous microscope ; la deuxième étape d'affiner les gestes en situation. Du fait de sa taille, de la taille et de la structure de ses vaisseaux, le rat est un bon modèle pour l'apprentissage de la microchirurgie.

La formation se fera pendant 5 ans, à raison d'une session par an, accueillant de 3 à 5 apprenants par session. Le contenu de la formation a été conçu en se basant sur des formations de référence en microchirurgie. Chaque session de formation durera 1 semaine et sera découpée en 10 séquences d'1 demi-journée chacune. La session permettra d'aborder progressivement des techniques de plus en plus complexes. 1 rat sera utilisé par apprenant par demi-journée. Au total 250 rats maximum seront utilisés en 5 ans.

Plusieurs mesures seront prises pour assurer le bien-être animal tout au long de la formation : les rats seront hébergés dans des conditions respectueuses de leur bien-être : paramètres d'ambiance adaptés à l'espèce, nourriture et eau à volonté, animal hébergé avec des congénères dans le respect du comportement grégaire de cette espèce, dans des cages à double niveau qui constituent une forme d'enrichissement et mise à disposition de différents types d'enrichissement pour favoriser les comportements naturels (ronger, se cacher par exemple). La formation sera encadrée par un chirurgien qui a validé une formation à l'expérimentation animale et par un personnel qui est qualifié et expérimenté pour la manipulation et la chirurgie sur les rats. Seule cette personne manipulera les rats vigiles qui seront anesthésiés dans une pièce isolée, à l'écart du laboratoire d'apprentissage et des apprenants. Le rat anesthésié recevra une injection d'antalgique opioïde et sera placé sur un tapis chauffant dont la température s'ajuste à la température corporelle. Les rythmes cardiaques et respiratoires seront surveillés. En cas d'anomalie traduisant une douleur ou en fin de séquence, le rat encore anesthésié sera euthanasié.

18788 L'anxiété est une réponse psychologique et physiologique à une potentielle menace. C'est une réaction normale à de nombreux types d'événements et de situations dans notre vie quotidienne et un de nos systèmes internes d'alerte pour la survie. Les troubles anxieux surviennent lorsque l'anxiété reste élevée et continue en l'absence de toute menace potentielle. Cette pathologie constitue la condition psychiatrique possédant la plus forte prévalence. Selon un rapport de l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) de 2007, 10,7% des hommes et 14,5% des femmes en France présentent

des troubles d'anxiété généralisés. L'anxiété représente ainsi un coût sociétal et économique majeur.

Une hypothèse propose que les circuits neuronaux permettant d'attribuer une valeur positive ou négative aux émotions présenteraient un dysfonctionnement à l'origine de l'anxiété pathologique. Le cortex insulaire est une région cérébrale spécifique pour laquelle son implication dans les troubles anxieux chez l'humain a été montrée. Toutefois, les circuits neuronaux de cette région, ainsi que les comportements motivés par les émotions et l'implication de cette région dans l'anxiété, n'ont été que très peu étudiés jusqu'à présent.

Par ailleurs, il a été démontré que des dysfonctionnements d'un des systèmes de neurotransmission (dopaminergique) interviennent dans des troubles tels que la dépression, la peur et l'anxiété. Néanmoins, malgré le rôle connu du neurotransmetteur (dopamine) dans la régulation de ces comportements, la contribution de ses récepteurs demeure inconnue au sein des circuits du cortex insulaire.

Ce projet a pour but d'étudier la contribution du système de neurotransmission dopaminergique dans l'anxiété chez la souris grâce à l'analyse anatomique et de la connectivité, l'enregistrement et la manipulation de l'activité neuronale.

De manière plus globale, ce projet s'inscrit dans la mise évidence des altérations du fonctionnement de circuits neuronaux contrôlant le niveau d'anxiété, afin de pouvoir envisager des stratégies de restauration de ces altérations chez les patients atteints de troubles anxieux.

Remplacer : Le projet porte sur une analyse de la connexion des neurones et de leurs propriétés de transmission d'informations au cours du comportement. Par conséquent cette procédure doit être effectuée chez des animaux vivants. Des méthodes telles que la culture cellulaire ne permettent pas la quantification des connexions neuronales ou la mesure de l'activité en réponse à une stimulation sensorielle in vivo.

Réduire : Nous avons réduit au strict nécessaire le nombre d'animaux afin d'obtenir une analyse fiable (le nombre d'animaux estimé permet d'effectuer des tests statistiques) et complète de la connectivité et de l'activité de la région cérébrale d'étude. Nous utiliserons ainsi 1368 souris sur cinq ans.

Raffiner : Les animaux seront hébergés en cages collectives enrichies en nids de coton, afin de limiter le stress dû à l'isolement. Les animaux seront surveillés quotidiennement par les animaliers tout au long de leur vie, et bénéficieront d'une surveillance plus particulière par les expérimentateurs en période expérimentale. Tout au long de la période expérimentale, les animaux seront pesés quotidiennement afin de vérifier leur capacité à s'alimenter, et leur état général (état du pelage, sociabilité, posture...) sera inspecté. Les éventuelles agressions entre congénères seront stoppées par l'isolement de l'agresseur, et la victime sera soignée (désinfection des plaies, aide à la cicatrisation). Une prémédication pré-chirurgicale sera systématique afin d'éviter la souffrance post-opératoire. Des points limites suffisamment prédictifs sont mis en place pour éviter la souffrance tout au long de la vie de l'animal

18789 Le succès à long terme des traitements anticancéreux dépend en grande partie de la capacité de rétablir l'immunosurveillance anticancéreuse. Des chimiothérapies telles que les anthracyclines ou l'oxaliplatine peuvent stimuler la mort cellulaire immunogène (immunogenic cell death, ICD): les cellules tumorales mourantes peuvent induire une réponse immunitaire puissante, impliquant les lymphocytes T cytotoxiques contre les cellules tumorales résiduelles. Une caractéristique de l'ICD est la production d'ATP via l'activation de l'autophagie. Ce projet a pour but de caractériser in vivo une molécule capable d'induire l'ICD in vitro. Pour la réalisation de cette étude, nous effectuerons des expériences afin d'évaluer l'ICD, l'autophagie et la croissance tumorale.

Les procédures expérimentales conçues répondront aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement.

Le projet visant à étudier la réponse immunitaire antitumorale ne peut être réalisée qu'in vivo, car il n'existe aucun modèle alternatif pour imiter la réponse immunitaire antitumorale aux chimiothérapies. Ce projet, d'une durée de 3 ans, impliquera l'utilisation de 832 souris.

Les expérimentations seront regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux contrôlés. L'étude est divisée en plusieurs procédures et sera arrêtée si une des procédures invalide l'hypothèse de travail. Une veille bibliographique constante sera faite pour éviter toute manipulation déjà rapportée dans la littérature.

Les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux. Le personnel impliqué dans ce projet est qualifié et expérimenté sur le plan technique et formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale. Au cours de l'expérimentation, les animaux seront hébergés dans le respect de leur bien-être et disposeront de coton dans les cages. Les animaux seront acclimatés pendant une semaine avant le début de l'expérimentation. La surveillance régulière permettra le suivi du comportement (prostration, autoagression, etc) et de la croissance tumorale, afin de limiter au maximum la contrainte et de prodiguer des soins.

18790 Objectif : Ce projet a pour objectif de permettre à nos clients d'étudier chez le chien la pharmacocinétique ou la pharmacodynamie de produits pharmaceutiques à usage humain, lorsque la biodisponibilité de la molécule à évaluer est la plus représentative sur cette espèce.

Chaque test sera réalisé comme suit : pour chaque formulation/dose, 3 à 12 chiens seront traités avec la voie d'administration et la posologie adaptée pour obtenir une biodisponibilité adéquate sans toxicité pour l'animal.

Pour le développement d'un produit pharmaceutique, les différentes formulations/doses candidates doivent être comparées entre elles afin de déterminer celle qui sera la plus adaptée pour le traitement.

Bénéfice attendu : possibilité de mettre sur le marché des médicaments avec la formulation/posologie optimale.

Domages attendus : Il n'est pas attendu de dommage durable ou d'effet secondaire grave suite à l'administration du traitement car l'absence de toxicité des produits testés aura préalablement été vérifiée par le Donneur d'Ordre.

Mise en pratique des 3R :

- Remplacer : L'utilisation de chiens sur ce projet est justifiée car c'est l'espèce la plus représentative de la biodisponibilité du produit chez l'homme et qu'il n'existe pas de méthode alternative pour ce type de test.

- Raffiner : Les volumes administrés respecteront les recommandations du Gircor. La pharmacocinétique ou la pharmacodynamie reposera sur des prélèvements sanguins, et/ou tout autre prélèvement non invasif tel que la récolte de fèces, le prélèvement de sperme, de salive... La fréquence et le volume des prélèvements seront déterminés en fonction du respect du bien-être et de la santé des animaux et respecteront les recommandations du Gircor. Les interventions effectuées dans ce projet seront réalisées par des personnes compétentes et les techniques utilisées viseront à limiter au maximum la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux.

- Réduire : Le nombre d'animaux utilisés pour ce projet correspond au minimum requis pour répondre à l'objectif. Pour limiter le nombre d'animaux utilisés, chaque chien pourra recevoir séquentiellement chacune des formulations. Entre chaque test, des périodes de repos suffisantes seront respectées.

L'estimation du nombre d'animaux requis pour ce projet sur 5 années est de 270 chiens. Lorsque cela sera possible (sans impact sur les objectifs de l'étude), le nombre d'animaux utilisé sera diminué par la réutilisation éventuelle de certains animaux et/ou la mise en place d'une procédure en cross-over après une période de repos permettant que l'animal ait pleinement recouvré son état de santé et de bien-être général.

18791 La maladie de Menkès est une maladie rare dont l'incidence est estimée à 1 patient pour 250 000 naissances. Cette maladie est provoquée par une mutation d'un gène localisé sur le chromosome X. L'absence du transporteur intestinal et cérébral du cuivre (ATP7A) entraîne, chez l'enfant, une carence généralisée en cuivre, générant une hypotrophie sévère, des cheveux caractéristiques fins et tortillés et une encéphalopathie convulsivante sévère qui est la cause du pronostic grave de cette maladie. En effet, le cuivre est un métal impliqué dans un grand nombre de réactions biochimiques intervenant dans la respiration cellulaire, le métabolisme du fer, le métabolisme des pigments, des neurotransmetteurs, la synthèse de certaines protéines, de certains tissus conjonctifs et les réactions anti-oxydantes. Ainsi, une carence en cuivre s'exprime par un déficit de ces différentes activités biologiques.

Dans ce contexte, il existe plusieurs modèles murins de la maladie de Menkès, dont un qui présente une mutation sur le gène ATP7A, entraînant ainsi une carence en cuivre chez les mâles, et responsable de l'apparition d'un phénotype spécifique comprenant un pelage clair avec des poils anormaux, des tremblements et une apathie importante. Ces mâles peuvent également souffrir de graves troubles aortiques et squelettiques, souvent responsable de leur mortalité. En effet, la mortalité périnatale des mâles atteints est importante avec une durée de vie pouvant varier de 3 à 5 semaines.

Le seul traitement actuel pour les patients atteints réside dans l'administration d'histidinate de cuivre permettant une normalisation des concentrations en transporteur plasmatique du cuivre mais sans amélioration de l'état clinique neurologique des patients. Cette absence d'amélioration clinique s'explique par l'impossibilité pour le cuivre seul de passer la barrière hémato-méningée qui entoure le cerveau. C'est pourquoi, notre projet vise à tester chez la souris une nouvelle thérapeutique basée sur l'administration sous-cutanée d'un transporteur synthétique du cuivre (TSC) capable de franchir la barrière hémato-encéphalique. Nous avons déjà vérifié, dans une étude précédente, la bonne tolérance et le passage cérébral de cette nouvelle molécule. Plus précisément, les résultats ont montré un assombrissement du pelage qui est un indicateur du métabolisme correct du cuivre, ainsi qu'une amélioration de l'activité physique globale et une augmentation de l'espérance de vie jusqu'à au moins 8 semaines, période d'arrêt déterminée initialement au cours du projet précédent. Ces premières études ont permis de déterminer une dose et un rythme d'administration optimaux. C'est pourquoi, la phase 2, objet de la présente demande, vise à évaluer l'efficacité de ce traitement sur l'espérance de vie, l'évolution du poids, l'activité motrice et cognitive par le biais des tests neurocomportementaux et par les analyses biochimiques, anatomopathologiques et enzymologiques à effectuer sur les tissus des animaux de l'étude.

1. Remplacement : Il n'existe pas d'alternative d'approche in vitro car le projet porte sur l'étude de l'allongement de la durée de vie et l'amélioration du comportement de l'animal porteur de la maladie de Menkès en fonction de la réponse au traitement.

2. Réduction : L'étude comportementale portera sur 50 souris de laboratoire, réparties en 5 groupes de 10 mâles dont 2 groupes de 10 souris saines (sauvages) et 3 groupes de 10 souris mutantes (hémizygotés). Cette cohorte de 50 souris mâles sera étudiée et mise à mort une fois les tests comportementaux terminés, à l'âge de 2 mois. L'étude sera réalisée avant 2 mois si les points limites sont atteints avant cette échéance. Il s'agit du nombre d'animaux nécessaires pour mener à bien cette étude afin d'obtenir une puissance statistique suffisante.

3. Raffinement : Toutes les procédures expérimentales (10 procédures seront appliquées : la gestion de la lignée mutante qui présente un phénotype dommageable pour l'animal, l'injection du TSC en sous-cutanée et répétée 5 fois par semaine, et 8 tests pour l'étude comportementale, mise à mort) auront lieu dans l'animalerie, dans un environnement sécurisant pour l'animal. Une procédure d'estimation et suppression de la douleur est mise en place : différents éléments visuels chez l'animal sont évalués afin d'établir un score qui permet d'anticiper et d'éviter d'atteindre les points limites déterminés au préalable, et qui tient compte des signes éventuels de mal-être (isolement, yeux fermés, dos voûté, poils hérissés, immobilité, perte de poids, yeux et abdomen creux). En fin de protocole, les animaux seront mis à mort et des organes prélevés pour permettre des analyses biochimiques, enzymologiques et anatomopathologiques.

18792 Les cellules dendritiques (CD) sont des cellules présentatrices d'antigènes (APC) professionnelles capables d'induire une réponse immunitaire. Ce projet vise à améliorer l'efficacité de la thérapie anti-tumorale avec les CD. L'objectif du projet est d'évaluer l'effet antitumoral des CD chez des souris immunocompétentes comparés à des animaux immunodéficients. Nous explorerons également si l'efficacité des CD peut être améliorée en présence d'immuno-thérapies. Etudier l'efficacité de l'immunothérapie à base de CD au niveau préclinique permettra de caractériser des nouvelles cibles pour le développement d'une nouvelle immunothérapie anticancéreuse.

Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des expérimentations a été mis au point afin de respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement et de permettre ainsi une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal.

Remplacement: l'utilisation d'animaux vivants est indispensable car, ce projet visant à tester l'efficacité des traitements anticancéreux et à confirmer l'activation du système immunitaire, ne peut être effectué chez l'animal en raison de l'impossibilité de reconstruire un système immunitaire fonctionnel in vitro/ex vivo à la limite des technologies actuelles. Ce projet se dessine sur 3 ans et implique l'utilisation (au maximum) de 855 souris.

Réduction: Les expérimentations seront regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. L'étude sera arrêtée si la procédure initiale invalide l'hypothèse de travail. Plusieurs tissus seront prélevés et soumis à diverses analyses (immunologiques, histologiques ou de biologie cellulaire et moléculaire) pour extraire le maximum de données de chaque expérimentation. Ces tissus seront également partagés avec nos collaborateurs dans le but de réduire le nombre d'animaux utilisés.

Raffinement: Les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux (points limites surveillés, anesthésie des animaux, utilisation de cages préchauffées et de lampes chauffantes...). Les animaux seront observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être. La mise en place d'une grille de suivi stricte des points limites permettra d'éviter au maximum le stress et/ou la douleur au cours de l'expérimentation. De plus, le personnel impliqué dans ce projet est qualifié sur le plan technique et formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale. Il assure également une veille scientifique continue, évitant toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature.

18793 L'hypertension pulmonaire est une maladie progressive grave qui touche les petits vaisseaux sanguins des poumons et dont le symptôme principal est l'essoufflement à l'effort. Ces vaisseaux transportent le sang à partir du cœur vers les poumons, où il se charge en oxygène (O₂) pour alimenter tout l'organisme. La prévalence de cette maladie est estimée de 15 à 25 cas pour un million d'habitants et le pic de fréquence se situe entre 30 et 40 ans. L'évolution naturelle de cette maladie varie fortement d'un individu à l'autre, mais elle conduit à une insuffisance cardiaque droite responsable du décès du patient seulement quelques années après la déclaration de la maladie. De nombreux médicaments permettent de réduire les symptômes de l'hypertension pulmonaire, cependant aucun permet à ce jour un traitement complet de la maladie. Lorsque l'hypertension pulmonaire menace la vie du patient, ces patients peuvent subir une greffe cœur-poumon. Ainsi, la découverte de nouveaux médicaments apparaît primordiale afin de lutter ou diminuer le développement de cette maladie. Avant de tester ces molécules thérapeutiques chez les patients atteints d'hypertension pulmonaire, il est crucial d'appréhender au préalable la posologie et l'efficacité de ces molécules sur un modèle animal, et notamment le rat. En effet, les rats sont des modèles standards de maladies cardiovasculaires. Ils présentent une anatomie vasculaire et des caractéristiques hémodynamiques similaires à celle de l'homme. L'utilisation de l'animal vivant est indispensable par l'impossibilité de simuler ex vivo la mise en place de l'insuffisance cardiaque qui est un processus complexe. De plus, dans un but d'étude préclinique il est crucial de pouvoir tester nos molécules pharmacologiques sur l'animal entier afin de déterminer la présence d'effets secondaires non désirés. Toutes les procédures seront pratiquées en utilisant des anesthésiques et des analgésiques. Les fonctions cardiovasculaires seront étudiées par des méthodes non invasives permettant de limiter le nombre d'animaux utilisés. Les rats sont mis à mort en fin d'expérimentation et les tissus prélevés sont partagés afin de minimiser encore le nombre

d'animaux utilisés. Des expériences de biochimie et de biologie moléculaire à partir des différents tissus collectés et des études sur cellules isolées seront effectuées dans la mesure du possible afin de réduire le nombre d'animaux utilisés. Ainsi, toutes les procédures de ce projet sont conçues pour respecter le principe de 3 R (Réduction, Raffinement, Remplacement). De l'enrichissement sera ajouté dans les cages des animaux. Les rats seront surveillés quotidiennement et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer que les animaux ne subissent aucun stress. Le nombre total de rats utilisés sera de 150 sur l'ensemble de l'étude en combinant plusieurs approches expérimentales par différents expérimentateurs sur le même animal.

18794 Le système nerveux central (SNC) des mammifères se caractérise par un réseau complexe de neurones et de cellules neurales de soutien, irrigué par un système vasculaire particulier, très sélectif et imperméable au passage de nombreuses molécules du compartiment sanguin vers le tissu nerveux. Ce système vasculaire unique au SNC, appelé "barrière hémato-encéphalique" (BHE), empêche la distribution dans le tissu nerveux de la plupart des médicaments développés à ce jour. Notre objectif est d'améliorer la distribution cérébrale d'agents d'imagerie et thérapeutiques, en particulier des biomolécules innovantes (peptides, protéines, anticorps monoclonaux thérapeutiques, oligonucléotides), dans le but d'améliorer les perspectives de traitement de maladies neurodégénératives. Dans ce but, nous développons des molécules vecteurs qui ciblent spécifiquement certains récepteurs d'intérêt de la BHE.

Nous avons donc pour objectif de produire des anticorps polyclonaux et monoclonaux comme outils, chez le rat et la souris, d'une part pour étudier la distribution et le fonctionnement de certains récepteurs et d'autre part, avec les monoclonaux, de développer des vecteurs qui cibleront des récepteurs de manière très spécifique et qui pourront être conjugués à des agents thérapeutiques ou d'imagerie comme « cargos ».

Nous produirons, puis sélectionnerons des hybridomes sécrétant des anticorps contre les récepteurs cibles. Les hybridomes seront obtenus par la technique d'hybridation cellulaire, consistant en la fusion des lymphocytes B, isolés à partir de rongeurs immunisés, avec des cellules de myélome de souris Balb/C. Afin d'augmenter les taux de succès du projet, plusieurs protocoles d'immunisation seront utilisés à partir d'immunogènes différents (peptides issus des récepteurs et membranes cellulaires enrichies avec ces récepteurs).

Nous comptons utiliser des animaux provenant d'élevages agréés, nés et élevés en captivité.

Il est prévu de générer des anticorps contre dix récepteurs au maximum. Ainsi, nous utiliserons 30 souris (3 souris par immunisation) et 20 rats (2 rats par immunisation) afin d'augmenter les chances de produire les anticorps recherchés, tout en appliquant la règle de réduction.

Deux immunisations par voie intra-péritonéale sont nécessaires par rongeur à 15 jours d'intervalle, ainsi qu'une injection intra-veineuse 3 jours avant leur sacrifice. Trois prélèvements de sang seront réalisés au cours du protocole d'immunisation (environ 100 µl chez la souris et 300 µl chez le rat) afin d'obtenir un immun sérum servant à la titration et la caractérisation des anticorps polyclonaux. Ces approches sont indispensables avant la préparation des anticorps monoclonaux, et la sélection de ceux qui présenteront la plus grande efficacité pour un développement comme vecteurs.

La règle des 3Rs a été prise en compte dans l'élaboration du présent protocole :

- Raffinement : pour réduire le stress des animaux, les souris sont hébergées par 3 dans des cages adéquates et les rats par 2 dans la zone d'élevage IOPS de l'animalerie centrale. Toutes les cages sont enrichies pour les souris par des dômes en carton et des tunnels en polycarbonate de couleur rouge pour les rats. Toutes les injections seront pratiquées par un personnel formé et expérimenté. Les injections intra-veineuses et les prélèvements sanguins seront effectuées sous anesthésie gazeuse. Même si la souffrance susceptible d'être générée par le protocole d'immunisation est en général de degré de gravité légère à modérée en fonction de l'adjuvant utilisé, l'état des animaux est évalué quotidiennement particulièrement durant les premières heures après l'immunisation. L'eau et la nourriture sont fournies ad libitum.

Si les premières immunisations avec les épitopes d'un récepteur donné n'aboutissent pas à la sélection d'anticorps polyclonaux, nous ne tenterons pas le développement d'anticorps monoclonaux. Les temps d'immunisation peuvent varier de 1 à 2 mois.

- Réduction: Le nombre d'animaux utilisés par groupe (n=30 souris et 20 rats) a été défini comme le nombre minimum nécessaire pour générer des anticorps.

- Remplacement: L'amplification des anticorps d'intérêt sera réalisée in vitro par culture cellulaire en spinner. Ceci afin de ne pas utiliser d'animaux pour la production en ascites qui demeure un protocole de degré sévère pour les animaux.

18795 Ce projet s'inscrit dans le cadre d'essais précliniques soumis aux autorités réglementaires et destinés à évaluer le profil toxicologique de molécules auxquelles l'homme pourrait être exposé, avant leur mise sur le marché. Plus spécifiquement, ce projet concerne les études de toxicologie de la reproduction et du développement et a donc pour objectif d'évaluer les effets potentiels d'une substance :

- sur la femelle gestante et sa progéniture après une exposition durant la gestation

- sur le développement / croissance de jeunes animaux immatures sexuellement.

Etudes sur la femelle gestante :

Des femelles accouplées seront maintenues en acclimatation puis traitées pendant la période de gestation par les produits en évaluation. Des paramètres comme le poids corporel, la consommation alimentaire, les signes cliniques seront évalués et enregistrés afin d'éviter toute toxicité excessive. Des prises de sang pourront être réalisées. A l'issue de la période de traitement définie et avant la mise-bas naturelle, des analyses seront réalisées sur certains organes cibles et sur les fœtus.

Toutes les molécules ne sont pas testées dans ce type d'étude car des tests précoces in-vitro sont réalisés ou sont en cours de développement afin de prédire un potentiel tératogène, avant de passer sur l'animal. Toutefois l'utilisation de mammifères reste indispensable à une évaluation définitive de l'effet sur le développement de l'embryon et du fœtus. Les études de développement réalisées chez le rat sont demandées par les autorités et suivent des lignes directrices internationales fixant l'espèce et le nombre d'animaux requis. Une étude préliminaire de choix de doses est d'abord réalisée sur un nombre restreint d'animaux afin de raffiner les doses à utiliser. En cas d'anomalie, le produit peut être arrêté limitant l'utilisation future d'un nombre plus important d'animaux. Une étude de tolérabilité sur un très faible nombre d'animaux peut être réalisée en amont de l'étude préliminaire pour éliminer précocement des molécules ayant un effet toxique sur le développement.

Etudes sur les jeunes animaux sexuellement immatures:

Les jeunes rats seront maintenus en acclimatation avec une mère, puis sevrés et traités par les produits en évaluation. Des paramètres comme le poids corporel, les signes cliniques seront évalués et enregistrés afin d'éviter toute toxicité excessive. Le développement pubertaire sera évalué notamment par l'observation de la séparation du prépuce chez le mâle et l'ouverture du vagin chez la femelle. Des prises de sang pourront être réalisées. A l'issue des périodes de traitement définies, des analyses sur certains organes cibles seront réalisées.

Ces études sont réalisées sur un petit nombre d'animaux et font suite à des tests précoces in-vitro réalisés sur des cultures de cellules qui permettent de réduire le nombre de molécules testées sur l'animal. Toutefois l'utilisation de mammifères reste indispensable à une évaluation définitive de l'effet sur la croissance et le développement de l'animal juvénile.

Au total ce projet prévoit 7000 rats sur 5 ans, soit 1400 rats par an. Cet effectif a été défini sur la base du nombre de substances chimiques à évaluer dans la toxicité sur la reproduction et le développement et du nombre d'animaux nécessaires pour réaliser l'ensemble des études.

Ce projet respecte la règle des 3R :

- Remplacement : tests précoces in-vitro/Zebrafish avant de passer sur l'animal.

- Réduction : nombre d'animaux utilisé par groupe et par étude réduit au minimum pour permettre une évaluation de la toxicité. Regroupement de plusieurs produits dans une même étude et donc utilisation d'un seul groupe témoin.

- Raffinement : les animaux seront hébergés avec un enrichissement du milieu pour leur bien-être adapté à leur âge. Les procédures (surveillance clinique, administration des substances chimiques, anesthésie, prélèvements, autopsie) seront effectuées par du personnel qualifié et expérimenté. Des points limites appropriés et validés par le comité d'éthique et la SBEA ont été mis en place dans chaque procédure. A la fin de chaque étude, une évaluation rétrospective sur le bien-être animal est réalisée par la SBEA et le comité d'éthique.

18796 Le cancer de la prostate est le 1er cancer chez l'homme en fréquence. Actuellement, en fonction de l'avancé de la maladie, plusieurs approches thérapeutiques sont utilisées telles que la chirurgie, l'hormonothérapie la chimiothérapie et également la radiothérapie. Concernant cette dernière approche celle-ci est particulièrement intéressante pour traiter des tumeurs localisées ou encore en complément à la chirurgie pour traiter les résidus de tumeur. Néanmoins, les formes avancées de cancer de la prostate, notamment celles accompagnées de la présence de métastases, reste résistance à ces approches thérapeutiques. Aussi la recherche s'oriente vers de nouvelles stratégies.

Ainsi, le présent projet consiste à évaluer les effets anti-tumoraux de différentes approches thérapeutiques (chimiothérapie, immunothérapie, radiothérapie - associées ou non à une ablation chirurgicale de la tumeur) dans des modèles expérimentaux de cancers de la prostate chez la souris induits par l'inoculation de cellules tumorales.

Après implantation des cellules tumorales, les souris seront suivies cliniquement pendant une période variable, allant de quelques semaines à plusieurs mois, en fonction de la vitesse de croissance tumorale in vivo des cellules implantées et de l'apparition des signes cliniques associés à la tumeur. Selon les cas, le suivi de la croissance tumorale pourra être réalisé par l'utilisation des techniques d'imagerie.

Les animaux seront suivis quotidiennement.

Pour ce projet, il est prévu un nombre maximal de 800 animaux sur 5 ans.

La conception de ce projet prend en compte la règle des 3R.

Remplacement : dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez la souris car il n'existe pas de méthode de substitution (in vitro ou in silico) pour évaluer les effets d'une nouvelle approche thérapeutique pour ces tumeurs. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité, de la toxicité et de la pharmacocinétique d'un candidat médicament. À ce jour, la souris est l'espèce la plus adaptée à ce type de modèle d'étude.

Réduction : Un nombre minimal et suffisant d'animaux par groupe est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et d'effectuer des analyses statistiques.

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

- la mise au point de procédures rigoureuses
- un protocole analgésique adapté pour la chirurgie et la période post-opératoire et un suivi post-opératoire de l'état de santé des animaux avec des soins et un enrichissement adapté afin de permettre une bonne récupération des animaux
- le recours à des procédures les moins invasives et moins douloureuses possibles (par exemple l'imagerie)
- un suivi clinique étroit des animaux pendant la phase de croissance des tumeurs et après
- la mise en place de points limites adaptés et le suivi d'éventuels signes cliniques
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

18797 La piscine de Morris est un outil précieux pour étudier l'apprentissage et la mémoire chez les rongeurs. Dans ce test, l'animal est placé à la périphérie d'une piscine circulaire remplie d'eau opacifiée et doit nager jusqu'à une plateforme fixe cachée 1cm sous la surface de l'eau. Au fur et à mesure des essais, l'animal apprend à localiser l'emplacement de la plateforme à l'aide d'indices visuels placés sur les murs de la pièce d'expérimentation. Ce test est largement utilisé dans la recherche préclinique pour caractériser les déficits cognitifs associés à certaines pathologies comme la maladie d'Alzheimer et détecter de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

Nous souhaiterions optimiser notre protocole actuel sur la Souris afin de diminuer le stress des animaux et la variabilité des résultats. Cela nous permettra ainsi d'augmenter la puissance statistique de ce test et de réduire les effectifs nécessaires pour les futures études. Nous souhaiterions également mettre en place ce protocole chez le Rat pour répondre au mieux à la demande de nos clients.

Une comparaison entre l'ancien et le nouveau protocole sera faite chez la Souris et le Rat.

Deux groupes de 12 souris mâles et deux groupes de 12 rats mâles sont nécessaires pour cette comparaison :

-Un groupe de souris et un groupe de rats testés avec l'ancien protocole.

-Un groupe de souris et un groupe de rats testés avec le nouveau protocole.

Les effectifs utilisés pour cette validation correspondent à ceux classiquement utilisés dans notre protocole de test actuel et permettent d'obtenir une puissance statistique adéquate.

La première piscine de Morris réalisée sur les souris n'a pas donné de résultats meilleurs pour le nouveau protocole. Une expérience supplémentaire sur 48 souris afin de sélectionner la localisation idéale de la plateforme est nécessaire pour l'optimisation du test.

Ce projet nécessitera donc 96 animaux au total.

REMPLACEMENT : il s'agit d'un test utilisé pour des prestations de service se faisant chez la souris et le rat pour nos clients. Ainsi, l'utilisation de ces deux espèces est inévitable.

REDUCTION : en augmentant la puissance statistique du test, nous pourrions diminuer les effectifs nécessaires pour les études futures.

RAFFINEMENT : notre nouveau protocole vise à diminuer la variabilité des résultats en réduisant le stress induit par l'eau et ainsi améliorer le bien-être des animaux suivant cette procédure.

18798 Le trouble de stress post-traumatique (TSPT) est un trouble sévère lié au stress se développant chez environ 25% des individus confrontés à une situation de stress intense vécue comme traumatisante (un attentat, une agression ou encore des combats militaires). Les bases neurobiologiques de l'altération mnésique propre à l'état de stress post-traumatique restent aujourd'hui encore peu connues.

Trouver une thérapie pouvant atténuer les déficits comportementaux liés au TSPT est donc un enjeu de santé publique. Notre stratégie de recherches est d'étudier un modèle de souris pouvant mettre en évidence une nouvelle cible thérapeutique.

Le TSPT s'accompagne fréquemment de pathologies comorbides liées au stress telles que l'anxiété ou la dépression. C'est pourquoi nous souhaiterions mesurer les comportements de type anxieux et dépressifs chez une lignée transgénique actuellement étudiée pour son implication dans le TSPT. L'incidence des pathologies liées au stress étant plus élevée chez les femmes en général, ces mesures comportementales seront effectuées chez les souris mâles et également chez les femelles.

Ce projet nécessite l'utilisation de 180 souris transgéniques.

Ce projet sera réalisé dans le respect des règles des 3Rs (Remplacement, Réduction, Raffinement) et du bien-être animal.

- Remplacement : L'utilisation d'animaux se justifie par l'impossibilité de Remplacer pour plusieurs raisons :

1) Aucune alternative ne permet de se passer de l'utilisation de modèles animaux lorsqu'il s'agit d'étudier des comportements liés au stress.

2) L'organisation du système nerveux central de cette espèce est assez proche de celle de l'Homme, ce qui permet une extrapolation acceptable des résultats obtenus chez ces espèces à l'espèce humaine.

- Réduction : les procédures expérimentales seront mises en œuvre pour réduire au maximum le nombre d'animaux par groupe tout en ayant une puissance statistique suffisante. Le maximum sera fait pour utiliser les mêmes animaux dans plusieurs procédures expérimentales.

- Raffinement et bien-être animal: la réalisation des expériences sera confiée à des utilisateurs expérimentés et diverses mesures seront prises : choix d'un modèle approprié, surveillance quotidienne et raffinement des conditions d'élevage et d'hébergement (enrichissement placé dans les cages), planification des protocoles en vue d'éviter le stress des animaux, utilisation de procédures expérimentales peu invasives, utilisation d'anesthésiques si nécessaire, établissement de points limites.

18799 L'arthrose est la maladie musculo-squelettique la plus fréquente affectant environ 40% de la population de plus de 70 ans. L'arthrose est considérée comme une pathologie à évolution lente affectant tous les tissus entourant l'articulation atteinte. Actuellement, il n'existe pas de traitement permettant de ralentir l'avancée de la maladie qui nécessite le recours à la chirurgie dans les cas les plus sévères. Des avancées récentes par des études in vitro et in vivo publiées par des équipes concurrentes ont proposé qu'une accumulation de cellules sénescents articulaires est à l'origine de la pathologie. Bien que ces cellules sénescents soient arrêtées dans le cycle cellulaire, elles sécrètent des facteurs délétères pour les tissus. De plus il est néanmoins nécessaire de généraliser ces découvertes sur d'autres modèles précliniques arthrosiques afin de pouvoir tester une approche thérapeutique intra-articulaire transférable un jour aux patients.

Le but de ce projet est d'évaluer de nouvelles sénotherapies ciblant la sénescence articulaire sur l'évolution de l'arthrose. Cette arthrose sera soit induite chez des souris jeunes par injection de collagénase, soit apparaîtra naturellement chez les souris âgées. Pour réaliser ce projet, nous proposons :

1 - d'utiliser des animaux transgéniques (C57BL/6-p16-Cre/R26-mTmG) chez lesquels le gène rapporteur EGFP est sous le contrôle d'un promoteur spécifique de l'état de sénescence. Avec cette souris, ne souffrant d'aucun phénotype dommageable, nous pouvons facilement détecter la présence de la sénescence avec l'aide d'une caméra à fluorescence.

2- de traiter intra-articulairement les souris malades par injection d'agents sénotherapies capables d'éliminer les cellules sénescents in vitro.

Ce projet sera réalisé chez la souris car nous disposons de ce modèle transgénique et d'une longue expertise d'induction de l'arthrose chez ce rongeur. Nous utiliserons au maximum 135 souris au total dans ce projet, réparties en différents groupes.

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

- Remplacement : l'analyse du rôle de la sénescence cellulaire sur un modèle d'arthrose ne peut se faire que sur animaux vivants. Il n'est donc pas possible de prévoir une méthode substitutive pour répondre à la question scientifique de ce projet.

- Réduction : le nombre d'animaux a été calculé

en tenant compte des pertes éventuelles lors des protocoles et en se basant sur l'expérience acquise au laboratoire en termes d'incidence de l'arthrose chez la souris et de mise en évidence d'effet significatif sur les paramètres histologiques mesurés en fin d'expérience.

- Raffinement : toutes les mesures seront prises pour réduire la souffrance des animaux. Les injections intra-articulaires se feront sous anesthésie gazeuse. Le milieu d'hébergement sera enrichi (carrés de cellulose, copeaux de litière) et les animaux seront surveillés quotidiennement.

18800 La peur est une réponse innée et transitoire exprimée lorsqu'un sujet est exposé à un danger. L'expression de peur élevée et continue en absence de danger correspond à un trouble psychiatrique dénommé anxiété. Cette pathologie constitue la condition psychiatrique possédant la plus forte prévalence. Selon un rapport de l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) de 2007, 10,7% des hommes et 14,5% des femmes en France présentent des troubles d'anxiété généralisés. L'anxiété représente ainsi un coût sociétal et économique majeur. Une hypothèse prédominante des neurosciences propose que l'anxiété, qui est une peur pathologique, soit causée par un dysfonctionnement des circuits neuronaux qui contrôlent la peur physiologique. Bien que de nombreuses études d'imagerie cérébrale de patients supportent cette hypothèse, elle demeure incertaine, et les mécanismes cérébraux des troubles anxieux sont toujours méconnus. Aussi, des moyens considérables sont mis en oeuvre dans la recherche pour mieux comprendre et maîtriser les mécanismes impliqués dans la peur et l'anxiété, ce qui représente un enjeu majeur tant dans le domaine académique que dans celui de l'industrie pharmaceutique.

L'objectif de ce projet est la validation d'une méthode non invasive d'investigation comportementale reflétant des aspects nouveaux de l'expression des comportements de peur et d'anxiété chez le rat et la souris. Cette approche, qui permet une analyse plus sensible et plus fine des états de peur et d'anxiété est potentiellement d'un grand intérêt du point de vue éthique, offrant la possibilité de détecter de façon objective et automatique une composante particulièrement importante du bien-être animal. Elle offre également des perspectives importantes pour la recherche académique et pharmaceutique sur la peur et l'anxiété chez les rongeurs de laboratoire.

Ce projet respecte les principes de remplacement, réduction et raffinement.

Remplacer: Le projet porte sur l'étude de la dynamique comportementale et physiologique de l'expression de peur et d'anxiété. Ceci ne peut se faire que sur l'animal vivant car il n'existe pas de modèle réaliste de ce comportement in vitro ou in silico. Nous avons opté pour l'utilisation du rat et de la souris car ces rongeurs présentent le meilleur équilibre entre les bénéfices (accessibilité expérimentale et pertinence par rapport aux pathologies chez l'humain) et les dommages escomptés (souffrance liées aux conditions d'élevage ou d'expérimentation).

Réduire: Nous avons réduit au strict nécessaire le nombre d'animaux permettant d'assurer la fiabilité statistique de notre étude. Nous utiliserons ainsi 10 rats et 10 souris sur 1 an.

Raffiner: A part dans la période de récupération post-chirurgicale, les animaux seront autant que possible hébergés en cages collectives, afin de limiter le stress dû à l'isolement. Les cages seront également enrichies en nids de coton. Les actes chirurgicaux seront effectués dans les règles de l'art du point de vue de l'aseptie, de l'anesthésie, et sous traitement antalgique. Une surveillance particulière sera portée aux animaux en période péri-opératoire. Des analgésiques seront administrés en cas de douleur. Des points limites sont définis pour mettre fin à l'expérimentation en cas de douleur ou de souffrance excessive.

18801 L'étude des mécanismes génétique qui permettent la formation de tumeurs reste à ce jour non élucidé. Dans cette étude nous nous intéressons à une famille de gène qui est impliquée dans de nombreux cancers, en particulier le cancer de la vessie, le cancer du foie et le cancer de l'ovaire. Cette famille de gènes est très fréquemment retrouvée altérée dans ces cancers, et nous avons pour hypothèse qu'ils sont responsables de la formation de tumeur. Nous avons à ce jour recensé 22 altérations sur cette famille de gène chez les patients atteints de cancer de la vessie, du foie et de l'ovaire.

Notre objectif est d'identifier parmi les 22 altérations le ou les modifications génétiques qui sont responsables du développement du cancer. Ces résultats auront un double intérêt, d'une part de mieux comprendre les mécanismes biologiques de cette famille de gène et d'autre part de permettre un diagnostic précoce des patients.

Au laboratoire nous avons modifié génétiquement une lignée humaine non tumorale avec les 22 anomalies génétiques retrouvées en clinique humaine. Nous injecterons ces 23 lignées cellulaires (lignée sans modification génétique + les 22 modifiées) sur des souris immunodéprimées afin de

suivre à la fois leur pouvoir de formation de tumeurs et leur agressivité via le critère de vitesse de croissance tumorale.

Ce projet a pour objectif de comprendre les mécanismes génétiques impliqués dans la formation tumorale et aussi dans leur agressivité. Afin d'adresser cette question, notre projet nécessite le recours à l'utilisation d'animaux, en particulier des souris immunodéprimées, car il est actuellement impossible de répondre à cette question avec des techniques *in vitro*. En effet ces techniques ne nous permettent pas d'avoir un micro-environnement complexe et de la vascularisation qui sont un maillage indispensable pour le développement de tumeur et de leur prolifération.

Pour le bien-être animal, et le raffinement des expériences, nous prévoyons pour tous les actes pouvant engendrer un stress ou une douleur, l'utilisation d'anesthésie et/ou d'analgésique. Afin de réduire le stress de l'animal, l'environnement sera enrichi avec du coton leur permettant de se protéger et de créer un nid. Les animaux recevront de l'aliment type Diet gel energy en cas d'affaiblissement ou de baisse d'appétit. Pour la réalisation de ce projet, nous prévoyons d'utiliser un maximum de 230 souris.

18802 La transplantation d'organe consiste à remplacer un organe non fonctionnel par un organe provenant d'un donneur (vivant ou décédé) de la même espèce mais génétiquement différent. Un des principaux risques après une transplantation est le rejet de l'organe greffé. Celui-ci résulte de la capacité du système immunitaire du receveur à reconnaître comme étranger le tissu transplanté. Actuellement, on considère que les lésions de rejet sont principalement le fait des effecteurs de l'immunité adaptative, spécifiques du greffon : les lymphocytes T et les anticorps dirigés contre le greffon. Les lésions causées par les anticorps sont considérées actuellement comme la première cause de perte des greffons. La voie classique de production des anticorps dépend uniquement des cellules du receveur de la greffe.

Récemment, il a été mis en évidence, dans un modèle de transplantation cardiaque, une nouvelle voie permettant la génération d'anticorps et impliquant les cellules du donneur contenues dans le greffon au moment de la transplantation. Cependant, les mécanismes moléculaires qui régissent cette voie sont peu connus, et notamment les mécanismes par lesquels les cellules du donneur et les lymphocytes B du receveur coopèrent pour permettre la production d'anticorps par cette voie.

Ce projet vise d'une part à évaluer si un transfert de cellules peut à lui seul mimer l'immunisation qui suit une transplantation cardiaque (dans le cadre spécifique de cette nouvelle voie de production d'anticorps) et d'autre part à identifier la cellule du donneur impliquée dans la production d'anticorps.

Pour réaliser ce projet, il est prévu d'injecter des cellules par voie intraveineuse à des souris, après anesthésie, et de suivre la production d'anticorps chez les souris receveuses.

Ce projet devrait permettre d'acquérir des données nouvelles pour aider à limiter les procédures de chirurgie lourde réalisées chez les animaux pour l'étude de cette nouvelle voie de production des anticorps. De plus, l'identification de la cellule responsable permettra de développer à l'avenir des moyens de prévenir l'apparition d'anticorps après transplantation d'organe, limiter leurs effets délétères sur les greffons et augmenter la durée de vie des greffons. Il s'agit d'un objectif prioritaire en transplantation compte tenu de la pénurie d'organe.

Ce projet ne peut être mené sans l'utilisation d'animaux car le système immunitaire est un système biologique extrêmement complexe, et les interactions cellulaires qui aboutissent à la production d'anticorps ne peuvent avoir lieu qu'au sein de l'architecture d'un ganglion ou de la rate, ce qui est impossible à reproduire *in vitro*.

Aucune douleur n'est attendue dans ce protocole. En effet, l'ensemble des gestes (injections et prélèvements) sera réalisé sous anesthésie générale.

Des calculs d'effectifs ont permis d'établir le nombre minimal d'animaux par groupe pour que les résultats soient significatifs.

Le bien-être des animaux sera analysé et pris en compte tout au long du protocole avec un suivi adapté en termes de fréquence et de détermination des points limites.

Au total, le nombre d'animaux nécessaires à ce projet est de 32 souris (*mus musculus*).

18803 La transplantation cardiaque est le traitement de référence de l'insuffisance cardiaque avancée réfractaire au traitement pharmacologique. Durant le prélèvement cardiaque sur donneur, la préservation de l'organe est réalisée par immersion de ce dernier dans une solution de préservation en hypothermie profonde (4°C), afin de diminuer significativement son métabolisme et permettre ainsi de limiter son altération liée à l'absence d'oxygène pendant son transport vers le centre de transplantation. La durée de préservation d'un greffon cardiaque dans ces conditions étant limitée à 4 heures maximum, l'acheminement et la transplantation de ce dernier doivent donc être réalisées le plus rapidement possible une fois l'organe prélevé sur le donneur. Ce court délai de préservation ex-vivo entraîne une restriction des donneurs potentiels, selon la distance par rapport au centre de transplantation, et demeure à risque pour le greffon cardiaque en cas de durée prolongée d'acheminement ou de transplantation. Une alternative à ce mode de préservation dit « statique » a été proposée au début des années 2000, en réalisant une préservation "dynamique" par perfusion ex-vivo de l'organe avec du sang à 34°C, allongeant la durée de conservation jusqu'à 8 heures, permettant ainsi d'optimiser les chances de réussite de la transplantation lors des prélèvements à grande distance (i. e. État Unis). D'autres dispositifs de préservation de greffon cardiaque reposant sur le principe de perfusion ex-vivo hypothermique (4-8°C) ont également été développés et dont un fait actuellement l'objet d'un essai en prospectif multicentrique randomisé. Cependant, ce type de préservation est à haut risque d'engendrer des lésions irréversibles sur le greffon. Or la surveillance de la perfusion durant le transport réside uniquement dans le dosage du lactate circulant dans le perfusât. Le dosage de cette molécule reflète de manière imparfaite l'altération des tissus qui composent l'organe (réseau coronaire, structures musculaires). Plusieurs travaux réalisés lors de l'élaboration de ces différents dispositifs ont étudiés la variation de biomarqueurs myocardiques spécifiques, mais de manière non continue et surtout non reproductible en pratique clinique.

La spectrophotométrie est une technique qui consiste à mesurer l'absorption de lumière à une longueur d'onde électromagnétique donnée, par un élément (i. e. molécule) dont le spectre d'absorption correspond précisément à cette longueur d'onde. Cette technique permettrait de réaliser un monitoring continu des différents biomarqueurs relargués au cours de la perfusion ex-vivo des greffons cardiaques. La viabilité de l'organe serait ainsi surveillée et permettrait d'adapter les paramètres de perfusion.

L'objectif de notre étude est de valider le monitoring continu de biomarqueurs spécifiques de l'altération cardiaque lors d'une préservation prolongée par perfusion ex-vivo en hypothermie profonde. Il est nécessaire de quantifier selon les techniques standards ces différents biomarqueurs dilués dans le perfusât de la machine de perfusion et de les corrélés à une analyse spectrophotométrique réalisée en temps réel sur le perfusât. Il n'existe pas à notre connaissance de modèle alternatif à l'expérimentation animale pour l'analyse du métabolisme myocardique dans le contexte de perfusion d'organe isolé. Nous utiliserons un modèle porcin de prélèvement cardiaque puis de mise sur machine de perfusion extracorporelle.

Les méthodologies employées seront en parfait accord avec les règles d'expérimentation animale.

1) Remplacer : Le porc constitue un modèle de choix pour la recherche des mécanismes des pathologies cardiovasculaires en santé humaine. Les caractéristiques anatomiques et physiologiques cardiovasculaires du porc sont comparables à celles de l'Homme. La congruence anatomique des vaisseaux du cœur (aorte, artère pulmonaire) avec le circuit de perfusion extracorporelle tel qu'utilisé en pratique clinique. De plus, une précédente étude menée dans le laboratoire s'est intéressée au profil métabolomique de greffons myocardiques prélevés et mis sur machine de perfusion ex-vivo, après modélisation des différentes conditions cliniques de prélèvement. En effet, en plus du prélèvement d'organe conventionnel après mort cérébrale, s'ajoute un autre mode de prélèvement réalisé après un arrêt circulatoire dit « contrôlé ». Il s'agit de modéliser les conditions de survenue d'une ischémie myocardique chaude, comme celle survenant chez les donneurs de la catégorie 3 de la classification de Maastricht (1995, révisée en 2003). Ces situations cliniques ne sont reproductibles dans le cadre d'études in vitro ou in silico. Le modèle animal permettra une transposition rapide et pertinente des résultats à la pratique clinique.

2) Réduire : Il a été défini par analyse statistique qu'un effectif minimal de 9 porcs sera nécessaire. Le nombre d'animaux sera réduit au maximum pour atteindre une significativité statistique. Nous avons choisi de compter sur 3 animaux par groupe et d'augmenter ce nombre à 2 porcs supplémentaires en cas d'échec. Cependant, une fois le nombre de 3 animaux par groupe atteint, nous n'incluons plus d'animaux dans ce protocole expérimental. Nous utiliserons au maximum 11 porcs de 55 kg pour cette étude, répartis en 3 groupes.

Les poumons ainsi que les reins seront explantés et serviront dans le cadre d'une seconde étude interne au laboratoire et à une collaboration avec un laboratoire externe.

3) Raffiner : Après respect d'une période d'acclimatation de 5 jours entre congénères pour réduire l'anxiété, les porcs seront répartis de façon aléatoire dans trois groupes expérimentaux. Toutes nos procédures tiennent compte de la notion de point limite avec des critères d'interruption d'expérimentation. L'ensemble des procédures chirurgicales sera réalisé sous anesthésie générale balancée couvrant les composantes hypnotiques et analgésiques de l'anesthésie et conforme aux principes de l'expérimentation animale. Afin de tenir compte des besoins quotidiens de nos animaux et d'améliorer leur bien-être, les porcs auront une nourriture adaptée et seront stabulés en groupe de deux dans des cages de 2 m² (individus de poids <50kg) pour permettre un contact régulier entre congénères et réduire le stress. Leur environnement sera enrichi (activité de foussement encouragée, médecine ball, jeux dans le couloir, pesée sous forme de jeux avec récompense, planche à gratter, distributeur d'aliment).

18804 Contexte : Les plaquettes sanguines jouent un rôle vital pour arrêter les hémorragies en cas de blessures ou de lésions. Quand le taux de plaquettes circulantes chute en dessous de 10.000 plaquettes par μL de sang chez un patient (thrombopénie), le risque d'hémorragie interne devient important. Les plaquettes sont continuellement produites dans la moelle osseuse à partir de cellules précurseur géantes, les mégacaryocytes (MKs). Afin de libérer les plaquettes dans la circulation sanguine, les MKs doivent se faufiler au travers de pores étroits localisés dans la paroi de microvaisseaux sanguins. Pour cela, il est important que cette cellule géante puisse se déformer et se contracter par des mécanismes moléculaires totalement incompris actuellement. Cette étape est essentielle puisqu'elle conditionne directement l'efficacité de production des plaquettes circulantes.

Objectif : Dans le but d'élucider les mécanismes qui président à la libération des plaquettes in vivo, nous souhaitons comprendre comment les MKs entrent dans la circulation sanguine. Pour cela, nous appliquerons une méthode d'imagerie innovante, la microscopie confocale multiphoton, à des souris transgéniques exprimant une protéine fluorescente. Ceci nous permettra de visualiser les changements de formes du MK lors de leur entrée dans la circulation sanguine. Ces études seront réalisées en présence d'inhibiteurs pharmacologiques ciblant spécifiquement des voies de signalisation considérées comme essentielles dans l'adhésion/migration/invasion d'autres types cellulaires. Nous évaluerons l'impact de ces traitements sur la capacité des MKs 1) à interagir et à traverser la barrière des microvaisseaux, 2) à se déformer et 3) à libérer des plaquettes dans la circulation sanguine. Ce projet permettra de comprendre une étape clé de la production des plaquettes sanguines avec des retombées cliniques importantes en médecine transfusionnelle.

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

Remplacer : L'entrée des MKs dans la circulation sanguine met en œuvre simultanément des interactions entre les MKs, les vaisseaux et la circulation sanguine. Ces événements sont intégrés et demandent à être étudiés in vivo, d'où la nécessité d'utiliser des modèles animaux.

Réduire : Nous allons acquérir des images à faible grossissement permettant de visualiser, sur une même zone, un grand nombre de passages de MKs dans la circulation. Des expériences préliminaires au laboratoire nous ont permis de fixer à 12 le nombre de souris par conditions testées. Ce nombre de souris déterminé permettra d'obtenir des résultats exploitables statistiquement. A la fin de l'expérience, les souris seront mises à mort et il sera possible de prélever la moelle osseuse des fémurs afin de visualiser en détail les zones de contacts entre les MKs et les microvaisseaux.

Raffiner : Les conditions d'environnement sont optimisées par l'enrichissement des cages avec du coton et de la frisure pour permettre aux souris de construire des nids comme dans la nature, ce

qui leur permet de compartimenter leur environnement selon leurs besoins. Les animaux sont élevés en groupe, pour répondre aux besoins de cet animal social. Ils ont un accès permanent à l'eau de boisson et à la nourriture. Les expériences ont toujours lieu sur des souris profondément anesthésiées, maintenues au chaud tout au long de l'expérience pour éviter une hypothermie due à l'anesthésie, les yeux protégés par du gel ophtalmique. Des points limites ont été établis permettant d'interrompre les procédures et de soulager la souffrance animale. Pendant toutes les expérimentations, les animaux sont surveillés par du personnel entraîné. Ils veilleront au bien-être des animaux grâce à l'utilisation d'une fiche de suivi permettant d'éviter toutes douleurs ou souffrances inutiles de l'animal.

Ce projet nécessitera 108 souris au maximum

18805 Les maladies mitochondriales responsables de déficits de la production énergétique, notamment pour des tissus fortement consommateurs d'énergie comme le cœur, sont graves et ne disposent pas de traitement. Nous nous intéressons ici à la pathologie mitochondriale du Syndrome de Barth, qui se caractérise par une cardiomyopathie, une myopathie squelettique et un retard de croissance, dans laquelle des mutations dans le gène TAZ sont impliquées.

Notre consortium a déjà identifié au cours d'un premier criblage des médicaments qui pourraient être positionnés pour le traitement de ces maladies mitochondriales. Une première phase de ciblage de molécules a été faite sur des modèles eucaryotes simples tels que la levure et le nématode, et des modèles eucaryotes supérieurs tels que des cellules de souris ou des cellules cardiaques de patients obtenus *in vitro* reproduisant le syndrome de Barth associées à des mutations dans le gène nucléaire TAZ. A plus long terme, nous poursuivrons leur analyse, nous testerons leur efficacité et leur mode d'action à l'aide de modèles souris ou de cellules porteuses d'anomalies génétiques responsables de la pathologie. Cette étude devrait nous apporter des traitements pour ces maladies, ouvrant ainsi la voie à de futurs essais cliniques. Ces tests médicamenteux sur souris feront l'objet d'une future DAP.

Avant d'atteindre cet axe médicamenteux, il est nécessaire de caractériser la lignée murine TAZ KO permettant de mener l'étude, ainsi que de vérifier les meilleurs paramètres pour les futurs tests médicamenteux: c'est l'objet de cette première DAP. Cela n'a jamais été fait auparavant de manière si détaillée. Les caractéristiques du phénotype dommageable décrites par nos collaborateurs sont les suivantes: poids inférieur de 20 à 30% dès la naissance, défaut au niveau des ventricules cardiaques (plus fins : fonctions diastolique et systolique réduites), défaut au niveau de la morphologie des mitochondries (augmentation de la taille, baisse dans la densité des crêtes).

Le nombre d'animaux pour ce projet est de 190 souris: 95 mâles KO et 80 mâles WT, plus 15 mâles KO supplémentaires en cas de souci avec le phénotype.

Ce nombre est calculé au minimum afin de pouvoir extraire des données significatives des résultats qui seront obtenus (phénotypage et comportement). On utilisera au maximum chaque animal afin de collecter le plus d'échantillons et de mesures possibles (force musculaire, urine, sang, organes. . .). Aucune molécule active ne leur sera administrée, uniquement 2 solvants.

L'utilisation de modèles eucaryotes simple a été réalisée en début de projet, il est désormais nécessaire de compléter et finaliser ces études sur un modèle entier plus complexe, le modèle souris, afin d'étudier les réponses métaboliques et comportementales complètes.

Afin de minimiser le côté dommageable du phénotype des animaux, un suivi particulier sera réalisé pendant toute la durée de vie des animaux et un tableau de suivi du phénotype sera renseigné en interne afin de recueillir un maximum de données et de pouvoir rapidement ajuster un possible traitement avec avis du vétérinaire. Les animaux à phénotype dommageable (mâles KO) seront regroupés au sein d'une même portée afin de leur faciliter l'accès à la lactation. Des enrichissements sous forme de coton (nidification) et de cahutes (cachettes et jeux) leur seront proposés tout au long de leur hébergement.

18806 Les produits de santé (médicaments, dispositifs médicaux, etc.) constituent un élément clé dans la dispensation de soins de qualité aux patients. En effet, en alliant innovation et santé, la recherche

et le développement s'avèrent indispensables pour favoriser le progrès médical et l'accès aux meilleurs soins à tous. Or, par nature, ils sont destinés à être mis en contact avec le corps humain et peuvent donc entraîner des effets secondaires au niveau du site d'implantation : des dégradations importantes des tissus environnants peuvent nécessiter une ré-intervention chirurgicale. Des séquelles fonctionnelles peuvent en résulter dans les cas les plus graves. L'innocuité des produits de santé doit donc être testée pour garantir le bon rétablissement des patients après chirurgie.

Plus particulièrement, les progrès de la médecine thérapeutique et diagnostique a mis à disposition des professionnels de la santé de nouveaux dispositifs médicaux, sophistiqués et réutilisables. L'innocuité de ces produits de santé au cours de leur multiples utilisations est d'autant plus importante. Or, ces dispositifs varient en taille, en complexité, en fragilité, en immersibilité et présentent aussi des sensibilités différentes vis à vis des agents et des techniques de nettoyage, désinfection ou stérilisation utilisées. Afin de garantir la sécurité de ces dispositifs médicaux réutilisables, les fabricants ont la responsabilité d'appuyer l'allégation de réutilisation présente sur l'étiquette du produit en fournissant des instructions écrites complètes et compréhensives concernant la manipulation, le nettoyage, la désinfection, l'emballage, la stérilisation et, le cas échéant, l'aération de leurs produits. Les fabricants ont également la responsabilité de mener et de documenter tous les tests nécessaires pour valider la pertinence de ces instructions et ce, en vertu des réglementations d'étiquetage de la Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis (21 CFR801).

Ce projet concerne les tests de validation de nettoyage comme exigés par les instances réglementaires (FDA, Reprocessing Medical Devices in Health Care Settings: Validation Methods and Labeling - Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff - 17 Mars 2015). Pour réaliser ces tests, il est nécessaire de souiller artificiellement les dispositifs médicaux de manière à représenter leur utilisation clinique. L'un des marqueurs à étudier est l'hémoglobine résiduelle après nettoyage d'où le besoin de sang à incorporer dans la souillure.

Nous sommes fortement engagé dans le développement de méthodes alternatives in vitro : tests de cytotoxicité, test d'irritation in vitro, test de sensibilisation in vitro, modélisation sur cultures tissulaires et analyse mathématique du risque de toxicité. Cependant, aucune méthode alternative ne peut à ce jour se substituer au sang nécessaire pour simuler une souillure. Le sang de lapin est couramment utilisé.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est basé sur les recommandations des textes de référence (ex : AAMI TIR30 version 2011, ISO 17664 et 17665) et sur les contraintes scientifiques (ex : quantité de sang utilisée fonction de la taille du dispositif à souiller et du nombre de cycles de souillure/nettoyage à réaliser). Dès que cela n'impacte pas la santé ni le bien-être de l'animal, l'utilisation d'un même animal est optimisée de sorte à réduire le nombre total d'animaux utilisés (utilisation d'un animal issue d'une précédente procédure expérimentale dans le cadre de la réglementation en vigueur et après une période de repos minimale). L'estimation maximale du nombre d'animaux utilisés sur les cinq années du projet est de 520 lapins.

Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long du projet. Le type d'hébergement et les conditions environnementales sont adaptés à l'espèce. Des enrichissements spécifiques (foin, chainette et baton à ronger) sont présents dans les hébergements. Enfin, de la musique est diffusée en salle d'hébergement. Un comité d'éthique et une structure du bien-être animal intégrant plusieurs vétérinaires travaillent à temps plein de façon à veiller à l'application du meilleur niveau de soin.

18807 La dyspepsie fonctionnelle est un trouble gastrointestinal avec une forte prévalence (20%) et qui est caractérisé au niveau clinique par des symptômes divers dont une sensation de douleur ou de brûlure au niveau de l'estomac, une satiété précoce, des ballonnements, des nausées et une altération de la qualité de vie. Cette pathologie est courante et persistante avec une douleur et/ou un inconfort centré dans le haut de l'abdomen sans preuve d'anomalies structurelles organiques.

Les recherches sur les mécanismes pathologiques de la dyspepsie fonctionnelle montrent que ses causes sont multifactorielles.

La dyspepsie fonctionnelle est un syndrome clinique qui est souvent chronique et relativement difficile à traiter de manière satisfaisante. Quelques traitements (inhibiteurs de la pompe à protons, prokinétiques, antidépresseurs, inhibiteur de la recapture de la sérotonine) sont utilisés pour améliorer les symptômes, mais aucun traitement spécifique ou préventif n'a été encore développé ou fait preuve d'une réelle efficacité.

Les perturbations pathophysiologiques majeures observées dans la dyspepsie fonctionnelle sont :

- une vidange gastrique retardée, avec une prévalence entre 20 et 35%
- un fonctionnement gastrique altéré, notamment par l'activation des nerfs non-cholinergiques dans l'estomac, avec une prévalence d'environ 40%
- une hypersensibilité viscérale à la distension gastrique, résultant d'une perturbation des systèmes nerveux central et périphérique, avec une prévalence d'environ 30%
- et des facteurs psychosociaux variés comme l'anxiété et la dépression.

Des modèles animaux ont été développés pour déterminer les mécanismes pathologiques impliqués dans la dyspepsie fonctionnelle et pour développer de nouvelles thérapies. Les résultats ont permis de mieux comprendre la pathophysiologie de la dyspepsie fonctionnelle, mais des traitements spécifiques ou des médicaments préventifs n'ont toujours pas été développés. Par conséquent, l'utilisation des modèles animaux est indispensable pour rechercher des traitements efficaces de la dyspepsie fonctionnelle dans la mesure où cette pathologie implique des interactions entre différents organes comme l'estomac, l'intestin et le cerveau. Ainsi, des modèles cellulaires ne peuvent pas reproduire les principaux symptômes de cette pathologie.

L'objectif de ce projet est d'étudier l'effet de différents produits qui pourraient diminuer ou améliorer les symptômes évalués au cours de la dyspepsie fonctionnelle chez le rongeur (rat et souris). Ils seront évalués à travers plusieurs paramètres : évolution du poids corporel, vidange gastrique, satiété précoce, sensibilité viscérale, électromyographie digestive, analyses biochimiques du sang et de certains tissus, notamment.

Lors de ce projet, 4 procédures sont envisagées pour reproduire une dyspepsie fonctionnelle : après une irritation gastrique induite par l'iodoacétamide lors de la période néonatale, après l'administration d'un médiateur chimique, après l'administration d'un anticancéreux ou après la provocation d'un stress. Dans chaque procédure, 4 protocoles sont décrits et pourront être utilisés (mesure de la vidange gastrique, évaluation de la satiété, mesure de la sensibilité viscérale et mesure de l'activité électromyographique). Le nombre d'animaux utilisés est le plus petit permettant de mettre en évidence un effet pharmacologique statistiquement significatif, c'est-à-dire 12 animaux par groupe. Ce nombre se décompose de la manière suivante pour une procédure : 12 animaux x 4 groupes x 5 produits étudiés x 2 espèces (rats et souris) x 2 genres x 4 protocoles = 3840 animaux. Soit 1920 animaux au maximum par espèce, et 9600 animaux au maximum par espèce pour 5 ans et une procédure. Les animaux sont hébergés dans des conditions environnementales répondant à leurs besoins, avec un enrichissement adapté (tunnel, coton, sizzle dry, . . .). Un suivi quotidien de leur bien-être, dès leur arrivée, et l'application de points limites au cours des procédures et des traitements seront réalisés pour réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse.

Au maximum, 76800 animaux seront utilisés pour la durée maximale du projet (5 ans).

Durant les procédures, des prélèvements sanguins des animaux se feront sous anesthésie afin de réduire l'inconfort et le stress des animaux. Les animaux seront placés sur des tapis chauffants lors de l'anesthésie pour éviter une hypothermie.

18808 L'hémophilie B est une maladie héréditaire de la coagulation sanguine liée à l'X, qui est due à une diminution du taux de facteur IX et se traduit par des hémorragies au niveau des articulations, des muscles ou des organes internes, lesquelles surviennent spontanément ou à la suite d'un traumatisme accidentel ou chirurgical. Le traitement de substitution augmente les taux plasmatiques de facteur IX, ce qui permet une correction temporaire du déficit et de la tendance hémorragique.

Notre équipe a développé une nouvelle molécule recombinante humaine de facteur IX (FIX) à visée thérapeutique, pour l'hémophilie B ayant une demi-vie allongée. L'allongement de la demi-vie, 4 à 5 fois supérieure au Facteur IX naturel, a été obtenu grâce à la fusion du FIX à la sous unité B du facteur XIII. Néanmoins, le mécanisme responsable de l'allongement de la demi-vie, engendré par le FXIII-B, n'est pas bien connu. Nous avons fait l'hypothèse que la capacité du FXIII-B et de la protéine de fusion FIX-FXIIIB au fibrinogène et à l'albumine pouvaient expliquer l'allongement de la durée de vie de cette nouvelle molécule. L'albumine a une demi-vie plus longue que le Facteur IX grâce à la protection du récepteur Fc néonatal (FcRn).

Nous avons fait l'hypothèse que notre molécule qui se lie à l'albumine, pourrait bénéficier de la protection du récepteur Fc néonatal. Afin de vérifier cette hypothèse nous allons mesurer la demi-vie du FIX-FXIIIB chez des souris n'exprimant pas de récepteur FcRn.

Dans le cadre de ce projet de recherche fondamentale, 21 souris génétiquement altérées (FcRn KO) seront nécessaires pour la réalisation d'une étude pharmacocinétique et pour obtenir des résultats scientifiquement et statistiquement fiables. Ces souris sont dépourvues du récepteur FcRn et constituent le seul modèle permettant d'étudier le rôle des récepteurs FcRn et de l'albumine dans l'allongement de la demi-vie du FIX-FXIIIB. Ces souris seront obtenues grâce à un élevage nécessitant un maximum de 6 animaux.

Les principales procédures consisteront à injecter un faible volume de molécules anti-hémophiliques et à prélever chaque souris trois fois. Les 2 premiers prélèvements seront réalisés au niveau des plexus rétro-orbitaires de chaque œil ; ils provoqueront un inconfort de très courte durée mais ils seront exécutés sous contention légère et sous anesthésie gazeuse. Il s'agit de procédure de gravité modérée. Le troisième prélèvement terminal sera réalisé au niveau de la veine cave inférieure sous anesthésie générale profonde.

Durant le projet, tout sera mis en œuvre pour minimiser le stress de l'animal et améliorer son bien-être (conditions d'hébergement de l'animal, ...). Un suivi quotidien des animaux sera effectué et permettra d'évaluer si un animal atteint un des points limites auquel cas il sera profondément anesthésié puis euthanasié.

Le recours aux méthodes et techniques visant à supprimer ou à réduire au strict minimum les atteintes aux animaux seront donc systématiquement recherchées pour répondre au mieux aux critères de remplacement, de réduction et de raffinement (3R):

1) Remplacement : les études de demi-vie des molécules agissant sur la coagulation sanguine nécessitent un modèle animal vivant, doté d'un système vasculaire complet et fonctionnel. La souris est un modèle approuvé, fiable, des lignées FcRn KO sont disponibles et sont le seul modèle existant qui permet de réaliser ce projet.

2) Réduction : le nombre d'animaux utilisés dans ce projet sera réduit à son minimum sans compromettre la significativité statistique de l'expérimentation. L'élevage des animaux FcRn KO utilise le nombre minimal de couples reproducteurs et le schéma d'accouplement est ajusté pour la production du nombre d'animaux nécessaire aux besoins de l'étude. La procédure d'injection et de suivi de la demi-vie suit un plan d'expérience utilisant les plus petits effectifs d'animaux par groupe sur la base de notre expérience antérieure.

3) Raffinement : toutes les mesures seront prises pour veiller au bien-être de l'animal. Les conditions de l'élevage, de l'hébergement, des soins et des méthodes utilisées pour chaque étape de l'expérimentation se feront sous condition de minimiser douleurs, souffrance, angoisse et dommages durables que pourraient ressentir l'animal. Les gestes susceptibles de provoquer de la douleur, de l'inconfort ou de l'angoisse sont réalisés intégralement sous anesthésie générale.

Les expérimentateurs sont formés aux gestes impliquant un contact avec l'animal et à l'observation des signes cliniques fondamentaux, notamment dans le domaine de la coagulation. Selon les données antérieures issues de nos projets précédents, nous estimons le nombre maximal d'individus à 27 (6 animaux d'élevages et 21 animaux pour l'étude pharmacocinétique).

18809 Finalité du projet : recherche fondamentale

Objectifs et bénéfices escomptés : L'objectif de ce projet est de tester l'efficacité de nouvelles molécules à visée thérapeutique dans le cadre de la glycogénose de type 1a. Cette maladie rare et génétique se caractérise par une incapacité de produire du glucose (sucre) par l'organisme nécessaire pour maintenir sa glycémie entre 2 repas. Les patients développent des hypoglycémies sévères qui peuvent être fatales ; ils accumulent aussi, dans le foie et les reins, du glycogène qui est la molécule de stockage du sucre. Les patients ont donc des foies très gros mais aussi très gras car une partie du sucre se transforme en graisses. A long terme, une grande proportion de ces patients développe des tumeurs du foie qui peuvent nécessiter une transplantation.

Récemment, la découverte de molécules ayant une action d'inhibition de la synthèse du glycogène a permis de réduire l'accumulation de glycogène dans un autre type de glycogénose (maladie de stockage du glycogène) chez l'animal et dans différents modèles de cellules en culture. Notre objectif est de tester ces molécules chez des souris atteintes de glycogénose de type 1a dans le foie en étudiant leur impact sur le stockage du glycogène, mais aussi sur le stockage des graisses, dans le foie. Cette première étude permettra de valider ou non le potentiel thérapeutique de ces molécules, avant de proposer une étude pré-clinique complète.

Ces molécules se présentent initialement sous une forme injectable par voie intraveineuse, mais une formulation en nanoparticules administrables par voie orale a été récemment développée afin de limiter les injections. Les deux formulations seront testées dans cette étude sur une durée limitée à 4 semaines. L'efficacité de ces molécules sera évaluée après analyse de la physiopathologie du foie et des paramètres sanguins en comparant les souris traitées et non traitées.

Nuisances prévues : Une seule procédure permet de définir d'abord les conditions d'élevage et de suivi des souris atteintes de glycogénoses de type 1a, puis l'étude des molécules testées. L'induction de la glycogénose de type 1a dans le foie chez la souris est réalisée à partir de l'âge adulte (modèle inductible de la maladie). L'élevage de ces souris comprend des biopsies de tissus et des injections intrapéritonéales (douleurs légères). L'étude de l'efficacité de 3 composés connus pour inhiber la synthèse de glycogène sera réalisée deux semaines après l'induction de la glycogénose de type 1a. Deux molécules seront injectées 2 fois par semaine en veine caudale et 1 composé sera administré quotidiennement par voie orale, sur une durée totale de 4 semaines. Les souris seront mises à jeun pendant 6h juste avant leur mise à mort avec un risque de développer des hypoglycémies. De ce fait, la procédure est classée en gravité modérée. Ce jeûne permet de diminuer les stocks de glycogène du foie chez les souris non malades, alors que les souris atteintes de glycogénose de type 1a ne sont pas capables de mobiliser leur glycogène pour maintenir leur glycémie.

Applications de la règle des 3R :

Remplacement : L'efficacité de ces molécules sur l'inhibition de la synthèse de glycogène a été validée en culture cellulaire et dans un autre modèle de maladie de stockage du glycogène chez la souris. Ces études ont montré l'absence de toxicité de ces molécules in vivo. Cependant, avant de mener une étude clinique chez l'homme, l'efficacité de ces molécules doivent être évaluées dans un modèle de souris reproduisant la pathologie humaine afin de déterminer l'impact sur la physiopathologie du foie et sur les modifications des paramètres sanguins, après injection dans la circulation sanguine générale ou administration par voie orale.

Réduction : Le nombre de souris a été calculé au plus juste à partir des connaissances de la pathologie dans le modèle animal utilisé, du métabolisme du glycogène, de la régulation de la glycémie au cours du jeûne et des résultats d'études précédentes. Cette étude doit nous permettre de valider la preuve de concept et nécessitera des groupes de 5 souris malades traitées comparées à un groupe de souris non traitées. En contrôle, deux groupes de 5 souris saines seront utilisées comme référence. Au total, ce projet nécessitera l'obtention de 25 souris mâles transgéniques atteintes de glycogénose de type 1a et 10 souris saines sur une période maximale de 2 ans.

Les souris femelles transgéniques non utilisées dans ce projet seront destinées à la reproduction ou seront incluses dans un autre projet.

Raffinement : Les animaux seront élevés par groupe dans un environnement enrichi pour favoriser la nidation, avec accès libre à la nourriture et l'eau de boisson. Ils seront manipulés et pesés régulièrement avec une observation quotidienne de leur état général. Il est à noter que la maladie n'est induite qu'à l'âge adulte dans le foie des souris grâce à une méthode de transgénèse ciblée et inductible. Ceci permet d'éviter les hypoglycémies pendant la période néonatale qui peuvent être fatales. Ainsi les souris utilisées dans ce projet sont viables, avec une espérance de vie quasi normale. La bonne connaissance du modèle animal a permis de définir des points limites, afin de limiter en particulier le mal-être lié à l'hypoglycémie. L'accès à la nourriture est facilité avec des croquettes à disposition dans la cage pour les souris n'ayant pas la force d'atteindre les mangeoires, et les souris ont la possibilité de se réchauffer lors de leur mise à jeun ou lors de la détection d'une hypoglycémie afin d'éviter les hypothermies. En cas d'hypoglycémie sévère, les souris seront injectées avec du glucose. Afin de limiter les traitements par injection en circulation sanguine, une formulation en nanoparticules sera testée avec une administration quotidienne par voie orale, sous forme de gouttes déposées sur la langue des souris, ce qui évite le gavage qui est souvent irritant pour l'animal. Les souris seront mises à mort à la fin du protocole selon les méthodes autorisées par la législation afin de prélever les tissus à analyser.

Ce projet nécessitera au maximum 35 souris sur une durée de 2 ans.

18810 Finalité du projet : recherche fondamentale

Objectifs et bénéfices escomptés :

L'objectif de ce projet est de caractériser les mécanismes impliqués dans le développement d'une maladie chronique rénale observée chez la plupart des patients atteints de glyco-génose de type 1a à l'âge adulte. La glyco-génose de type 1a est une maladie génétique rare caractérisée par une incapacité de produire du glucose (sucre) par l'organisme pour maintenir sa glycémie entre 2 repas. Elle se caractérise par des hypoglycémies sévères qui peuvent être fatales. Comme le foie, le rein est un organe capable de produire du glucose. En bloquant la sortie du glucose des cellules rénales, le rein va accumuler du glycogène (assemblage de molécules de sucre), mais aussi des graisses.

La maladie rénale chronique est d'abord silencieuse (aucun symptôme ou mal-être). Elle peut être mise en évidence par la présence d'albumine dans les urines. En progressant lentement, mais irréversiblement, elle évolue vers une insuffisance rénale ce qui nécessite une dialyse pour éliminer les déchets qui s'accumulent dans le sang.

Le but global de ce projet est donc de mieux comprendre les mécanismes moléculaires menant à la perte de la fonction rénale. Plus précisément, nous essayerons de diminuer l'accumulation des graisses dans les reins pour évaluer leur rôle dans le développement de la maladie rénale.

Ce projet sera réalisé grâce à l'obtention d'un modèle original de souris viables atteintes de glyco-génose de type 1a en ciblant la maladie uniquement dans les reins. Ces souris développent la pathologie rénale, avec l'apparition des premiers signes cliniques (microalbuminurie dans urine) dès 6 mois. L'avantage de ce modèle est de ne pas toucher à la production de glucose par le foie, ce qui évite le développement d'hypoglycémie. Nous inhiberons chez ces souris la production de graisses spécifiquement dans les reins et nous étudierons l'impact sur la fonction rénale.

A long terme, ce projet permettra de mieux comprendre le rôle de l'accumulation de glycogène versus l'accumulation de graisses dans le développement de la maladie rénale. Ces connaissances seront utiles pour proposer ensuite des molécules thérapeutiques spécifiques.

Nuisances prévues : La première procédure permet de définir les conditions de suivi et d'élevage des souris atteintes de glyco-génoses de type 1a. Elle comprend des biopsies et des injections intrapéritonéales (douleurs légères).

La deuxième procédure est une étude pilote permettant de s'assurer que la nouvelle lignée de souris créée ne développe pas une pathologie rénale aigüe qui pourrait entraîner un mal-être des animaux.

La troisième procédure consistera au suivi du développement de la maladie rénale chronique grâce à des mesures de marqueurs biologiques de la maladie. Ces marqueurs urinaires ou sanguins nécessiteront une récolte d'urine de manière spontanée (aucune douleur) et une prise de sang

(douleur légère) tous les 3 mois. L'étude sera arrêtée avant l'apparition d'une insuffisance rénale (maximum 12 mois). Une élévation d'urée et d'acide urique dans le sang, accompagnée d'une albuminurie importante, et d'une perte de poids constituera un point limite de l'étude. Une grille de score a été établie pour éviter d'atteindre ce stade d'insuffisance rénale.

Le degré de gravité de la procédure 1 de production et d'élevage des animaux est léger (injections), alors que le degré des procédures 2 et 3 est modérée car le phénotype des souris n'est pas connu ; et plusieurs prélèvements sanguins sont envisagés lors de la procédure 3 qui peut s'étendre sur 1 an. Les animaux produits en procédure 1 subiront la procédure 2 ou la procédure 3, et seront mis à mort en fin de procédure 2/3 afin d'analyser les reins au niveau histologique et moléculaire.

Applications de la règle des 3R :

-Remplacement : Le développement de la maladie chronique rénale nécessite l'intégrité des reins ; elle est influencée par le régime alimentaire, et par l'accumulation de molécules dans le sang et dans les cellules rénales. Notre étude nécessite donc de travailler sur l'organisme entier pour conserver la physiopathologie rénale. Elle sera donc réalisée chez la souris grâce à une approche de transgénèse qui permet de cibler des modifications du métabolisme uniquement dans le rein.

-Réduction : Le nombre total d'animaux a été calculé au plus juste à partir de nos connaissances sur le modèle animal atteint de glycoséose de type 1a et développant une maladie chronique rénale. Afin de comparer statistiquement nos 2 groupes de souris aux paramètres de souris saines, 10 souris par groupe seront étudiées. Pour la procédure 3, les groupes seront constitués de 16 souris car une partie de l'étude est réalisée sur uniquement une zone du rein très restreinte. Les femelles transgéniques non utilisées dans ce projet seront utilisées pour la reproduction.

Raffinement : Le modèle animal utilisé est unique et permet de cibler la maladie rénale de la glycoséose de type 1a ce qui permet d'éviter les hypoglycémies qui peuvent être fatales chez les animaux développant la maladie hépatique. Les animaux seront élevés par groupe dans un environnement enrichi pour favoriser la nidation, avec accès libre à la nourriture et l'eau de boisson. Ils seront manipulés et pesés régulièrement avec une observation quotidienne de leur état général. La bonne connaissance du modèle animal a permis de définir des points limites. L'insuffisance rénale se traduit chez la souris par une perte de poids, une diminution du toilettage de la souris, voire une prostration des animaux. Grâce au suivi des paramètres biologiques sanguins et urinaires, ce stade ne devrait pas être observé dans cette étude. Les paramètres suivis chez la souris sont identiques à ceux suivis chez l'homme. Les souris seront mises à mort à la fin du protocole selon les méthodes autorisées par la législation afin de prélever les tissus à analyser.

Au total, ce projet nécessitera 156 animaux sur une durée maximale de 5 ans.

18811 Le but du projet est de valider les gestes techniques lors d'une pose de cathéter au niveau iliaque de l'intestin grêle chez la souris et de raffiner la reprise de la phase digestive. Cette technique sera ensuite utilisée au sein du laboratoire dans différentes procédures afin d'évaluer les conséquences physiologiques d'une administration entérique d'une molécule dans un modèle prédiabétique de résistance à l'insuline. Les effets de cet apport entérique seront évalués localement, en étudiant l'influence d'une molécule sur le microbiote, et systématiquement, en évaluant son rôle sur le métabolisme du glucose. Depuis une dizaine d'années, la flore intestinale est considérée comme un paramètre important pour la santé métabolique, et des pathologies comme l'obésité et le diabète sont associées à un déséquilibre du microbiote intestinal.

Ce projet a été élaboré en accord avec les 3R :

-Remplacer: Dans ce cadre, l'étude ne peut être réalisée que chez l'animal pour observer l'impact des métabolites bactériens dans l'apparition de l'insulinorésistance et de le diabète de type 2. Nous utiliserons des souris de réforme de l'animalerie dont le génotype n'est pas utilisable pour d'autres projets. Un lot de 20 animaux subira la chirurgie pour acquérir les gestes techniques et tous les soins post-opératoires jusqu'à la reprise d'une alimentation solide pour raffiner la période de reprise alimentaire après la pose du cathéter. Un 2ème lot de 20 animaux de souris sans régime spécifique et un 2ème lot de 30 souris sous régime riche en graisses subiront la chirurgie, les soins post-

opératoires puis une procédure de perfusion leur sera appliquée. Un total de 70 souris sera nécessaire.

-Réduire: Le nombre de souris qui subiront cette chirurgie a été calculé au plus juste pour assurer une bonne réalisation de la technique chez des souris obèses. Le fait d'apprendre cette technique sur des animaux de réforme permettra, lors de l'application de la technique dans d'autres procédures, d'utiliser un nombre d'animaux au plus juste déterminé par l'expérience acquise dans ce protocole.

-Raffiner: Cette procédure nécessite la maîtrise de gestes techniques de microchirurgie réalisés par des personnes expérimentées et entraînées (nécessité de réaliser la chirurgie régulièrement). Pour cela, cette étude pilote permettra de valider l'ensemble des gestes et techniques mis en œuvre pour effectuer cette chirurgie invasive par deux personnes expérimentées en microchirurgie digestive chez la souris. La pose d'un cathéter intestinal nécessite une prise en charge l'animal avant (période d'adaptation), pendant et après l'opération (au minimum 7 jours) pour limiter le stress et la douleur. Un mélange d'analgésiques sera injecté à la souris avant l'anesthésie et pendant 3 jours après la chirurgie. Un analgésique local sera appliqué avant l'ouverture de l'abdomen ainsi qu'au moment de la suture de la paroi abdominale. La chirurgie sera réalisée dans des conditions d'asepsie contrôlées pour limiter toute infection. Lors de l'intervention et à son réveil, la température de l'animal sera maintenue à 37°C. La reprise de l'alimentation sera progressive et contrôlée pour limiter tout risque de fissure intestinale ou toute occlusion. Une grille de suivi du comportement de l'animal et de ses paramètres physiologiques (respiration, température, prises alimentaire et hydrique) permettra de repérer tout signe de souffrance ou mal-être. L'atteinte d'un point limite (décrit dans la grille de score) entraînera la mise à mort de l'animal selon les méthodes autorisées par la législation.

En conclusion, ces expériences permettront de valider les gestes et les soins post opératoires de la pose d'un cathéter entérique chez la souris dans le but d'étudier ensuite les effets d'une administration entérique d'une molécule sur le microbiote intestinal, et systématiquement, en évaluant son rôle sur le métabolisme du glucose.

18812 De nombreux marqueurs d'agressivité des cancers ont été mis en évidence et utilisés pour prédire le taux de récurrence et/ ou la réponse aux traitements. La tétraspanine 8 (Tspan8) est une protéine qui peut entrer dans la catégorie des biomarqueurs d'agressivité notamment pour le mélanome, le cancer du sein, de la prostate et le cancer colorectal. Le statut en Tspan8 d'une tumeur peut donc être d'intérêt dans le suivi des patients. Nous développons des approches d'immunociblage de cette protéine à savoir les capacités d'une immunothérapie sur l'apparition de néoplasies cancéreuses (cancer de la prostate et cancer colorectal) à l'aide d'anticorps (Ac) ou encore la capacité de fragments d'Ac à délivrer des molécules anti-cancéreuses dans différentes tumeurs exprimant cette protéine (mélanome, cancer de la prostate et cancer colorectal). Le nombre d'animaux inclus dans ce projet a été optimisé conformément à la règle des 3Rs (Remplacement, Réduction, Raffinement). L'ensemble du projet comprendra 72 souris Nude NMRI, 18 souris APC min/+ Tspan8+ /+ & APC min/+ Tspan8+ /+ et 12 souris PTEN-/- soit 102 souris au total. L'âge des souris sera de 5 semaines à deux mois lors de leurs réceptions et le projet est prévu pour 5 ans.

Ce nombre a été calculé afin de garantir une valeur statistique à l'étude menée.

Des études in vitro réalisées en amont ont permis de remplacer l'utilisation des animaux et de valider la reconnaissance de la Tspan8 par les Ac et les fragments d'Ac à utiliser. Cependant, ces études sur cellules ne peuvent pas se substituer aux études sur un organisme entier afin d'évaluer l'efficacité du ciblage et/ou du traitement. Au cours de ce projet, le nombre d'animaux nécessaire est réduit au maximum en sélectionnant uniquement les expérimentations essentielles. Des lignées humaines seront implantées en sous cutanée chez les souris immunodéprimées et des souris présentant des néoplasies spontanées seront également utilisées. L'efficacité des immunothérapies sera mesurée par des critères objectifs (poids des animaux, mesure de tumeurs quand possible et évaluation des paramètres de souffrance).

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

18813 Les pesticides sont des produits dangereux, dont l'usage est strictement réglementé. Des données contradictoires ont été publiées, qui laissent craindre qu'une exposition chronique à de faibles doses de certains de leurs composés mette en danger le développement cérébral des embryons humains. Le risque que nous cherchons à évaluer, parce qu'il a pu être sous-évalué lors des tests réglementaires, est celui d'une interférence avec le fonctionnement de l'hormone thyroïdienne, l'hypothèse la plus souvent avancée pour expliquer cette toxicité neurologique. On sait en effet que cette hormone joue un rôle important dans le développement cérébral et qu'un déficit en hormone conduit à des déficiences intellectuelles. Les tests *in vitro* ne permettent pas de prédire avec certitude l'influence d'une exposition *in vivo* : ils ne prennent pas en compte le métabolisme hépatique, qui génère des composés dérivés parfois plus toxiques que le composé d'origine, et n'intègrent pas la biodisponibilité des molécules (catabolisme, élimination par les reins, stockage dans les adipocytes, passage à travers la barrière placentaire, passage à travers la barrière hémato-méningée, etc...).

Ce projet consiste à étudier la signalisation thyroïdienne dans le cerveau de souriceaux exposés à des pesticides pendant la gestation et le développement postnatal.

Les pesticides testés dans ce projet auront tous été identifiés au préalable comme perturbant la signalisation thyroïdienne de cellules en culture.

Ce projet nécessitera l'utilisation de 1600 souris. Ce nombre d'animaux est un nombre maximum, qui prévoit des répétitions d'expériences en cas de problème. Il se base sur le test de 4 molécules, mais il est possible que le nombre de molécules testées réellement *in vivo* soit inférieur, en fonction des résultats des tests *in vitro* à venir.

Les doses administrées seront toutes inférieures aux doses connues pour avoir des effets toxiques. Les souris seront examinées avec soin tout au long de l'administration des pesticides. Des points limites adaptés ont été définis de façon à éviter toute souffrance inutile.

18814 Ce projet concerne l'évaluation de produits immunologiques destinés à protéger des espèces de carnivores domestiques contre certaines maladies infectieuses microbiologiques (virales ou bactériennes).

Il repose sur l'évaluation de la réponse immunitaire et de l'innocuité des produits immunologiques de par l'analyse de marqueurs biologiques. La procédure constituant ce projet est de gravité modérée.

Cette procédure prévoit un suivi de l'état général chez des animaux en bonne santé et le suivi des paramètres biologiques suivants : hémato-biochimiques, sérologiques, immunocellulaires, histologiques, virologiques et bactériologiques.

Ce projet est conçu en accord avec les textes en vigueur de la Pharmacopée Européenne ainsi que les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement (3R), avec notamment :

-un caractère de stricte nécessité : cette procédure ne peut pas, pour le moment, être remplacée par des méthodes alternatives car elle répond à l'obligation réglementaire ou scientifique d'être conduite sur l'espèce de destination du produit ou sur un modèle de rongeurs le cas échéant;

-un nombre d'animaux envisagé qui est :

- soit en conformité avec la réglementation et la pharmacopée

- soit étayé à l'aide d'un raisonnement scientifique et/ou d'une analyse statistique et/ou d'une recherche bibliographie permettant l'atteinte de l'objectif du projet.

Au total, 1000 carnivores domestiques sur 5 ans et 5000 rongeurs sur la même période seront impliqués dans ce projet dans les conditions suivantes:

- hébergement des animaux en groupe avec présence d'enrichissements de manière à limiter le stress ;
- recours à l'anesthésie générale, si nécessaire, pour garantir le bien-être animal
- suivis cliniques fréquents et réguliers des animaux réalisés tout au long des procédures ;
- points limites adaptés et précisément définis afin d'éviter toute souffrance des animaux.

18815 Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) regroupent la maladie de Crohn et la RectoColite Hémorragique (RCH), deux maladies qui se caractérisent par une inflammation de la paroi du tube digestif. Ces pathologies concernent 10 millions de personnes dans le monde, dont 3 millions en Europe et 250000 en France et chaque année, 8000 nouveaux cas sont diagnostiqués, principalement chez le jeune adulte, entre 15 et 35 ans (source : Afa).

A l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement permettant de guérir ces pathologies, les traitements permettent seulement de contrôler la maladie. Certains traitements permettent de supprimer l'inflammation et cicatriser les lésions lors des poussées de la phase aiguë, d'autres permettent de prévenir l'apparition d'autres lésions et ainsi allonger la phase de rémission. Il est donc important de continuer la recherche de nouveau traitement afin d'améliorer le bien-être des malades au cours de leur vie, mais également pour trouver un nouveau traitement afin de guérir définitivement de ces pathologies.

L'objectif de ce projet est donc d'évaluer l'efficacité de nouveaux composés thérapeutiques innovants visant à traiter les MICI, notamment la RCH. Cette pathologie, contrairement à la maladie de Crohn qui se développe sur les différents segments du tube digestif (de la bouche jusqu'à l'anus), ne se développe qu'au niveau du rectum et du côlon. Différents modèles animaux ont été décrits dans la littérature afin de pouvoir étudier la RCH mais également évaluer les nouveaux composés thérapeutiques.

Un des modèles les plus décrit est l'induction de la pathologie grâce à l'introduction de Dextran Sulfate Sodium (DSS) dans l'eau de boisson, chez la souris.

Afin de répondre à l'objectif de ce projet, le recours à l'expérimentation animale est nécessaire car il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode alternative permettant de modéliser cette pathologie et ainsi de tester l'efficacité de composés thérapeutiques entraînant de multiples interactions cellulaires et moléculaires. Ainsi, la RCH sera induite chez la souris en introduisant du DSS dans l'eau de boisson pendant quelques jours.

Des suivis cliniques et des pesées corporelles seront réalisés au minimum 3 fois par semaine afin de détecter tous signes cliniques anormaux. Toute anomalie clinique observée sera rapportée au personnel responsable du projet ou à un vétérinaire si nécessaire dans le but de réaliser un examen clinique plus approfondi. Si possible des mesures thérapeutiques seront mises en place pour essayer de traiter les animaux en fonction des signes cliniques observés sans interférer sur l'étude en cours (injection de fluides, d'analgésiques, isolement, réchauffement, etc...). Des critères d'interruption ou « points limites » ont été définis et seront appliqués tout au long de ces études.

Lors de ce projet, 15 études pourront être réalisées afin de tester plusieurs composés thérapeutiques. Chaque étude comportera environ 90 animaux. Au maximum, 1350 souris pourront être utilisées pour l'ensemble du projet.

18816 Le diabète de type 2 (DT2) est un facteur de risque indépendant de l'insuffisance cardiaque. Divers travaux ont mis en évidence un dérèglement cardiaque du métabolisme glucidique. Nous avons récemment décrit une cardiomyopathie incluant une hypertrophie ventriculaire gauche et une dysfonction diastolique chez des souris lipodystrophiques et diabétiques seipine KO (SKO). Ces dysfonctions sont associées à la glucotoxicité cardiaque : augmentation de l'internalisation du glucose dans le cœur, de la voie de synthèse des hexosamines (Hexosamine biosynthetic pathway –HBP) et de la modification post traductionnelle associée : la O-GlcNac. Le traitement des souris SKO avec un inhibiteur du transporteur SGLT2 (SGLT2i) qui abaisse la glycémie, a amélioré la fonction cardiaque. Le but de notre projet est de déterminer l'implication de la HBP et de la GlcNac dans le développement de la cardiomyopathie des souris SKO. A l'aide des souris SKO, nous allons

déterminer si l'inhibition de l'HBP et par conséquent de la O-GlcNac, avec un inhibiteur de la GFAT (le Diazo-5-oxo-L-norleucine – DON), l'enzyme limitante de la HBP, améliore les paramètres cardiaques. Notre approche va nous permettre d'éclairer les mécanismes conduisant au développement de la cardiomyopathie chez les patients présentant un diabète de type deux.

Nous nous sommes efforcés de respecter dans ce projet la règle des 3 R. Le projet préconise l'utilisation d'un nombre de 120 animaux, ce qui, dans un souci de réduction correspond au nombre minimal d'animaux permettant d'obtenir des résultats significatifs (10 souris par groupe - calculs d'effectifs avec le logiciel GPower paramétré en fonction de nos expériences passées).

Réduire : nous avons précédemment défini la cinétique d'apparition des complications cardiaques chez les souris SKO et donc réduit le nombre d'animaux et le temps de l'expérimentation.

Raffiner : nous avons pris en compte le bien-être animal, un examen régulier permettra de prévenir les risques de stress et de souffrances. Nous avons intégré la gestion de la souffrance animale en utilisant les anesthésiques (Isoflurane 2%) adaptés à chaque procédure. En terme d'enrichissement, nous utilisons systématiquement des cages avec litières et frisottis qui sont complémentées, pour les animaux isolés avec soit un igloo soit un tube tunnel, les deux fabriqués en polycarbonate.

Remplacer : nos expériences chez l'animal sont indispensables pour observer des réponses physiologiques intégrées mais nous effectuerons plusieurs études en cultures cellulaires afin de remplacer au maximum l'utilisations des souris.

18817 Le dysfonctionnement au niveau des synapses c'est-à-dire au niveau des points de contact entre les cellules nerveuses ou neurones qui composent le cerveau, est un facteur central des maladies neurodéveloppementales comme par exemple les troubles du spectre autistique (TSA) et la déficience intellectuelle (DI). Ces pathologies se caractérisent par des anomalies du nombre et de la forme des synapses entraînant des défauts de communication cérébrale et en retour, des problèmes d'apprentissage et de mémorisation.

Le syndrome de l'X fragile (SXF) est la forme la plus fréquente de déficience intellectuelle héréditaire et cette maladie reste malheureusement sans traitement efficace à ce jour. La majorité des patients atteints présentent une DI associée à des troubles de l'apprentissage, de l'attention, et dans un quart des cas à des TSA. Ce syndrome résulte de mutations du gène FMR1 (Fragile X Mental Retardation 1) qui entraîne soit l'absence d'expression de la protéine correspondante, FMRP, ou bien l'expression d'une forme nonfonctionnelle de celle-ci.

Nous avons montré que la protéine FMRP est sumoylée. La sumoylation est une modification régulée d'une protéine cible qui permet de moduler ses fonctions. Le blocage de la sumoylation de FMRP chez la souris conduit à une augmentation dramatique de la quantité de synapses similaire à celle observée dans les cerveaux de patients atteints de SXF. D'ailleurs, la localisation de plusieurs mutations du gène FMR1 identifiées chez les patients atteints du SXF suggère que ces mutations pourraient exercer leurs effets délétères en gênant la sumoylation de FMRP.

Au laboratoire, nous étudions une de ces mutations identifiées chez certains patients, appelée mutation récurrente R138Q. Nous avons généré des souris génétiquement modifiées exprimant cette mutation (souris KI-R138Q). Ces souris présentent une diminution de la sumoylation de FMRP, une augmentation de la densité des synapses et des anomalies de communication neuronale. Notre équipe a récemment identifié deux mécanismes qui sont dérégulés chez les souris KI-R138Q et qui sont à l'origine des anomalies de communication synaptique observées chez ces animaux. Ces mécanismes représentent donc des cibles très intéressantes pouvant être utilisées à des fins thérapeutiques.

Les travaux que nous souhaitons mener sur nos souris KI-R138Q dans le présent projet visent à cibler ces deux mécanismes dans la perspective de développer des solutions thérapeutiques innovantes pour les patients atteints du R138Q-FXS et qui potentiellement, pourraient être étendues aux cas plus classiques de SXF. Pour cela, nous utiliserons sur nos souris génétiquement modifiées des agents pharmacologiques actifs sur les mécanismes d'intérêt et déjà utilisés en clinique dans d'autres indications que le SXF. En outre, nous évaluerons leur efficacité pour restaurer des niveaux

normaux de densité synaptique et de communication neuronale chez nos animaux modèles. Parmi toutes celles testées, nous sélectionnerons les molécules les plus efficaces afin d'évaluer leur intérêt thérapeutique chez une autre souris génétiquement modifiée, la souris *fmr1-KO*, qui n'exprime plus du tout la protéine FMRP, mais présente les mêmes défauts des deux mécanismes affectés par la mutation R138Q et constitue un modèle plus général du SXF.

Réduction : Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, un calcul méthodique du nombre de souris nécessaire, reposant sur la technique mathématique de référence connue sous le nom de calcul de puissance, a été réalisé. Le but de ce calcul est de réduire les effectifs d'animaux utilisés autant que possible, tout en garantissant que les résultats obtenus seront statistiquement exploitables. D'autre part, la réalisation de certaines procédures décrites dans le projet n'aura lieu qu'à la condition que les résultats obtenus dans les procédures précédentes en aient confirmé l'intérêt.

Raffinement : Ce projet comporte 3 procédures de classes modérées et 1 procédure sans réveil. Bien que seul un très léger inconfort soit éventuellement possible pour les animaux durant nos expériences, les procédures de ce projet seront réalisées avec le souci de minimiser leur souffrance et angoisse potentielles. Les souris utilisées seront élevées en cage réglementaire, chaque environnement sera enrichi pour leur bien-être avec des maisonnettes, des carrés de ouate et des morceaux de bois permettant aux animaux d'exprimer librement leur registre comportemental naturel. Des fiches de suivi du bien-être des animaux dans lesquelles seront identifiées des points limites humains et les actions correctives afférentes permettront de prévenir, de manière adaptée et précoce, la survenue de tout mal-être. Le cas échéant, les protocoles d'anesthésie et d'analgésie suivront les bonnes pratiques vétérinaires.

Remplacement : Les hypothèses que nous nous proposons d'explorer dans les procédures détaillées dans ce projet ont été bâties sur des résultats obtenus grâce à des méthodes alternatives (cultures *in vitro* etc...). Mais nous en sommes à un point de notre programme de recherche où il est nécessaire que nous travaillions dans un contexte moléculaire et physiologique qui ne peut être trouvé que chez l'animal intègre.

Le nombre total de souris mâles et femelles utilisées sur les 5 ans du projet afin de pouvoir réaliser des expériences contrôlées avec une reproductibilité adéquate sera, au plus, de 2268 animaux

18818 Ce projet se situe dans le domaine de la recherche expérimentale en neurosciences et vise à étudier les liens entre les récepteurs à la sérotonine de type 4 (R-5HT4) et les troubles de la mémoire observés dans de nombreuses pathologies du système nerveux central, telles que les maladies neurodégénératives de type Alzheimer. Ces troubles altèrent considérablement la qualité de vie des personnes qui en sont atteints et demeurent malheureusement résistants aux stratégies thérapeutiques actuelles. La stimulation des R-5HT4 par des molécules appelées agonistes semble être une stratégie prometteuse pour lutter contre ces troubles de la mémoire. En effet, ces récepteurs sont largement présents au niveau des structures cérébrales impliquées dans les processus de mémorisation, telles que l'hippocampe. Des données internes au laboratoire et issues de la littérature ont déjà démontré les effets bénéfiques de l'administration d'agonistes des R-5HT4 sur la mémoire chez l'animal. Ces effets ont été confirmés chez l'Homme lors d'une étude datant de 2018. Il est désormais bien établi que de nombreux processus mnésiques dépendent de l'hippocampe et que ce dernier est particulièrement impliqué dans le bon fonctionnement de la mémoire épisodique et spatiale, deux types de mémoire qui se trouvent précocement altérés chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer.

Ainsi, ce projet a pour but de mieux comprendre les mécanismes sous-tendant les effets observés sur les performances mnésiques après activation des agonistes des R-5HT4. Ainsi, nous étudierons les effets promnésiants ou anti-amnésiants d'un agoniste des R-5HT4 dans deux tests comportementaux à forte dépendance hippocampique et évaluant respectivement la mémoire de type épisodique et la mémoire spatiale chez la souris. Ces tests seront réalisés à la fois chez des animaux présentant des performances cognitives normales (modèle sain : souris sauvage C57BL/6JRj) ainsi que dans deux modèles complémentaires de déficit cognitif (un modèle de déficit

induit pharmacologiquement par la scopolamine ainsi qu'un modèle murin transgénique mimant certains aspects de la pathologie Alzheimer (5xFAD)).

Au cours de ce projet, 220 souris seront nécessaires (145 souris de souche C57BL/6JRj et 75 souris de souche 5xFAD).

Le projet se déroule en 3 procédures :

- La première vise à étudier l'efficacité d'un agoniste des R-5HT4 pour améliorer ou réduire les déficits de mémoire de type épisodique en condition normale ou pathologique (modèles de déficits pharmacologiquement ou génétiquement induit), respectivement. Le test comportemental utilisé repose sur de la reconnaissance spontanée d'objets.

- La seconde vise à étudier l'efficacité d'un agoniste des R-5HT4 pour améliorer ou réduire les déficits de mémoire spatiale en condition normale ou pathologique (modèles de déficits pharmacologiquement ou génétiquement induit), respectivement. Le test comportemental utilisé repose sur l'utilisation d'écrans tactiles et requiert une restriction alimentaire pour motiver l'animal à réaliser la tâche de mémoire.

- La troisième est la description de la méthode de perfusion-fixation intracardiaque, méthode indispensable pour prélever et conserver de façon optimale le cerveau de l'animal, en vue d'analyses réalisées de façon post-mortem.

Ce projet répond au mieux aux conditions d'éthique et de satisfaction de la règle des « 3R ».

Remplacer : aucun modèle alternatif ne pourrait satisfaire l'objectif scientifique de ce projet. Notre projet vise à valider les R-5HT4 comme cible thérapeutique de choix contre les déficits mnésiques communs à de nombreuses pathologies neurologiques. Ne s'agissant pas d'un médicament, l'agoniste des R-5HT4 utilisé ne possède pas d'autorisation de mise sur le marché. Il ne peut pas, par conséquent, être testé chez l'Homme. Ces études nécessitent donc être réalisées sur des organismes vivants dotées de fonctions cognitives proches de celles humaines.

Réduire : les tests seront réalisés sur des groupes de n=15-20 souris pour chaque étude comportementale. Ces effectifs permettent l'application de tests statistiques avec une puissance adaptée aux analyses envisagées. Afin de ne pas multiplier les groupes d'animaux, seule une dose d'agoniste des R-5HT4 sera testée (dose connue pour améliorer la mémoire en condition saine chez la souris).

Raffiner : Les principes éthiques et les standards de raffinement seront utilisés de la naissance à la mort de l'animal. Les animaux seront maintenus dans des conditions d'hébergement stables, contrôlées et avec un enrichissement du milieu de manière à assurer un bien-être optimal. Ce bien-être sera contrôlé pendant toute la durée des expérimentations par une surveillance bi-quotidienne les jours ouvrés de la semaine (inspection de chaque animal et prise de poids chaque jour) et quotidienne durant les week-ends et jours fériés par du personnel qualifié et formé. Tout animal en état de souffrance et/ou de mal-être sera immédiatement exclu du protocole et mis à mort. Les animaux seront manipulés quotidiennement avant le début des expérimentations et ne seront exposés qu'à des tests comportementaux. Les administrations d'agents pharmacologiques seront réalisées avec soin par un personnel qualifié. Toutes les précautions seront prises pour que la souffrance et l'angoisse occasionnée par les procédures soient minimales. La mise à mort sera occasionnée après une pré-analgésie et une anesthésie profonde au cours d'une classe sans réveil.

18819 La survenue, le développement et la persistance de tumeurs sont non seulement déterminés par le génotype des cellules tumorales, mais aussi par leurs interactions avec le micro-environnement qui module les capacités de développement de la tumeur. Dans le contexte du cancer colorectal (CCR), les bactéries qui composent le microbiote intestinal semblent jouer un rôle important dans la carcinogenèse colique. En 2012, on estimait que 15% des cancers dans le monde étaient attribuables à des agents infectieux, dont des bactéries, des virus mais également des parasites.

Ces agents infectieux peuvent avoir un effet pro-carcinogène, c'est le cas de certaines souches virulentes d'*Escherichia coli* produisant des effecteurs bactériens qui ont la capacité d'activer ou d'inhiber le cycle cellulaire. Plusieurs études ont montré que la muqueuse intestinale de patients

atteints de CCR est anormalement colonisée par des souches d'E. coli pouvant présenter des propriétés d'invasion et ayant acquis des facteurs de virulence. Parmi les facteurs de virulence identifiés dans ces souches, les toxines bactériennes nommées cyclomodulines peuvent interférer directement avec l'ADN ou avec le cycle cellulaire des cellules de l'hôte, et générer une instabilité génomique. La recherche de ces toxines a été effectuée dans les souches de E. coli isolées des tissus: 64,7% des tissus de patients CCR hébergent une ou plusieurs souches E. coli codant pour une cyclomoduline contre seulement 19,4% chez des patients témoins. La cyclomoduline la plus représentée est la colibactine.

Les microsporidies sont des champignons intracellulaires, dont les espèces les plus fréquemment impliquées en santé humaine sont *Enterocytozoon bienersi* et *Encephalitozoon intestinalis*. Ces espèces sont principalement retrouvées dans l'intestin où elles sont responsables de diarrhées, spontanément résolutive chez l'immunocompétent ou chroniques chez l'immunodéprimé. Les microsporidies sont capables d'inhiber l'apoptose des cellules et de favoriser leur prolifération.

Le rôle des co-infections par différents pathogènes dans la survenue de cancers reste à l'heure actuelle peu exploré. La bibliographie est pauvre en exemples illustrant la coopération spécifique entre une bactérie et un parasite. Pourtant, différentes associations impliquant notamment des interactions entre 2 pathogènes intracellulaires sont suspectées de potentialiser l'effet procarcinogène d'un ou des deux partenaires. C'est par exemple le cas du parasite *Plasmodium falciparum*, agent du paludisme, et du virus d'Epstein-Barr (EBV), associés au lymphome de Burkitt. Notre objectif est d'investiguer l'impact de la co-infection entre *Escherichia coli* producteur de colibactine et *Encephalitozoon intestinalis* sur la survenue de cancers colorectaux. Pour cela, des modèles animaux seront utilisés afin de quantifier l'impact de cette co-infection.

Trois modèles murins seront utilisés. Les 2 premiers modèles, de prédisposition variable au développement de tumeurs, auront pour objectif de quantifier l'impact synergique ou antagoniste des 2 agents infectieux sur la carcinogénèse. Le dernier modèle permettra de réaliser des xénogreffes (greffe de cellules intestinales humaines sur le flanc de l'animal permettant d'apprécier la prolifération cellulaire).

Durant toute l'étude, le nombre d'animaux estimé (au maximum) est de 735 animaux pour le premier modèle (mise en place d'une lignée génétique nécessitant des étapes de reproduction) et 100 animaux pour chacun des 2 autres modèles.

Ce projet est développé dans le respect de la règle des 3R. En effet, (1) les expérimentations sont organisées de façon à obtenir des résultats statistiquement exploitables avec le plus petit nombre d'animaux possible. (2) Les expérimentations et la méthodologie sont optimisées afin de réduire l'inconfort, la douleur ou l'anxiété subies par les animaux (soin porté à l'amélioration des conditions d'élevage et d'hébergement, enrichissement du milieu pour les animaux en bas âge). De plus, les modèles animaux sont choisis avec pertinence afin de répondre à la problématique posée. (3) Le recours à l'animal est indispensable afin de pouvoir évaluer l'effet de la co-infection sur l'apparition et la progression de tumeurs intestinales. Il n'existe pas d'alternative pour réaliser ces expériences.

A long terme, ce travail permettra de mieux comprendre l'impact de ces pathogènes sur la prolifération cellulaire, ouvrant ainsi de nouvelles pistes de recherche dans le domaine des cancers induits par les agents infectieux.

18820 Le cancer colorectal (cancer du côlon ou du rectum) est en France le troisième cancer le plus fréquent chez l'homme et le deuxième chez la femme, avec environ 45 000 cas diagnostiqués chaque année. Il représente la deuxième cause de décès par cancer en France, tous sexes confondus. Le développement de programmes de recherche sur l'étiologie et les caractéristiques cellulaires et moléculaires du cancer colorectal, ainsi que sur les facteurs susceptibles d'en moduler l'initiation et la progression, nécessite la mise au point de modèles expérimentaux adaptés.

Le but de cette étude pilote est de caractériser un modèle murin transgénique inductible (souris KPC :APC), permettant de reproduire expérimentalement différentes étapes de la carcinogénèse du colon, et de valider un protocole approprié pour l'induction de tumeurs. Les souris que nous utiliserons développent des tumeurs inductibles du colon, qui présentent des caractéristiques

similaires aux tumeurs colorectales humaines. Nous mettrons en place un élevage de souris KPC:APC et nous déterminerons les protocoles expérimentaux appropriés pour l'induction de tumeurs. Nous mesurerons la cinétique d'induction des tumeurs en fonction du génotype des souris et du protocole expérimental. À l'issue de cette étude, nous pourrions utiliser le modèle validé pour des études multigénérationnelles sur les facteurs de risque de cancer du colon.

De plus, nous utiliserons les colons de souris KPC:APC pour générer des cultures cellulaires 3D in vitro (ou organoïdes), qui permettront d'étudier finement les caractéristiques cellulaires et moléculaires des tumeurs du colon, ainsi que leur réponse à différents stressseurs tels que l'exposition à des rayonnements ionisants.

La carcinogénèse du colon est un processus complexe et multiphasique, et l'utilisation de modèles animaux pertinents de cancer colorectal est indispensable en l'état actuel des connaissances afin de mieux comprendre les facteurs de risque et la biologie, ou d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques ou de protection.

Cette étude pilote a été élaborée dans le respect de la règle des 3R (Réduire, Remplacer, Raffiner) :

- [Réduire] Le protocole expérimental a été développé de façon à diminuer autant que possible le nombre d'animaux utilisés. Nous utiliserons un total de 159 souris pour les expériences de tumorigénèse et pour le développement d'organoïdes (incluant 53 souris contrôle qui ne peuvent pas développer de tumeurs), auxquelles se rajoutent les souris utilisées pour le maintien de la colonie (environ 281) sur la durée de l'étude pilote. Une étude de puissance a été réalisée pour maintenir au plus bas le nombre d'animaux nécessaires pour l'obtention de résultats robustes statistiquement. Ce projet est donc déposé pour un nombre total d'animaux de 440.

- [Remplacer] Le développement d'organoïdes pourra permettre de limiter l'utilisation de modèles animaux et pourra contribuer à l'étude de l'étiologie et des facteurs de risque pour le cancer du colon. En effet, les études cellulaires et moléculaires utilisant des organoïdes nécessitent un nombre d'animaux significativement moins élevé que des études réalisées in vivo (une souris peut permettre de générer de très nombreux organoïdes sur lequel des expériences et mesures peuvent être réalisées).

- [Raffiner] Le développement de tumeurs est susceptible d'induire un stress et une douleur faibles à modérés. Eau et alimentation seront disponibles sans limitation et les cages seront enrichies en objets favorisant le bien-être de l'animal. Les animaux seront observés quotidiennement pour déterminer la présence éventuelle de signes cliniques ou comportementaux pouvant justifier une mise à mort anticipée si besoin. Les animaux présentant un ou plusieurs des points-limites définis seront euthanasiés.

18821 Le syndrome néphrotique idiopathique (SNI) à lésions glomérulaires minimales est la forme la plus fréquente des maladies rénales de l'enfant et de l'adulte jeune.

Ce syndrome est caractérisé par la survenue brutale d'œdèmes généralisés liés à une fuite urinaire massive de protéines (protéinurie) entraînant une perte importante de protéines du sang, en particulier de l'albumine ; ces œdèmes sont souvent associés à une hyperlipidémie et une hypercoagulabilité sanguine.

Bien que la majorité des patients réponde positivement au traitement de première intention par les corticoïdes, le taux de rechute est avoisine les 80%, et un traitement à long-terme qui associe les corticoïdes à d'autres immunosuppresseurs est souvent nécessaire pour maintenir la rémission, ce qui est problématique pour les patients compte-tenu des effets secondaires néfastes de ces traitements.

La cause exacte du SNI à lésions glomérulaires minimales reste inconnue, et d'après des études génétiques récentes, l'origine du SNI ne semble pas liée à une anomalie d'un gène. Actuellement, l'hypothèse la plus étayée par les différentes études cliniques et biologiques concernant ce syndrome, est celle d'une atteinte du système immunitaire dont certaines cellules, encore non

identifiées, pourraient sécréter un facteur soluble contribuant à la désorganisation de la barrière de filtration du rein.

Le facteur déclenchant le SNI, mais également responsable des nombreuses rechutes est le plus souvent une infection des voies respiratoires. Cependant, il a été remarqué également que cette maladie était plus fréquente, chez les patients prédisposés à développer des allergies, et dans les zones géographiques à forte pollution.

Deux types de cellules immunitaires, les lymphocytes iNKT et les lymphocytes T régulateurs (ou Tregs), ont une fréquence modifiée dans le sang des patients en poussée inaugurale ou en rechute de SNI. Lors des rémissions sous traitement, les taux de ces deux sous-populations se normalisent.

Notre équipe a identifié chez les patients atteints de SNI, une protéine (CMIP), dont l'expression est augmentée au cours des poussées de la maladie, dans les lymphocytes T et les podocytes (cellules de la barrière de filtration du rein). L'équipe a généré un modèle murin dont tous les lymphocytes T ont été modifiés génétiquement de façon à sur-exprimer CMIP.

Notre projet est d'évaluer l'effet de l'exposition à un air reproduisant l'atmosphère polluée de Pékin (représentative des métropoles les plus polluées) sur les lymphocytes T de souris sur-exprimant CMIP. Il consiste à évaluer si l'exposition à une atmosphère polluée, des animaux surexprimant la protéine CMIP dans les lymphocytes T soit en pré-natal, soit en péri-natal, augmente leur susceptibilité à un syndrome néphrotique expérimental.

Le mécanisme, atteinte lymphocytaire induisant la sécrétion d'un facteur de perméabilité qui désorganise la barrière de filtration rénale, ne permet malheureusement pas d'étudier les effets d'une atmosphère polluée sur des cultures cellulaires mais uniquement sur l'animal vivant.

Nous étudierons deux groupes de souris, des souris jeunes adultes soumises à un air pollué et un groupe de souris ayant été soumis à la pollution pendant la gestation.

Cette étude sera réalisée dans le respect le plus strict des réglementations et les souris seront hébergées dans des cages ventilées (5 souris par cage) avec à leur disposition eau et nourriture à volonté. Les cages sont équipées de matériels d'enrichissement afin de ne pas induire de stress inutile et de permettre aux souris d'avoir une occupation et construire leurs nids. Le nombre de souris utilisées pour chaque protocole a été établi de façon à permettre l'obtention de résultats statistiquement significatifs. La seule douleur infligée aux animaux consistera, pour les groupes soumis au protocole d'induction d'un syndrome néphrotique, à une seule piqure en intra péritonéale, ce qui a priori ne nécessite aucune prise en charge particulière des animaux. La solution injectée n'entraîne par elle-même aucune douleur ni réaction inflammatoire locale. La protéinurie, si elle entraîne l'apparition d'un très léger œdème général, n'entraîne aucune douleur. Tout au long de la procédure, les souris seront surveillées quotidiennement et si malheureusement un problème devait apparaître avec un animal celui-ci sera mis à mort.

Sur l'ensemble des 5 années pour lesquelles l'autorisation est demandée, nous utiliserons 920 souris.

Identifier le lien existant entre pollution et SNI serait une avancée majeure dans la compréhension de cette pathologie, et CMIP pourrait constituer une cible thérapeutique potentielle importante pour une pathologie où il n'existe pas d'alternative aux corticoïdes et autres immunosuppresseurs.

18822 La lipodystrophie congénitale de Berardinelli-Seip (BSCL) est une maladie rare caractérisée par une absence généralisée de tissu adipeux dès la naissance et une insulino-résistance sévère. La BSCL constitue l'une des formes sévères et précoces de diabète insulino-résistant. Dès le plus jeune âge, les patients développent une intolérance au glucose, un diabète, ainsi qu'une dysfonction cardiaque. La BSCL est transmise selon un mode autosomique récessif. En 2001, des mutations dans le gène BSCL2 ont été découvertes chez des patients atteints de BSCL. Le gène Bsl2 code pour une protéine de fonction encore mal connue, la " seipine ". Nos travaux et d'autres ont pu montrer que la seipine était impliquée dans la différenciation adipocytaire et la survie adipocytaire mais sa fonction exacte demeure inconnue. Depuis 2017, nous avons développé et caractérisé le phénotype de souris dont la délétion en seipine est induite spécifiquement dans le tissu adipeux. Cette délétion entraîne en moins de 15 jours une perte de tissu adipeux et en 3 mois le

développement d'un diabète de type 2. La caractérisation du phénotype nous a permis de mettre en évidence deux mécanismes physiopathologiques : l'induction du stress du réticulum endoplasmique (RE) et un défaut de production d'ATP dans les adipocytes déficients en seipine, molécule centrale pour subvenir aux besoins énergétiques de la cellule.

Notre projet de recherche a pour objectif de mieux comprendre l'origine du stress du RE, de mieux caractériser les causes et les conséquences du défaut de production d'ATP, et en enfin de proposer des pistes pour corriger le phénotype lipodystrophique.

Nous nous sommes efforcés de respecter dans ce projet la règle des 3 R. Le projet préconise l'utilisation d'un nombre total de 416 animaux, ce qui dans un souci de réduction correspond au nombre minimal d'animaux permettant d'obtenir des résultats significatifs. Nous avons choisi une administration par voie sous-cutanée, moins traumatisante que les autres voies d'injection. De manière générale dans notre animalerie, nous utilisons un enrichissement systématique des cages réduisant le stress de nos souris. Nos expériences chez l'animal sont indispensables pour observer dans des adipocytes matures et les réponses physiologiques intégrées. Ce projet a une visée translationnelle et pourrait permettre d'identifier des agents pharmacologiques prometteurs pour corriger la dysfonction adipocytaire.

18823 De précédentes études ont établi que la diminution de la concentration d'oxygène dans le sang (ou hypoxie) chez le poisson zèbre entraîne une prolifération élevée des cellules musculaires dans le cœur (ou cardiomyocytes). Nous désirons utiliser cette fonctionnalité pour identifier les gènes qui contrôlent la prolifération de ces cardiomyocytes. Ces données pourraient être exploitées pour induire un processus de régénération cardiaque chez les mammifères et finalement chez l'homme. Nous utiliserons des protocoles publiés pour induire l'hypoxie soit par traitement avec une drogue induisant la suppression des globules rouges circulants et donc conduisant à une anémie, soit en réduisant le taux d'oxygène dissous dans l'eau.

Nous surveillerons les poissons présentant des signes d'hypoxie (nage à la surface à la recherche d'oxygène). Parce qu'il s'agit d'une procédure stressante, nous nous efforcerons de choisir et d'optimiser le protocole permettant de réduire le temps que les poissons passent à rechercher de l'oxygène tout en conservant une prolifération des cardiomyocytes robuste. Nous prévoyons d'utiliser 48 poissons adultes pour établir le protocole le moins stressant et 72 poissons pour la recherche expérimentale. Cette approche s'inscrit en conformité de la règle des "3R".

Du point de vue du Remplacement : il n'est pas possible de remplacer l'utilisation d'animaux pour cette recherche car le processus repose sur une réponse à l'échelle de l'organe vivant. L'effet de l'hypoxie sur la prolifération cardiaque a été décrite soit chez l'embryon de souris, soit chez le poisson-zèbre adulte. Cependant, plutôt que d'effectuer notre recherche sur des souris adultes enceintes pour induire une hypoxie chez les embryons, nous utilisons le poisson zèbre adulte car cela nous permettra de surveiller directement le stress / l'inconfort. Cette approche est moins invasive et nécessite moins de manipulation des animaux.

Réduction - Nous réaliserons des expériences pilotes pour déterminer quelles conditions sont les moins stressantes, les plus efficaces et nécessitant donc le moins d'animaux possible avec un taux de mortalité plus faible. Le nombre d'individus à utiliser a été réduit le plus possible mais calculé pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. De plus, nous utiliserons des animaux des 2 sexes, de manière indéterminée, afin de réduire le nombre d'animaux.

Raffinement - Nous effectuerons des expériences pilotes pour déterminer les conditions optimales qui sont les moins stressantes pour les animaux, mais qui produisent toujours une réponse hypoxique adéquate. Une grille d'évaluation sera mise en place afin de suivre le bien-être de nos animaux et d'établir des points limite. Nous prêterons une attention toute particulière à l'hébergement, aux comportements de nage et à la prise d'aliments des animaux.

18824 La stimulation cérébrale profonde d'une structure cérébrale (appelée noyau subthalamique) est devenue un traitement chirurgical de choix pour améliorer les symptômes moteurs de la maladie de Parkinson. Ce traitement s'est aussi avéré efficace pour traiter les déficits cognitifs rencontrés dans

des formes sévères de troubles obsessionnels compulsifs. Cette technique, cependant, engendre parfois des effets secondaires comportementaux chez les patients Parkinsoniens. Nous supposons que ces effets secondaires seraient dûs à un mauvais positionnement de l'électrode au sein des différents territoires fonctionnels du noyau subthalamique qui sont, à ce jour, mal identifiés. Ce projet vise, donc, à redéfinir ces différents territoires fonctionnels à l'aide de techniques électrophysiologiques et comportementales. Cette approche devrait ainsi permettre d'optimiser la stimulation cérébrale des patients parkinsoniens ou atteints de troubles obsessionnels compulsifs. Pour tester notre hypothèse, un maximum de 8 primates non humains seront inclus dans cette étude. Cet effectif a été réduit autant que possible mais est suffisant pour nous garantir l'obtention de résultats fiables (principe de réduction). Les animaux sont regroupés en fonction de leurs affinités, ils peuvent ainsi avoir des interactions sociales réconfortantes comme l'épouillage. Un programme d'enrichissement du milieu est assuré par le zootechnicien référent. Il a pour but de familiariser les singes aux expérimentateurs, de leur apprendre à coopérer pour les déplacements et pour les soins et enfin il a aussi pour but de diminuer l'ennui que peut générer la captivité.

L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et sera évalué grâce à une grille codifiant le niveau de douleur. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance (principe de raffinement). Ces questions seront donc appréhendées chez un modèle de parkinsonisme proche de la maladie humaine, au niveau d'un noyau subthalamique proche de celui de l'humain, nous permettant ainsi d'utiliser des électrodes à plusieurs contacts similaires utilisées chez le patient. Ainsi, nos résultats, de par la proximité entre l'humain et le primate non-humain, seront facilement transférables au patient, de sorte qu'il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou une simulation informatique (principe de remplacement). Ce projet préclinique vise donc à mieux comprendre le rôle neurophysiologique des différents territoires du noyau subthalamique dans l'élaboration des dimensions cognitive et motrice du comportement et de plus à optimiser l'efficacité de la stimulation cérébrale profonde pour les parkinsoniens et par là même envisager ce traitement pour d'autres indications.

18825 L'application de la règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer) est une nécessité éthique et une obligation réglementaire dans le cadre de l'utilisation d'animaux à des fins scientifiques. Ce projet a pour objectif de développer et d'implémenter de nouvelles technologies en support au programme 3Rs de notre Centre de Recherche.

L'utilisation de nouvelles technologies - comme la vidéo avec reconnaissance d'images par une intelligence artificielle, les cages ventilées numériques - sera évaluée pour développer un suivi automatisé de l'activité et des comportements des Rongeurs (souris et rats). Ces nouvelles technologies permettent de détecter et de quantifier l'activité locomotrice, les comportements alimentaire, dipsique et de toilette des animaux maintenus en groupes sociaux dans leur hébergement standard sans avoir besoin de les manipuler. En comparaison au suivi déjà mis en place dans les procédures expérimentales d'autres projets autorisés dans notre Centre de Recherche (études réglementaires avec administration de produit, évaluation de composés anticancéreux, suivi post-opératoire de modèles chirurgicaux), le suivi automatisé devrait détecter plus précocement des signes cliniques et comportements spécifiques permettant un arrêt anticipé de la procédure avec moins de contraintes pour l'animal (= raffinement). Il n'est pas possible de conduire ce projet sans animaux, puisqu'il s'agit de suivre de manière automatisée leur comportement et activité.

Jusqu'à 2000 souris et 500 rats pourront être utilisés sur une période 5 ans. Les animaux devant être soumis aux mêmes conditions que celles des procédures expérimentales pour lesquelles nous explorons des possibilités de raffinement grâce aux nouvelles technologies, ils pourront avoir une implantation tumorale en sous-cutanée, suivie d'un traitement anticancéreux administré généralement par voie orale. D'autres animaux pourront recevoir un traitement oral ou par voie sous-cutanée entraînant des effets pharmacologiques. Des interventions chirurgicales pourront être conduites dans le but d'évaluer l'intérêt des nouvelles technologies dans le suivi post-opératoire et afin d'évaluer d'autres protocoles d'analgésie. La grande majorité des animaux auront des

contraintes de gravité légère à modérée. Cependant, l'objectif étant de raffiner les procédures, c'est-à-dire diminuer la douleur, la souffrance et l'anxiété des animaux utilisés à des fins scientifiques, il est possible de mettre en œuvre des procédures de gravité sévère dans le but ultime d'en diminuer la gravité.

Le suivi automatisé des Rongeurs s'inscrit dans une démarche de raffinement des procédures expérimentales réalisées dans notre Centre de Recherche. Il pourra également contribuer à plus long terme à la réduction du nombre d'animaux grâce à l'augmentation de la reproductibilité des analyses.

En fonction des procédures expérimentales mises en œuvre, les animaux seront soit gardés en vie soit euthanasiés. Sur avis du vétérinaire, les animaux gardés en vie pourront être soit réutilisés soit placés.

18826 Chez l'Homme, l'hyperactivité détrusorienne est définie par l'International Continence Society comme étant « la constatation urodynamique de contractions détrusoriennes involontaires spontanées ou provoquées pendant la phase de remplissage vésical ». On distingue deux types d'hyperactivité détrusorienne (HD) selon le facteur étiopathogénique en cause (1) idiopathique (aucune cause définie n'est suspectée) ou (2) neurogène (HDN) quand il existe une cause neurologique identifiée (traumatisme médullaire etc.). La prise en charge médicale des patients est financièrement très lourde notamment suite aux complications urologiques (incontinence), modifications urodynamiques, infections urinaires ou insuffisance rénale chronique. Ces complications sont les 1^{ères} causes de réhospitalisation et affectent la qualité de vie et la morbidité des patients. La prévalence élevée, les conséquences psychosociales et les coûts relatifs à la prise en charge médicale font de ce syndrome un réel problème de santé publique.

Le bon fonctionnement du bas appareil urinaire impose l'intégrité du système nerveux central et périphérique, somatique et neurovégétatif. C'est à cette seule condition que la motricité vésico-sphinctérienne peut assurer l'alternance des phases de remplissage (continence) et de vidange (miction), par des phénomènes d'activation-désactivation de fibres musculaires des différentes structures anatomiques. Malgré les avancées médicales et chirurgicales, les traitements actuels pour cette pathologie et ses complications sont limités.

L'association antimuscariniques/cathétérismes vésicaux intermittents est le traitement de 1^{ère} intention de l'HDN. L'efficacité de cette prise en charge est limitée et les effets 2^{aires} des antimuscariniques peuvent altérer l'observance du traitement. En deuxième intention, l'injection intradétrusorienne de toxine botulique A est désormais souvent proposée, en association ou non avec les antimuscariniques. Toutefois, l'efficacité à long terme de la toxine botulique dans cette indication n'est pas connue et le caractère invasif de sa délivrance est certain.

Il est donc nécessaire de conduire une recherche visant à une meilleure compréhension de la physiopathologie de l'HDN et la réalisation de tests précliniques sur un modèle animaux fiable, pour permettre le développement de traitements pharmacologiques innovants, tout en optimisant leur efficacité et limitant leurs effets 2^{aires}.

Il n'existe à ce jour aucun modèle in vitro permettant l'étude de cette pathologie (remplacement) définie par des symptômes et donc difficile à appréhender hors d'une situation physiologique ou physiopathologique.

Dans ce contexte, le modèle préclinique le plus pertinent qui présente des caractéristiques similaires à celles observées dans la pathologie humaine est le rat ayant subi une transection de la moelle épinière (SCI). Ce modèle de rats SCI a, par ailleurs, été précédemment employé pour évaluer l'effet des médicaments ou un dispositif de stimulation électrique pour le traitement de l'HDN. De plus, il est également envisagé de pouvoir comparer les résultats obtenus avec les rats SCI, à des modèles présentant une hyperactivité détrusorienne d'origine idiopathique par l'étude de rats spontanément hypertendus (Spontaneous Hypertensive Rat, SHR) ou diabétiques (Goto-Kakizaki, GK).

Les études pharmacologiques menées sur ce modèle conduiront à l'utilisation d'environ 1500 rats sur 5 ans. Le nombre d'animaux sera réduit au minimum nécessaire (réduction) pour réaliser des

statistiques acceptables (15 rats par groupe de traitement), du fait des connaissances et de l'expérience du personnel participant au projet et des procédures liées. Un suivi quotidien de l'état général et du poids des animaux sera réalisé, pour une action rapide en cas d'état de souffrance de l'animal. De plus, ces animaux présentent un trouble mictionnel qui nécessitera un change adapté, ainsi il est prévu une augmentation de la fréquence et de la quantité de litière (raffinement).

18827 Les traumatismes sévères de l'organisme (ex : sepsis, traumatisme crânien, inflammation aiguë) génèrent une réponse inflammatoire exacerbée afin de permettre à l'organisme de lutter efficacement contre l'agent vulnérant et de cicatriser. Cette réponse inflammatoire s'accompagne d'une réponse anti-inflammatoire compensatrice qui si elle perdure entraîne une immunodépression systémique favorisant les infections secondaires. Il a été observé que les patients hospitalisés suite à un traumatisme sévère sont particulièrement susceptibles de présenter une infection secondaire, dont la première d'entre elle étant la pneumonie.

De nombreuses recherches portent sur les extraits d'algues aussi bien dans le domaine de la phytothérapie que dans le domaine pharmaceutique. Ces études ont pu mettre en évidence que ces extraits d'algues ont une influence favorable sur notre organisme. Des recherches en biologie marine ont démontré un effet sur les bactéries et sur l'immunité.

L'objectif est de caractériser les effets immunomodulateurs d'extraits d'algues sur la susceptibilité des souris à réagir (d'un point de vue bactériologique, immunitaire et histologique) face à une infection pulmonaire suite à une immunodépression post-traumatisme. Nous chercherons à évaluer :

- les effets des extraits d'algues sur le système immunitaire et l'épithélium pulmonaire
- les voies de signalisation impliquées dans cette réponse

Pour mener à bien ce projet, nous utiliserons 2632 souris.

L'utilisation d'animaux pour évaluer le potentiel immunomodulateur de notre composé issu d'algue marine nous permettra d'apporter une nouvelle modalité thérapeutique pour : (i) lutter contre l'immunodépression post-traumatisme afin de rétablir l'homéostasie immunitaire ; (ii) réduire drastiquement le taux de pneumopathies bactériennes secondaires. Ce traitement préventif permettrait également de diminuer l'administration d'antibiotiques à large spectre et de lutter efficacement contre l'émergence d'antibiorésistance.

Ce projet est réalisé dans le respect de la règle des 3R. Remplacement : Les paramètres étudiés dans ce travail ne peuvent être aujourd'hui remplacés par des procédures in vitro. Réduction : Le nombre de souris a été réduit au minimum (groupe de 7 animaux) afin de garder une analyse statistique fiable et ce nombre a été optimisé en fonction des expériences précédentes. Raffinement : Pour leur confort, les animaux seront hébergés dans des cages adaptées (groupe de 5 maximum), avec enrichissement (frisottis et/ou dôme) et accès libre à l'eau et à la nourriture. De façon à diminuer le stress, la souffrance et la douleur, les animaux seront sous anesthésie générale et un traitement analgésique leur sera administré de façon adaptée en fonction de la procédure réalisée. Le bien-être des animaux est surveillé tout au long de l'étude avec évaluation quotidienne des signes généraux. Une grille d'appréciation a été mise en place avec un système de barème à point afin de minimiser au maximum l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse des souris et d'obtenir les informations pertinentes à moindre coût en termes de "bien-être" animal.

18828 La radiothérapie est l'une des méthodes les plus efficaces et les plus utilisées pour traiter les cancers. Au moins 50% des patients atteints d'un cancer seront traités par radiothérapie durant leur maladie.

Le principal défi de la radiothérapie est de parvenir à déposer une dose curative dans la tumeur tout en s'assurant que les tissus sains environnants soient préservés dans leur intégrité. Pour certains types de tumeurs radiorésistantes comme les gliomes (tumeurs cérébrales), la radiothérapie ne peut être que palliative. Pour parvenir à une dose de radiation curative, le risque de dommages graves aux tissus sains est trop élevé pour pouvoir être considéré.

Dans ce contexte, notre objectif principal s'inscrit dans l'amélioration des traitements de radiothérapie. Pour ce faire, nous explorons de nouvelles approches et nous proposons de développer des techniques innovantes utilisant de nouvelles modalités de traitement. Dans le cadre de ce projet, nous nous focaliserons sur des techniques innovantes qui ont montré dans des études préliminaires un intérêt significatif dans la préservation des tissus sains (même à des doses très élevées) ainsi qu'un effet très efficace sur le contrôle de la croissance tumorale chez le rat.

Nos travaux récents ont montré un rôle déterminant du système immunitaire dans la réponse antitumorale induite par les nouvelles techniques de radiothérapie (RT) que nous développons médié par les cellules T (type de lymphocyte). La réduction remarquable de la neurotoxicité ainsi que l'activation potentielle du système immunitaire font de nos techniques de RT un candidat idéal pour réaliser une thérapie combinée RT plus immunothérapie qui soit efficace. En particulier, nous allons évaluer la combinaison de notre technique de RT et de la thérapie cellulaire (injection de cellules CAR-T).

Remplacement : Nos critères d'évaluation pour l'efficacité de la technique vont porter sur la préservation des tissus sains environnants la tumeur et sur le contrôle de la croissance des tumeurs irradiées. Aussi, le recours à des méthodes alternatives n'est pas envisageable dans ce projet et il nous est indispensable de développer des modèles animaux.

Réduction : Pour la réalisation de ce projet, 1408 rats seront inclus dans des groupes de traitement comportant différentes doses et différentes configurations d'irradiation. Le nombre d'animaux a été statistiquement défini pour permettre l'obtention de résultats fiables avec le moins d'animaux possible. Notre projet va nécessiter de travailler sur des rats chez lesquels la taille plus importante du cerveau va être plus adaptée aux types d'irradiations proposées dans le cadre des procédures expérimentales.

Raffinement : En accord avec les recommandations internationales dans le domaine de la cancérologie, les conditions d'hébergement des animaux sont optimisées pour limiter leur stress. Un suivi clinique régulier sera réalisé pour s'assurer du bien-être des animaux (suivi du poids rigoureux et quotidien, mise en place de points-limites).

18829 Le syndrome de l'X fragile (FXS) est une maladie héréditaire qui entraîne une déficience intellectuelle et un profil comportemental caractéristique qui comprend les troubles du spectre autistique, le trouble d'hyperactivité avec déficit de l'attention, l'hypersensibilité sensorielle, l'hyperexcitation et l'anxiété. C'est l'absence de la protéine FMRP chez les malades qui cause la maladie. Le développement de modèles animaux du FXS a considérablement accru notre compréhension des conséquences de l'absence de FMRP sur la structure et la fonction du système nerveux, mais il n'existe à ce jour aucun traitement pour cette pathologie.

Un traitement au lithium, agissant sur la voie de signalisation Wnt, a été étudié de manière approfondie dans des modèles de FXS chez la souris et la mouche du vinaigre. Il a été démontré que ce traitement au lithium permettait d'améliorer de nombreux phénotypes comportementaux, physiologiques, moléculaires et cellulaires dans ces modèles, mais l'essai clinique chez des patients a révélé des effets secondaires sur la thyroïde et le rein incompatibles avec un traitement à long terme, malgré les bénéfices du traitement.

Ceci suggère donc que la voie de signalisation Wnt présente un intérêt pour une thérapie pour le FXS.

L'étude récente d'un nouveau modèle murin inactivé pour un gène de la voie Wnt, le gène *Ecr4*, a démontré que cette inactivation améliore sensiblement les capacités cognitives de ces souris.

L'objectif de notre projet sera donc de générer des animaux double KO pour *Fmr1* et *Ecr4* afin d'étudier l'impact de l'extinction du gène *Ecr4* chez les souris *Fmr1*-KO tant au niveau du comportement qu'au niveau morphologique dans le cerveau et les neurones. Cela permettra d'évaluer la contribution de la voie WNT à la pathologie de l'X fragile aux différents stades du développement, et d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles que l'on pourrait activer ou inhiber pharmacologiquement sans effets secondaires majeurs pour les patients.

Pour cela, nous accouplerons les animaux sur 2 générations afin de vérifier la viabilité de la lignée et les paramètres physiologiques (courbe de croissance, morphologie). Ensuite, nous réaliserons différents tests de comportement pour caractériser la lignée sur le plan cognitif, social et sensorimoteur. A priori, nous attendons un impact positif sur les déficits cognitifs des souris X fragile ainsi que sur leurs interactions sociales, mais nous réaliserons d'autres tests afin de bien caractériser cette nouvelle lignée.

Pour ce projet, nous utiliserons un nombre maximal de 1408 souris.

Réduction : Nous avons calculé le nombre minimal d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement fiables. De plus, toute procédure rendue inutile par des résultats publiés dans la littérature sera supprimée. Lorsque cela est possible sans risque d'interférence entre les différents tests, nous réaliserons plusieurs tests de comportement sur les mêmes animaux. Enfin, les animaux utilisés pour le comportement seront sacrifiés à l'issue des procédures et leurs organes prélevés pour réaliser l'étude moléculaire, biochimique et histologique de ce nouveau modèle.

Remplacement : Nous avons dans un premier temps réalisé des expériences sur des cellules en culture inactivées ou non pour Fmr1 afin de vérifier que la voie Wnt est affectée. De plus, si notre hypothèse se vérifie et que nous observons un effet positif de l'inhibition de Ecr4 sur certains phénotypes des animaux X fragile, nous sélectionnerons les meilleurs inhibiteurs de ce gène in vitro.

Raffinement : Les animaux sont hébergés en groupes sociaux adaptés à leur fonctionnement social et disposent d'éléments d'enrichissement (cabanes, bâtons à ronger, ouate). De plus, un examen régulier par les expérimentateurs et le personnel animalier permet de détecter rapidement un comportement anormal ou un mal-être et de prendre les mesures adaptées : sacrifice en cas de souffrance, ou soin adapté et séparation en cas de blessure par un animal dominant.

18830 L'infarctus du myocarde, appelé couramment crise cardiaque, est une destruction d'une partie du cœur due à un manque de sang et d'oxygène (ischémie). Cela se produit lorsqu'une artère coronaire (vaisseau sanguin apportant le sang et l'oxygène au cœur) s'obstrue. Les lésions forment une zone tissulaire morte dite infarctie qui ne permet plus une bonne contraction du cœur. La zone infarctie provoque une modification structurelle du cœur appelée remodelage, modification inévitable mais pathologique. Il faut savoir qu'il y a environ 120000 infarctus du myocarde en France tous les ans avec un taux de mortalité autour de 25%. Il existe des techniques médico-chirurgicales qui contribuent à améliorer ce taux en débouchant physiquement l'artère, mais les conséquences à long terme restent potentiellement néfastes. C'est pourquoi il est impératif de trouver des traitements qui pourraient se surajouter. Notre projet a donc pour but de tester de nouvelles stratégies thérapeutiques pouvant protéger le cœur en diminuant la taille de la zone infarctie et en limitant le remodelage, et ainsi améliorer la qualité de vie des personnes ayant eu une crise cardiaque.

Actuellement, par leur caractère préclinique, et en complément des études faites sur des cellules ou des tissus, les modèles animaux sont une étape indispensable pour tester de nouvelles substances pharmacologiques permettant de réduire les conséquences de l'infarctus du myocarde. Notre projet prévoit d'utiliser au maximum 150 porcs sur 3 ans. La fréquence cardiaque, la taille du cœur, l'anatomie coronaire, l'innervation du porc sont très proches de celle de l'Homme. Le plan général du projet est d'anesthésier les animaux, de pratiquer un acte chirurgical afin de simuler un infarctus du myocarde en fermant transitoirement une coronaire, d'administrer le traitement (ou le placebo) consistant en une injection de produit à visée cardio-protectrice, et ensuite d'analyser le myocarde afin d'évaluer l'efficacité du traitement effectué.

Seule l'utilisation d'animaux permet d'atteindre l'objectif du projet, qui doit rester proche de la réalité clinique humaine pour rester scientifiquement valable. Il est prévu d'utiliser le minimum d'animaux pour chaque stratégie testée, en contrôlant leur nombre par des méthodes statistiques. L'anesthésie et l'analgésie seront adaptées afin de n'induire aucune souffrance inutile, et des vétérinaires contrôleront régulièrement l'état de santé des animaux. Ils seront hébergés sur litière végétale, et il sera veillé à la bonne qualité des soins et à leur bien-être pendant toute l'expérimentation.

18831 Les cellules dendritiques sont des cellules phagocytaires qui jouent un rôle clef dans l'initiation des défenses immunitaires contre les tumeurs. En effet, les cellules dendritiques des tissus capturent les cellules tumorales et présentent les antigènes tumoraux aux lymphocytes T pour déclencher la réponse immunitaire. Les monocytes quant à eux sont les précurseurs directs d'une autre population de cellules phagocytaires appelée macrophages et qui, au contraire des cellules dendritiques, peuvent inhiber la réponse immunitaire anti-tumorale. Un enjeu primordial de la recherche contre le cancer est de mieux comprendre les interactions moléculaires et cellulaires entre la tumeur et les cellules phagocytaires qui l'infiltrent. En particulier, dans le cadre des thérapies anti-cancéreuses, nous souhaitons 1) augmenter la quantité des cellules dendritiques favorables aux réponses immunitaires dirigées contre le cancer ; et 2) diminuer la production des macrophages qui favorisent la croissance tumorale. Cela est possible en étudiant les mécanismes de production de ces cellules qui ont lieu dans la moelle osseuse à partir des cellules souches dites hématopoétiques (HSC).

Dans ce projet, nous étudierons les mécanismes moléculaires et cellulaires qui permettent aux HSC de la moelle osseuse de produire des cellules dendritiques et des macrophages lors du développement tumoral.

Cette question sera adressée grâce à l'utilisation de modèles murins de tumeur de la glande mammaire. En effet, chez l'homme et la souris, les tumeurs mammaires sont largement infiltrées par les macrophages alors que les cellules dendritiques restent une population minoritaire. Nous allons étudier les HSCs de la moelle osseuse de souris développant des tumeurs du sein, mesurer leur renouvellement et leur capacité à produire des cellules dendritiques et des macrophages. Nous étudierons également les signaux émis par les tumeurs qui impactent la production des cellules dendritiques et des macrophages par les HSCs. Ce projet permettra de mieux comprendre les mécanismes de production des cellules dendritiques et des macrophages et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques permettant d'inhiber la production des macrophages et d'augmenter la production de cellules dendritiques. En parallèle, nous nous intéresserons aussi aux mécanismes par lesquels les macrophages inhibent les réponses immunitaires dans la tumeur. Nous développerons des stratégies pour bloquer l'effet inhibiteur des macrophages.

En conclusion, ce projet nous permettra de mettre en lumière les mécanismes tumoraux qui activent la production des macrophages. Cela nous permettra de mieux les cibler dans le cadre d'interventions thérapeutiques visant à augmenter les réponses immunitaires contre les cancers.

Nombre d'animaux pour ce projet sur 5 ans : 627

Remplacer : La production des cellules dendritiques et des macrophages a été étudiée chez la souris in vitro et in vivo dans des situations non-pathologiques ou d'infection par des pathogènes. Cependant les mécanismes de production des cellules dendritiques et des macrophages lors du développement tumoral restent mal connus. Ni les modélisations mathématiques, ni les systèmes in vitro ne permettent d'étudier la production et la circulation des cellules phagocytaires (cellules dendritiques et macrophages) dans le sang et les mécanismes de leur entrée et leur différenciation dans les tumeurs.

Réduire : les résultats attendus à l'issue de ce projet n'ont pas été publiés à ce jour dans la littérature scientifique. Le nombre d'animaux utilisés pour mener à bien ce projet a été réduit au minimum pour chaque modèle tout en assurant des résultats statistiquement interprétables.

Raffiner : La lignée de souris utilisée développe des tumeurs mammaires très progressivement sur 5 mois. Les animaux seront suivis régulièrement afin d'assurer leur bien-être et pour suivre les éventuels signes de souffrance ou de stress. Des soins supports tels les aliments gélifiés et la réhydratation seront introduits dans les cages en cas de souffrance. Les expérimentations seront arrêtées avant l'atteinte des points limites définis.

18832 Le cancer de la vessie est le cancer urologique le plus fréquent après celui de la prostate. Touchant principalement les hommes après 50 ans, ce cancer est d'autant mieux traité qu'il est détecté tôt. Le nombre de cas de cancers de la vessie en France augmente et son incidence le place au 6ème

rang par sa fréquence. On compte aujourd'hui près de 10 000 nouveaux cas par an et il représente 3,5% des décès par cancer.

Si le cancer superficiel reste de bon pronostic, le risque de rechute suite à l'ablation des tumeurs par les voies naturelles reste élevé, ceci étant dû, en partie, aux tumeurs résiduelles non détectables par endoscopie. C'est pourquoi, il est nécessaire de mettre au point de nouveaux traitements permettant d'obtenir de meilleurs résultats thérapeutiques.

L'objectif de ce projet est d'étudier les effets d'un traitement par immunothérapie en combinaison ou non avec un traitement par thérapie photodynamique (PDT). L'immunothérapie est un traitement innovant utilisé pour combattre certains cancers. Parmi les différentes immunothérapies existantes, il y a notamment les immunothérapies anti-PD1 et anti-PDL1, ou inhibiteurs de points de contrôle, qui agissent au niveau de la jonction entre la cellule immunitaire et les protéines à la surface des cellules cancéreuses. Ainsi, l'immunothérapie a pour objectif d'activer les défenses immunitaires pour combattre les cellules cancéreuses. L'objectif de la PDT est de marquer des tissus cancéreux avec un photosensibilisateur (dans notre étude Hexvix), provoquant la destruction sélective de ces tissus en les exposants à une source lumineuse avec une longueur d'onde spécifique. Le traitement par PDT sur des tumeurs vésicales chez le rat, ne peut être réalisé sur des modèles in vitro ou in silico (remplacement). L'immunothérapie stimulant le système immunitaire et ciblant des récepteurs spécifiques exprimés au niveau des tumeurs vésicales, en combinaison avec l'Hexvix®, pourrait permettre une meilleure efficacité du traitement par thérapie photodynamique.

Nous souhaitons évaluer l'efficacité du traitement lorsque la PDT est combinée avec une administration par voie générale (intraveineuse) du composé immunogène. L'immunothérapie aura ici un effet systémique, ayant une action permettant le recrutement généralisé de tous les effecteurs immunologiques de l'organisme. En effet, le système immunitaire est constitué d'un ensemble de cellules et de molécules capables d'une part de détecter et de reconnaître des anomalies, et d'autre part, de réagir. Ainsi, lorsqu'un corps étranger pénètre notre organisme, le système immunitaire peut le détecter et déclencher une série de processus qui nous permettra de le détruire. Les effecteurs du système immunitaire sont soit des cellules (globules blancs du sang), soit des molécules libres. Ses agents sont mobiles et capables de se déplacer à travers tout l'organisme. Cela leur permet d'exercer une surveillance généralisée, et de se regrouper au site d'infection si besoin. Ces agents communiquent efficacement entre eux pour déclencher la réponse immunitaire la plus adaptée à l'agression.

Le but de cette combinaison de traitement (PDT + immunothérapie) est d'obtenir une régression de la taille de la tumeur au cours du temps via l'activation du système immunitaire.

Pour ce projet 144 rats femelles Fischer 344 seront utilisées, réparties en groupes de 8 animaux. Les animaux seront placés à 4 par cage. Le composé immunogène sera administré par voie générale (intraveineuse), ou par voie locale par les voies naturelles (instillation vésicale), et l'Hexvix® sera également administré par instillation vésicale. Ces composés ne sont pas génotoxiques pour les cellules, pas toxiques pour les animaux aux doses testées, et n'induisent pas d'allergie.

Quatre procédures seront utilisées, toutes réalisées sous anesthésie : induction de tumeurs de vessie, administrations de l'immunogène (maximum 4 administrations, à partir du 4ème jour, jusqu'au 20ème jour post-induction tumorale), administration de l'Hexvix, thérapie photodynamique. Les animaux sont mis à mort 4, 12, 30 ou 60 jours après induction des tumeurs vésicales par injection d'une surdose d'euthanasique. La vessie est alors prélevée, fixée dans une solution de formol (4%) pour effectuer des analyses en histologie classique et d'immunohistochimie après réalisation de coupes en paraffine.

La réponse immunitaire d'un organisme n'étant pas reproductible in vitro, il est donc nécessaire d'avoir recours à des animaux immunocompétents pour atteindre les objectifs de notre projet (remplacement). Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés (réduction) mais de permettre une approche statistique des résultats obtenus, les groupes de traitement ou contrôles seront constitués de 8 rats. Pour supprimer la douleur induite éventuellement par l'induction des tumeurs vésicales et par le traitement par PDT, les animaux recevront des injections sous-cutanées de Buprénorphine

(raffinement). Les points limites suivis seront l'évolution pondérale des animaux, leur état physiologique (activité, posture, état de la fourrure, tremblements. . .) et leurs consommations alimentaire et hydrique (raffinement). En cas d'atteinte d'un point limite, les animaux seront mis à mort par une méthode en conformité avec les recommandations éthiques (injection d'une surdose d'euthanasique).

18833 L'infarctus entraîne de graves lésions du muscle cardiaque, la formation de cicatrices et une perte irréversible de la fonction cardiaque pouvant conduire au développement d'une insuffisance cardiaque. Le cœur humain à une capacité de régénération limitée, et la réparation du myocarde endommagé avec des cellules souches pluripotentes (PSC) représente une stratégie de traitement prometteuse. Des études précliniques récentes ont montré des améliorations de la fonction cardiaque chez les rongeurs ayant reçu une greffe de cardiomyocytes dérivés de cellules progénitrices cardiaques (CPC) à la suite d'un infarctus du myocarde. Cependant, des problèmes persistent dont notamment des arythmies ainsi qu'une pauvre rétention et survie des cellules greffées. En effet, on estime que seulement 10% à 15% des cellules injectées survivent.

Les lymphocytes T régulateurs (Treg) sont une sous-population de lymphocytes T qui permettent la tolérance du soi et limitent les autres réponses immunitaires. Bien qu'ils puissent agir directement sur les lymphocytes T effecteurs, les Treg ciblent également les orchestrateurs de la réponse immunitaire. Les Treg ont la capacité de promouvoir la greffe en protégeant le greffon de la réaction immunitaire de l'hôte. Les cellules libèrent constamment des vésicules extra-cellulaires (VE), dérivés cellulaires contenant des protéines, acides nucléiques et des lipides. Par conséquent, elles sont particulièrement intéressantes à explorer dans le cadre de la transplantation de cellules souches. Il a été récemment démontré que les VE dérivées des Treg suppriment la prolifération des lymphocytes T cytotoxiques et prolongent la survie des allogreffes hépatiques et rénales dans des modèles de rongeurs.

L'objectif du projet est d'améliorer les effets de la greffe de CPC à l'aide de VE issues de lymphocytes T régulateurs dans un modèle d'infarctus du myocarde chez la souris.

Les effets in vivo de la greffe de CPC avec support de VE isolés des Treg seront évalués et à ce stade le recours à l'animal est indispensable.

Pour déterminer l'effet sur le myocarde infarci, les CPC seront administrées par des injections intramyocardiques échoguidées (intervention peu invasive) dans des modèles d'infarctus du myocarde créés par la ligature de l'artère coronaire. Une semaine avant et une semaine après l'administration des CPC, les VE seront injectées par voie intraveineuse pour améliorer les effets de la greffe de cellules. Pour évaluer cet effet thérapeutique, la fonction cardiaque sera évaluée par échographie 3 semaines après l'infarctus, immédiatement avant la 1ère injection de VE et la greffe consécutive de CPC puis 5 semaines après la transplantation cardiaque des CPC, soit 4 semaines après la seconde injection des VE. En complément, des analyses histologiques (étude du tissu à l'échelle microscopique) et transcriptomiques (étude des gènes exprimés) du tissu cardiaque seront menées 4 semaines après la deuxième injection de VE.

Ce projet se déroulant sur 2 ans, il nécessite 258 animaux au total. Une étude statistique a été réalisée afin de réduire au maximum le nombre d'animaux sans compromettre l'analyse statistique des résultats. Il a été calculé qu'il faudrait 57 animaux dans chacun des 4 groupes au maximum pour démontrer des résultats significatifs plus 30 souris sont prévues en cas de non-approvisionnement en interne pour pratique de la procédure chirurgicale.

Afin de respecter la règle des 3R, les actions suivantes seront mises en place:

1-réduire: le nombre de souris utilisées sera réduit au minimum permettant de déterminer de manière fiable, robuste et statistique l'effet thérapeutique des approches proposées.

2-Remplacer: Nous effectuerons une étape in vitro pour observer les effets immuno-inhibiteurs des VE. Cette étape nous permettra ainsi de remplacer l'utilisation d'animaux et d'optimiser le produit thérapeutique.

3-Raffiner: Pour limiter la douleur et la souffrance des animaux, l'ensemble des procédures seront effectuées sous anesthésie générale et les souris seront surveillées via une grille d'évaluation, avec

des points limites définis, afin de pouvoir prendre en charge précocement toute douleur ou souffrance selon les scores obtenus. Des antalgiques sont prévus et un niveau de souffrance trop élevé entraînerait la mise à mort anticipée de l'animal sous anesthésie profonde. Toutes ces attentions particulières portées au bien-être animal seront complétées par un hébergement adapté c'est-à-dire avec des congénères et avec des éléments d'enrichissement dans les cages (abris et substrats pour la construction de nids).

A terme, les résultats de ce projet permettront de déterminer les mécanismes à l'origine des effets cardio-protecteurs de l'administration dans le myocarde de CPC et les effets bénéfiques des vésicules extra-cellulaires isolées de Treg.

18834 Malgré l'existence d'un vaccin pour lutter contre le virus de l'hépatite B (Hepatitis B virus ; HBV), cette infection virale reste un problème majeur de santé publique mondial. Le nombre de personnes atteintes par le virus de l'hépatite B est estimé à plus de 350 millions dans le monde. Ces personnes porteuses du virus sont un réservoir potentiel pour sa dissémination et présentent un fort risque de développer une cirrhose hépatique ou un hépatocarcinome (HCC).

Chez ces patients, la disparition des antigènes HBs (HBsAg) sériques signe l'élimination complète du virus ce qui permet l'arrêt du traitement, les risques de développement de complications hépatiques étant alors très faibles. Les traitements actuels (IFN alpha et analogues de nucléosides) parviennent à contenir l'infection mais la disparition complète des HBsAg n'est observée que chez 10% de la population traitée. De plus, le virus contenu sous forme d'ADN super-enroulé (cccDNA) dans le noyau des cellules hépatocytaires, contrôlé par le système immunitaire, peut se réactiver dans le cas d'une immunodépression (ex : traitement chimio-thérapeutique, infection VIH). C'est pourquoi il est important de développer de nouvelles approches thérapeutiques permettant l'élimination complète du virus.

Le virus HBV n'infecte que l'homme et quelques espèces animales (ex : chimpanzé). Des modèles souris non transgéniques peuvent être utilisés pour la recherche appliquée au HBV. Des modèles de souris transgéniques exprimant de façon constitutive le HBV ou encore des souris présentant des foies humanisés et/ou un système immunitaire humanisé sont très utiles pour évaluer les infections au HBV et des thérapies mais restent complexes et coûteux à développer.

D'autres modèles intermédiaires sont présentés dans la littérature scientifique. Le modèle AAV-HBV décrit dans ce document permet de mimer l'infection au HBV et la persistance du virus in vivo. Ce modèle est considéré par la communauté scientifique comme très utile et complémentaire des modèles in vitro pour la recherche de nouvelles molécules anti-HBV. Enfin, le recours à l'animal permet d'étudier chez les animaux sains ou dans le contexte de l'infection, la bio-distribution des composés, leurs mécanismes d'action, l'évaluation de la production d'anticorps neutralisant le traitement (Anti-Drug Antibody), l'évaluation de l'induction de cytokines et de la réponse immunitaire afin de déterminer les doses et les schémas d'administration les plus adaptés.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce cadre représente 1500 rongeurs par an, soit 7500 rongeurs pour 5 ans, avec des procédures utilisant des animaux de degré de gravité léger, de durée allant de quelques heures à 24 semaines selon le protocole. Une observation quotidienne est réalisée pour tous les modèles, la fréquence de cette observation est adaptée à la hausse selon la durée et la sévérité du modèle.

Mise en œuvre des 3R :

Remplacement :

Aucune méthode évitant totalement le recours à l'animal selon les exigences réglementaires de tous les pays de destination des produits n'est développée à ce jour pour les procédures expérimentales décrites.

A l'heure actuelle, les tests in vitro, effectués préalablement pour valider l'intérêt des cibles identifiées et l'efficacité de nouvelles molécules, ne permettent pas d'appréhender l'intégralité des mécanismes de l'infection et de l'interaction hôtes/pathogènes. C'est pourquoi, le recours à des modèles expérimentaux in vivo s'avère nécessaire pour la compréhension et l'évaluation des mécanismes d'actions des composés candidats. Ces modèles in vivo permettent également

d'anticiper l'éventuelle toxicité des molécules thérapeutiques dans ces conditions complexes de relation hôte/pathogène (implication du système immunitaire).

Réduction :

Le schéma expérimental des procédures de ce projet s'appuie sur des données bibliographiques. Ces expériences feront l'objet d'une revue par des biostatisticiens afin de calculer au plus juste le nombre d'animaux à utiliser tout en permettant un support au dossier CTD optimisant ainsi le nombre d'animaux à utiliser. Ne seront administrées aux animaux que des modèles d'intérêt sélectionnées à partir de filtres *in vitro*, *in silico* etc...donc en moins grand nombre de molécules et donc moins d'animaux utilisés.

Raffinement

Les animaux sont hébergés en groupe dans des cages contenant des dispositifs d'enrichissement dans des locaux appropriés, conformes aux standards réglementaires et suivis par un personnel spécifiquement formé. A chaque fois que cela est possible, une anesthésie générale ou topique est pratiquée et des points limites sont mis en place dans les études pour limiter la souffrance des rongeurs.

Les manipulateurs sont formés et validés dans leur gestes ce qui réduit les manipulations douloureuses.

18835 La douleur est un problème de santé publique majeur qui réduit la qualité de vie des patients. Les traitements aux opiacés, comme l'oxycodone, restent le moyen le plus efficace de réduire la douleur moyenne à intense. Malheureusement, ces traitements peuvent s'accompagner par le développement d'une dépendance qui participe à une augmentation de l'usage illicite de ces drogues et augmente le risque de mort par overdose. Ces effets sont en partie dus à l'activation des systèmes anti-opioïdes, lors d'administrations chroniques. Dans ce projet nous allons évaluer des molécules pouvant empêcher l'activation du système anti-opioïde dans un modèle murin d'administration chronique de morphine ou d'oxycodone. Le sevrage physique induit par l'injection de naloxone, antagoniste aux récepteurs aux opiacés, sera suivi par l'observation du comportement des souris.

Remplacer : Bien qu'il soit possible de disséquer les mécanismes d'action des nouveaux médicaments *in vitro*, les phénomènes de dépendance qui se mettent en place lors de traitements chroniques sont difficiles à simuler et à prédire par des expériences *in vitro*. Ainsi, ces expérimentations sont incontournables avant une étude clinique et ne peuvent être remplacées par des expérimentations *in vitro*.

Raffinement : le bien-être des animaux est primordial durant les expérimentations. Ainsi, un certain nombre de mesures sont mises en œuvre ; notamment une inclusion de phase d'acclimatation (environ 1 semaine) avant toute expérimentation, des conditions d'hébergement appropriées (maintien des animaux en groupe sociaux, respect de l'espace minimum pour chaque animal, accès à l'eau et à la nourriture à volonté), une visite a minima quotidienne, une gestion de la douleur et de la souffrance suivant une échelle stricte et des points limites bien établis.

Réduire : nous cherchons toujours un compromis expérimental qui permette de réduire le nombre d'animaux utilisés. Par exemple, nous favorisons le test de plusieurs conditions expérimentales en parallèle (jusqu'à 4 groupes expérimentaux) afin de ne pas multiplier les groupes témoins.

En règle générale, chaque groupe expérimental d'un plan d'étude comporte 12 animaux afin d'obtenir un résultat statistiquement fiable et qui évite ainsi la répétition d'expériences. Nous pensons étudier 5 molécules par an et donc sur une période de 5 ans l'utilisation de 1200 souris est envisagée.

18836 *Pseudomonas aeruginosa* (PA) est une bactérie responsable d'infection pulmonaire grave chez les patients atteints de mucoviscidose et chez les patients en réanimation. Cette bactérie, au gré de successives antibiothérapies, devient résistante à tous les antibiotiques habituellement utilisés. Aussi il est capital de rechercher des alternatives thérapeutiques aux antibiotiques comme les

probiotiques. Les probiotiques sont des microorganismes qui, administrés en quantités adéquates, confèrent un bénéfice à la santé de l'hôte.

Lors d'une étude précédente, l'analyse du microbiote respiratoire de patients atteints de mucoviscidose a permis de mettre en évidence un genre bactérien particulier : *Porphyromonas*. Ce genre bactérien, et plus particulièrement *Porphyromonas catoniae* (PC), semble être prédictif de l'infection à PA. Il a été montré chez ces patients, que ceux qui avaient moins de *Porphyromonas* dans les poumons, avaient plus de risque de se coloniser à PA. Par la suite, il a également été montré que la quantité de PC pulmonaire venait à diminuer, voire disparaître, préalablement à la colonisation à PA alors que PC restait stable chez les patients non colonisés. Précédemment, nous avons testé une souche clinique de *Porphyromonas catoniae* isolée de patients atteints de mucoviscidose qui semblerait plus efficace in vivo. Il est nécessaire de réaliser une manipulation indépendante afin de valider l'effet bénéfique observée (réduction de la quantité de *Pseudomonas aeruginosa* à 24h post infection) avec la souche clinique de *Porphyromonas catoniae*. Nous utiliserons 18 souris afin de mener à bien cette expérimentation lors de deux procédures : une procédure légère avec l'instillation de nos souches et une procédure sans réveil avec la mise à mort par ponction intracardiaque. La quantité résiduelle de PA sera recherchée par culture bactérienne de manière à pouvoir comptabiliser le nombre de bactéries vivantes et cultivables restantes dans le poumon à 24h.

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

L'ensemble de ce projet respecte les principes de remplacement, réduction et raffinement. En effet une seule espèce de *Porphyromonas* clinique a été sélectionnée grâce aux analyses précédentes réalisées in vitro (principe de remplacement), le nombre d'animaux a également été réduit au maximum sans compromettre les objectifs du projet (principe de réduction). Les animaux sont élevés à l'animalerie dans des cages enrichies avec un igloo et de la litière cellulose au sein d'un portoir ventilé et les procédures expérimentales utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible la douleur et/ou l'angoisse des animaux (anesthésie préalable des animaux avant toutes procédures expérimentales ainsi que l'utilisation de lampes chauffantes durant toute la durée de la procédure) (principe de raffinement).

18837 L'aménagement de passes à poissons vise à rétablir la libre circulation des organismes aquatiques et leur accès aux zones indispensables à leur reproduction, leur croissance, leur alimentation ou leur abri. Cette restauration est une obligation réglementaire qui doit bénéficier à un maximum d'espèces et doit répondre à des comportements et des capacités de nage variés.

Certains dispositifs de franchissement existants ont fait l'objet d'un design amélioré, notamment de la zone d'injection du débit d'attrait, secteur s'étant révélé le principal point de demi-tour des poissons. D'autres présentent un long canal à faible vitesse où les poissons peuvent éprouver des réticences à transiter. La rugosité du fond des ouvrages, par enrochement, a été remplacé par des plots béton servant d'abri pour les poissons. L'objectif de la présente étude est de vérifier l'intérêt de ces innovations, de mieux cerner les points de blocage suspectés et ainsi orienter la conception des futurs dispositifs. Pour y parvenir, nous étudierons le franchissement piscicole par télémétrie sur un site présentant toutes ces caractéristiques.

La passe à poissons étudiée (750 m pour 12 m de dénivelé à franchir) a été équipée d'un réseau d'antennes de détection disposées en des zones stratégiques pour mesurer la progression des poissons préalablement marqués par des transpondeurs. Le fonctionnement du dispositif pour la migration des poissons est au centre du questionnement, le modèle animal ne peut être remplacé.

Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, les 5 espèces les plus fréquentes ont été retenues (barbeau, brème, hotu, aspe, anguille) parmi plus d'une vingtaine empruntant ce type de dispositif. Ce choix est réalisé selon des critères d'abondance, suivant leur capacité de nage variée et car ces espèces ont déjà été documentées lors d'études précédentes. L'effectif par espèce, réduit au maximum, devra permettre de disposer d'un nombre d'individus suffisant franchissant le dispositif pour garantir des analyses statistiques robustes. Ainsi, sur la base des études précédentes, environ 130 poissons des 4 espèces de cyprinidés seront étudiés ainsi que 400 anguilles. Il est prévu de

compléter l'étude comportementale par 50 poissons d'autres espèces (silure, brochet, saumon, truite de mer) encore peu documentées afin de mieux cerner les limites éventuelles de fonctionnement de l'ouvrage. Au total, un maximum de 970 poissons sera étudié.

Les poissons seront capturés dans des passes à poissons au printemps, période propice à l'activité migratoire. Plusieurs méthodes non dommageables aux poissons ont été retenues pour leur complémentarité : nasse de piégeage et pêche à l'électricité. Afin d'augmenter les probabilités de détection et de limiter le nombre d'animaux, les poissons seront transportés en aval immédiat de la zone d'étude.

Après anesthésie et prise de mesures (poids, taille) les poissons seront équipés par chirurgie de petits transpondeurs (3,7 x 23 mm) permettant une identification individuelle.

Selon la règle des 3R concernant le raffinement, les poissons seront maintenus dans des conditions de stabulation optimales : grand volume d'eau renouvelé, oxygénation, température semblable à celle du milieu, obscurité pour les anguilles. Les manipulations et le transport se feront sous anesthésie avec un dosage adapté afin de réduire le stress et prévenir la douleur. Des points-limites sont établis afin de soustraire l'animal à la souffrance.

18838 L'accident vasculaire cérébral (AVC) est une cause majeure de décès et d'invalidité dans le monde entier, néanmoins les options thérapeutiques sont très limitées. La régénération du cerveau adulte est réduite mais une récupération dans les premiers mois suivant l'AVC est possible. Cette récupération neurologique après un entraînement de réadaptation est associée au remodelage des structures intactes du cerveau donc la plasticité neuronale est fondamentale pour le succès de la récupération. Dans la phase post-aiguë de l'AVC, il y a une courte fenêtre temporelle où une intense germination neuronale et capillaire est observée. Par conséquent, la modulation des mécanismes qui régulent la plasticité à ce moment peut être d'une importance cruciale.

La voie de signalisation cellulaire qui culmine dans l'activation de l'actomyosine participe à de nombreuses fonctions cellulaires dont la plasticité neuronale. De nouveaux inhibiteurs chimiques moins toxiques ainsi qu'un outil génétique sont maintenant disponibles pour l'inhibition de cette voie. Ce projet vise à déterminer si l'inhibition de cette voie cellulaire augmente la connectivité cérébrale après un AVC chez la souris. Nous utiliserons une technique d'imagerie par échographie ultrarapide, qui permet l'étude de la connectivité fonctionnelle chez la souris éveillée en mesurant les modifications du flux sanguin entre différentes zones cérébrales. Le nombre total de souris nécessaire à la réalisation de ce projet est de 407 pour une durée de 4 ans.

Ce projet sera réalisé dans le respect de la règle des 3Rs et met en jeu des procédures chirurgicales et une technique d'imagerie du flux sanguin cérébral basée sur des ultrasons. Remplacer : L'utilisation d'un modèle animal est une nécessité car il n'y a pas de méthode alternative pour l'étude du cerveau dans sa globalité. Réduction : Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est le minimum nécessaire permettant une analyse statistique robuste des résultats grâce aux données collectées au cours d'expériences précédentes. Si pas de différence entre les résultats obtenus chez les mâles et les femelles, le nombre d'animaux sera réduit de moitié. Raffinement : Pour éviter toute souffrance, les procédures de chirurgie se feront sous analgésie et anesthésie générale. Les séances d'imagerie seront réalisées sur animal vigile dont la tête sera immobilisée mais dont le mouvement des pattes ne sera pas entravé ; des séances d'habituation seront effectuées au préalable. Les souris seront observées régulièrement et une grille précise d'évaluation des points limites sera utilisée. Tout signe de douleur, souffrance, angoisse ou stress chez les animaux sera soulagé avec des analgésiques.

A terme, ce projet vise à valider une nouvelle approche thérapeutique pour améliorer la récupération neurologique post-AVC.

18839 A ce jour, la survie globale des patients atteints de cancer colique ne dépasse pas 55% et les patients décèdent de leurs métastases. D'autre part, environ 50% des patients ne répondent pas aux traitements conventionnels de chimiothérapie combinés ou non à des thérapies ciblées. De plus, les effets secondaires ont un impact délétère sur le bien-être des patients. Par conséquent les

recherches menées pour ce projet portent sur la compréhension des mécanismes impliqués dans le développement de métastases, la réponse aux traitements ainsi que le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Parmi les stratégies envisagées, certaines vont cibler la baisse de la pression en oxygène (hypoxie intra-tumorale) décrite à l'origine de l'agressivité tumorale et la résistance aux traitements.

Les expériences vont cibler l'angiogenèse (formation de nouveaux vaisseaux), des processus moléculaires activées par l'hypoxie, par des mutations et des molécules décrites pour participer à la formation de métastases. Les protocoles seront réalisés chez la souris immunodéprimée greffée avec des tumeurs coliques humaines et/ou des lignées cellulaires coliques commerciales ou générées au laboratoire, et les effets seront observés sur la croissance de la tumeur et sur la formation de métastases dans les organes à distance. Ces études pré-cliniques permettront de proposer la mise en place d'essais cliniques chez l'homme.

La réalisation de ce projet nécessitera l'emploi de 828 souris sur 5 ans. La règle des 3 R sera appliquée pour l'ensemble du projet, à savoir :

Réduire. Les chiffres indiqués dans le dossier représentent le nombre maximal d'animaux utilisés pour ces expériences. En effet, comme il s'agit d'études exploratoires, il ne nous est pas possible de savoir par avance toutes les combinaisons pharmacologiques qui seront testées.

Remplacer. Ces expériences ont pour objectif d'étudier l'impact de drogues sur la croissance tumorale et/ou le développement de métastases. Pour cela, il est nécessaire de préserver le microenvironnement tel qu'in vivo, à savoir les fibroblastes, les cellules immunitaires, les cellules endothéliales ...). Ces expériences ne peuvent donc être réalisées que sur des animaux vivants et non sur des cultures cellulaires.

Raffiner. Les animaux sont hébergés dans des conditions sanitaires contrôlées et de bien-être optimales (ex : carrés de coton pour la fabrication des nids, balançoires). Les animaux sont surveillés quotidiennement. Des points limite ont été établis permettant de soustraire l'animal à la souffrance. S'il y a apparition de signes de souffrance au cours de l'expérience (animaux prostrés, perte de poids, poils dégradés ...), les animaux seront traités contre la douleur.

18840 La diminution des stocks de poissons dans les océans rend l'aquaculture indispensable afin de répondre à la demande des consommateurs pour ces produits. Cependant, il est nécessaire de la pérenniser en réduisant son impact environnemental, en substituant farine et huile de poisson des aliments d'élevage, confectionnées à partir de poissons pêchés en milieu naturel. Ainsi, des farines constituées à partir de coproduits de thon, (parties non commercialisables donc destinées à être jetées) sont disponibles et pourraient représenter une alternative intéressante. Cependant, le problème majeur que pose l'utilisation de ces coproduits, est la présence de contaminants comme le mercure, qui expose les poissons à une toxicité importante et peut les rendre non commercialisables pour la consommation humaine. Pour autant, des molécules comme le sélénium, un élément trace antioxydant essentiel pour la croissance et le bon développement et fonctionnement de l'organisme, présent également en quantité importante dans le thon, semble être une piste intéressante pour contrecarrer les effets du mercure via un effet antagoniste sur l'action toxique de ce dernier. Cependant, à l'heure actuelle les mécanismes par lesquels le sélénium fait face à la toxicité du mercure, comme sa détoxification ou l'amélioration des paramètres altérés par le mercure ne sont pas bien caractérisées. Ainsi cette étude a pour but d'évaluer les effets antagonistes d'une supplémentation en sélénium sur la toxicité au mercure. Pour cela, un essai nutritionnel de 24 semaines sur des truites arc-en-ciel juvéniles d'un poids moyen initial de 30 g sera réalisé. Douze régimes seront utilisés. Six d'entre eux seront à base de coproduits de thon et 6 seront à base de protéines végétales. Certains régimes seront supplémentés en méthylmercure et/ou en sélénium organique ou inorganique. L'intérêt du régime végétal est l'absence de mercure et de sélénium (autre qu'une supplémentation) qui sert donc de régime contrôle. Le choix des concentrations utilisées fait suite à une bibliographie attentive d'autres expériences nutritionnelles sur le sélénium et le mercure chez différentes espèces de poisson et assure d'éviter un effet toxique du sélénium, ou un effet non métabolisable du mercure, à trop fortes concentrations. Chacun des régimes sera testé en triplicat (12 régimes x 3 = 36 bassins au total) afin d'assurer la pertinence et

la fiabilité des résultats. La truite arc-en-ciel est la première espèce piscicole produite en France ce qui en fait un choix privilégié pour cette étude. Durant l'essai nutritionnel d'une durée totale de 168 jours, 1824 truites juvéniles seront utilisées et 5 échantillonnages seront effectués à 2, 7, 21, 84 et 168 jours, en plus de l'échantillonnage initial, afin d'étudier les effets d'une exposition à court et long terme aussi bien sur la métabolisation du mercure que les effets antagonistes du sélénium sur ce dernier. A chaque échantillonnage en cours d'essai, 8 poissons seront prélevés par bac, soit un total de 40 poissons prélevés par bassin (8 poissons x 5 prélèvements), et un total de 1464 poissons prélevés (36 bacs x 40 poissons + 24 poissons à J0 représentant ce qui serait prélevé à un temps donné pour un régime : 3 bacs x 8 poissons). Pour autant, il est indispensable de commencer l'expérience avec 50 poissons par bassin, afin d'avoir tout au long de l'essai, en particulier sur la dernière période entre 12 et 24 semaines, un effectif suffisant pour avoir une densité optimale pour le bien-être des truites, un animal grégaire, comprise entre 17 et 40 kg de poisson/m³ d'eau, dans l'intervalle physiologique de bien-être animal optimal pour l'élevage de la truite arc-en-ciel. Aussi, toujours dans le but de favoriser le bien-être et de minimiser le stress de l'animal, les études seront réalisées dans des conditions d'élevage dites classiques et optimisées : la température sera de 17°C (+/- 1°C), la photopériode sera naturelle, les animaux seront placés en bassins extérieurs munis d'un couvercle (et demi-couvercle occultant) assurant la sécurité des poissons vis-à-vis des nuisibles (oiseaux) et limitant les perturbations liées à l'activité des agents de la pisciculture. L'eau des bacs sera constamment renouvelée en eau de source (5-7 fois par heure), ce qui permet de couvrir les besoins en oxygène des poissons. Les poissons seront nourris à satiété visuelle à la main 2 fois par jour (entre 8h30/9h00 puis entre 16h30/17h00). L'ensemble de ces dispositions permettra le bon déroulement de l'essai nutritionnel. Les animaux seront anesthésiés puis euthanasiés dans différents bains de benzocaïne à des doses adaptées et leurs sangs, cerveaux, foies, reins, muscles, corps entiers seront prélevés pour déterminer, en plus des données zootechniques, l'impact du sélénium sur la toxicité au mercure au niveau chimique (dosage des différentes formes de mercure et sélénium), biochimique (activité des enzymes) et moléculaire (sur l'expression de gènes).

Enfin, dans le cadre de la règle des 3R :

- Le remplacement n'est pas possible, car l'étude des effets d'un régime alimentaire chez un animal ne peut pas se faire in vitro ou par des systèmes de mesures informatiques.
- Le raffinement est respecté car les conditions d'élevages seront optimisées et les prélèvements de sang seront réalisés sur des animaux anesthésiés.
- La réduction a été un objectif réel, le nombre de poissons prélevé est calculé à minima, compte-tenu de la variabilité individuelle observée dans les essais nutritionnels et les analyses antérieurs, tout en maintenant des conditions d'élevage optimales pour les poissons avec une densité adaptée tout au long de l'essai (toujours supérieure à 15 kg/m³ et inférieure à 40 kg/m³).

Enfin, un suivi quotidien du bien-être animal sera évalué à l'aide d'une fiche d'évaluation quantitative du point limite. Les critères évalués sont : la prostration et l'isolement prolongé de l'animal, la nage anormale, la prise alimentaire perturbée et la position inhabituelle dans la colonne d'eau. Le second critère physique évalue le changement de volume anormal, les lésions comportementales dues aux blessures ou maladies, l'apparition de malformations, ainsi que l'aspect général de la peau. Si une note de 3 est scorée sur un des points à évaluer, l'animal sera euthanasié via les procédures réglementaires.

18841 L'une des principales difficultés dans l'étude des animaux est l'impact de la présence humaine et de leur manipulation pour les interventions nécessaires à leur étude (marquage individuel, équipement avec des instruments miniaturisés, pesée...). L'intensité de cette perturbation varie selon la personnalité individuelle des animaux et selon les espèces animales considérées. En outre, la perturbation peut avoir d'autres causes que la présence de l'homme. Le baguage des manchots à l'aile, longtemps utilisé pour leur reconnaissance individuelle, se traduit par une gêne hydrodynamique qui induit une importante diminution de la survie et du succès reproducteur. Le problème est à la fois scientifique et éthique. Scientifique, car ces perturbations peuvent être source de biais expérimentaux : ainsi dans l'étude de l'impact du climat sur le succès reproducteur, ce

succès peut en fait davantage dépendre de la gêne hydrodynamique que du changement climatique. Ethique, car comment justifier une étude dont les résultats scientifiques sont biaisés ? Et comment justifier une étude ayant un impact sur le succès reproducteur et la survie pour des espèces menacées ?

L'identification par RFID (radiofréquence) des animaux dans leur milieu naturel permet d'éviter l'impact délétère d'une bague mais sa principale limitation est la courte distance de lecture, soit 20 à 50 cm selon le système utilisé. La lecture reste donc problématique à cette distance. En effet, si l'on peut envisager une identification non perturbante en enterrant les antennes RFID sur les lieux de passage des animaux, comment les identifier en dehors de leurs points de passage et notamment sur leur site de reproduction ? Il a été montré que l'on peut alors faire appel à un véhicule miniaturisé télécommandé à distance, un « rover ». Son approche induit en effet chez les couveurs une défense de leur territoire et une augmentation de leur fréquence cardiaque similaires à celles provoquées par des manchots royaux en transit dans la colonie passant à côté d'eux. En outre, les couveurs se comportent comme s'ils oubliaient totalement le rover lorsqu'il s'immobilise. Un rover peut donc être utilisé pour collecter des données physiologiques stockées par des loggers implantés chez les manchots sans la moindre perturbation. Par contre, les couples de manchots royaux déjà cantonnés dans la colonie mais n'ayant pas encore d'oeuf s'écartent à l'approche du rover et le laissent passer sans défendre leur site de reproduction avant d'y revenir. Qu'en est-il pour d'autres espèces de manchots ?

Le principal objectif de cette étude est donc de déterminer la réponse comportementale et physiologique au cours et en-dehors de la période de reproduction d'une petite population captive de manchots de Humboldt à l'approche d'un rover télécommandé. On peut s'attendre à la même défense territoriale que pour les manchots royaux chez les reproducteurs car les manchots de Humboldt défendent leur nid quand les soigneurs doivent y intervenir. Par ailleurs, la réponse collective des non reproducteurs à l'arrivée d'un inconnu est qu'ils se jettent tous à l'eau... Leur réponse physiologique sera suivie d'après l'évolution de leur fréquence cardiaque grâce à des moniteurs cardiaques implantés et communicants. Pour faciliter l'identification individuelle des manchots, et même à terme s'affranchir de la limitation induite par la courte distance de lecture de la RFID, une méthode d'identification individuelle par reconnaissance faciale grâce à une approche par machine learning est en cours de développement. Les manchots de Humboldt, comme cela a déjà été également montré pour le manchot du Cap, s'y prêtent particulièrement bien en raison de plumes noires sur le plumage blanc de leur abdomen qui les caractérisent individuellement et de façon pérenne. Plus précisément, nous développons un piège à caméra intelligent, constitué d'un capteur miniaturisé de très haute définition connecté à un micro-ordinateur capable d'effectuer une classification des images par apprentissage automatique en temps réel. Un réseau de ces caméras (4 à 6) sera placé de manière à ce que la zone d'étude soit bien couverte. Cela permettra de suivre dans le temps et l'espace les 25 individus de la colonie, et d'analyser leurs réponses comportementales collectives sans perturbation. Enfin, une pesée automatique sur le lieu de passage des manchots (d'une masse corporelle d'environ 5 kg pouvant évoluer de plusieurs centaines de grammes selon la saison) sera développée grâce à une passerelle équipée d'une plate-forme qui reposera sur 4 pesons permettant d'avoir une précision d'environ 11 g pour pouvoir suivre l'évolution pondérale des manchots, qui constitue le meilleur indicateur de leur condition corporelle, et ce en évitant le stress d'une capture.

REMPACER: L'objectif de l'étude étant de réduire, voire supprimer la perturbation induite par la collecte des données physiologiques sur un animal, cette étude ne peut évidemment être réalisée qu'avec des animaux.

REDUIRE: Une étude sur des manchots captifs en parc zoologique permettra de raccourcir considérablement le temps nécessaire à la mise au point de méthodes innovantes, ce qui présente par conséquent un intérêt à la fois éthique, scientifique, mais aussi logistique et financier si l'on considère les contraintes inhérentes aux recherches sur le terrain et à leur énorme coût financier. Par ailleurs, une étude sur des animaux captifs dont l'histoire et la personnalité sont parfaitement connus permet de réduire considérablement le nombre d'individus étudiés pour obtenir des résultats significatifs. Dans cette étude, la réponse comportementale de 25 individus et l'évolution de la

fréquence cardiaque de 8 d'entre eux grâce à des moniteurs implantés seront suivies alors que dans la nature des centaines d'individus seraient impactés.

RAFFINER: les implantations de moniteurs cardiaques seront réalisées par les 3 vétérinaires du parc. Outre leurs qualifications professionnelles médicales, l'un d'entre eux est titulaire d'un niveau concepteur en expérimentation animale depuis plusieurs années. Outre sa fonction de collecteur de données cardiaques le rover servira d'intrus dont les caractéristiques serviront à définir d'après la réponse comportementale et cardiaque des manchots celles de ses caractéristiques qui minimiseront à terme son rôle perturbateur. Il ne sera pas nécessaire de fixer une limite à la procédure expérimentale d'approche du rover, cette limite étant fixée par les animaux qui se précipitent dans leur bassin synonyme de refuge lors d'un stress lié à une intrusion.

18842 La voûte crânienne correspond à la partie supérieure du crâne et est composée de cinq os plats séparés les uns des autres par les sutures crâniennes. Ces sutures sont lâches et confèrent une plasticité à la voûte, notamment pour permettre au crâne de se développer en raison de la croissance du cerveau. Certaines pathologies entraînent une fusion prématurée de ces sutures, ayant pour conséquence une perte de plasticité du crâne, les patients ont un crâne plus petit dû à l'arrêt prématuré de son développement affectant ainsi le développement du cerveau. Dans l'espoir de pouvoir soigner ces patients, il est essentiel de comprendre le rôle des gènes impliqués dans ces pathologies au cours de du crâne de manière à établir des stratégies thérapeutiques. Sachant que les modèles de souris de ces maladies ne présentent pas de fusion des sutures pour notre gène d'intérêt il a fallu se tourner vers un autre organisme. Les mécanismes de développement du crâne chez le poisson zèbre sont comparable à l'homme et de nombreux outils technologiques sont disponible pour cet organisme, nous nous sommes tournés vers ce modèle. Ce projet, d'une durée totale de 4 ans a pour objectif d'étudier spécifiquement le rôle de notre gène d'intérêt au cours de la formation osseuse du squelette crânio-facial grâce un modèle de poisson zèbre mimant notre pathologie d'intérêt. A partir de ce modèle, il sera possible de décrypter les processus dans lequel ce gène est impliqué au cours de la formation du squelette de manière à mieux comprendre la provenance de la pathologie. Ce dernier modèle permettra aussi de tester différentes thérapies avec l'espoir de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques chez l'Homme.

L'ensemble du projet se déroulera sur 4 ans et impliquera l'utilisation de 2496 poissons, au stade juvénile ou adulte.

Notre protocole expérimental respecte donc la règle des 3R : remplacement, réduction et raffinement.

Remplacement: Le développement de la voûte crânienne est un mécanisme complexe impliquant différents types cellulaires interconnectés. Son développement est une suite d'événements influencé par de multiples paramètres physiologiques et environnementaux. De ce fait, il est pour le moment impossible de modéliser parfaitement son développement in vitro, et le recours à l'expérimentation in vivo reste incontournable. Néanmoins l'utilisation du poisson comme espèce modèle permet cependant des approches largement non-invasives sans nécessité d'intervention chirurgicale. Enfin la sélection des molécules les plus spécifiques et efficaces permettant potentiellement d'améliorer les défauts du squelette présent dans notre modèle de poisson zèbre se fera au préalable sur des cellules osseuse en culture afin de ne pas utiliser de poissons lors de cette étape de sélection.

Réduction : Pour réduire le nombre de poissons mis en élevage nous limiterons le nombre d'animaux utilisés aux besoins statistiques de nos analyses. Nous générerons uniquement le nombre d'animaux nécessaires à nos projets. La fécondité élevée de l'espèce poisson zèbre est un avantage, car elle permet d'obtenir beaucoup d'embryons, à partir d'une population restreinte de reproducteurs adultes.

Raffinement : La totalité des procédures effectuées sur poissons vivants seront faites sous anesthésie générale. Les points limites ont été envisagés. Un suivi quotidien des animaux sera réalisé. En cas de dépassement des points limites, les animaux seront sacrifiés. Il n'y a pas d'entretien des animaux avec un phénotype squelettique grave. Nous veillerons à fournir un

enrichissement aux poissons grâce à l'apport de nourriture vivante et nous veillerons également à maintenir un enrichissement social.

18843 Les plaquettes jouent un rôle clé dans l'arrêt du saignement. Elles sont également impliquées dans la thrombose artérielle. Suite à la rupture d'une plaque d'athérosclérose dans une artère malade, les plaquettes adhèrent au site de lésion, s'activent et agrègent. Elles forment un thrombus mural qui peut bloquer l'écoulement du sang et entraîner des pathologies ischémiques graves comme l'infarctus du myocarde ou l'accident vasculaire cérébral, qui représentent la première cause de mortalité dans le monde.

Lorsqu'une revascularisation est jugée nécessaire, une angioplastie est réalisée afin de poser un stent, armature métallique maintenant le vaisseau ouvert. Malgré la mise en place d'une bithérapie anti-agrégante plaquettaire, exposant par ailleurs le patient à un risque hémorragique, une thrombose de stent survient chez 0,6 à 3,4% des patients dans l'année qui suit la pose du stent. Il s'agit d'une complication rare mais grave, responsable de décès dans 20% à 40% des cas, et d'infarctus dans 50% à 70% des cas.

L'objectif de ce projet vise à mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la thrombose de stent, notamment d'identifier les récepteurs plaquettaires jouant un rôle majeur dans ce processus : ces récepteurs pourraient constituer de nouvelles cibles thérapeutiques. Pour cela, un modèle de thrombose de stent sera utilisé chez la souris. Il consiste à mettre en place un stent au niveau de la carotide de l'animal d'observer par la suite la formation d'un thrombus. Ce modèle sera dans un premier temps mis au point puis appliqué sur des souris génétiquement modifiées pour les récepteurs plaquettaires étudiés ou ayant reçu un traitement les inhibant.

Respect des 3R :

Remplacement

Le but de ce projet est d'évaluer les mécanismes plaquettaires au cours de la thrombose de stent. Ce processus étant particulièrement complexe et faisant intervenir plusieurs types cellulaires ainsi que des conditions hémodynamiques (vaisseaux, pression artérielle, flux sanguin), les modèles in vitro ne sont pas assez sophistiqués pour reproduire toute la complexité de ce processus.

Réduction

Le nombre d'animaux utilisés lors de cette étude sera réduit au minimum, ce nombre étant fixé à 16 souris/groupe au maximum pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs.

Raffinement

L'utilisation de modèles animaux a été établie en raffinant au maximum les conditions de travail, afin de limiter leur angoisse, stress et douleur lors des manipulations. Pour ce faire, des points limites ont été établis pour les procédures décrites. Ces points limites permettront de soustraire l'animal aux procédures expérimentales et ainsi limiter la souffrance et l'inconfort de l'animal.

A chaque fois que cela est nécessaire, les animaux sont anesthésiés, maintenus à une température de 38°C par l'utilisation d'une plaque chauffante (tout au long de la procédure) et un traitement approprié contre la douleur leur est administré.

Pendant toutes les expérimentations, les animaux sont surveillés par du personnel entraîné.

Cette étude nécessitera l'utilisation de 784 souris.

18844 Après un traumatisme crânien certains patients présentent des pertes de mémoire, bien qu'ils ont récupéré leurs facultés motrices.

Nous souhaitons évaluer l'efficacité de nouvelles stratégies de stimulation cérébrale profonde pour traiter les troubles de la mémoire après un traumatisme crânien. La stimulation cérébrale profonde consiste à délivrer via une électrode intracérébrale de faibles quantités d'électricité dans une région du cerveau. Ce traitement est validé pour des maladies affectant le mouvement comme la maladie de Parkinson. Il est en revanche toujours en cours d'étude pour traiter les problèmes de mémoire tels qu'ils peuvent survenir dans la maladie d'Alzheimer. Dans ce cadre, la structure cérébrale stimulée s'appelle le fornix. Il s'agit d'une véritable "autoroute" reliant les régions du cerveau impliquées dans

la mémoire. Dans notre étude nous testons la stimulation du fornix chez le rat après un traumatisme crânien. Il s'agit d'un nouveau mode de stimulation qui permet d'adapter en temps réel le courant délivré à l'activité cérébrale de l'animal qui est enregistrée en direct. Le modèle de traumatisme crânien chez le rat est un modèle validé avec une très faible mortalité. Les opérations seront réalisées sous anesthésie générale. Nous comparerons les résultats chez des rattes avec traumatisme crânien à trois modèles chirurgicaux de troubles de la mémoire.

Nous prévoyons de mener notre recherche en quatre étapes. La première étape est de valider la faisabilité des différents modèles chirurgicaux. La deuxième étape est d'enregistrer l'activité électrique cérébrale avec une électrode intracérébrale chez les animaux soumis aux différents modèles chirurgicaux. La troisième étape, une fois que nous serons certains des résultats des première et deuxième étapes, consiste à réaliser une implantation d'électrodes de stimulation cérébrale chez les animaux soumis aux différents modèles chirurgicaux. La quatrième et dernière étape consiste à évaluer l'efficacité de la stimulation cérébrale sur la mémoire chez les animaux soumis aux différents modèles chirurgicaux. Les rats seront soumis à des tests non douloureux visant à apprécier leur mémoire (détection d'un nouvel objet)

Respect la règle des 3 R (remplacement, réduction, raffinement des expériences)

Remplacement : notre sujet nous oblige à recourir à l'expérimentation animale. Nous ne pouvons remplacer par un autre modèle car le rat est le modèle de référence pour étudier les enregistrements de l'activité neuronale en lien avec des tâches de navigation.

Réduction : nous avons réduit le nombre total d'animaux utilisés à 286. Ceci est basé sur un calcul de puissance statistique.

Raffinement : le fait de procéder par étapes permet de rationaliser l'utilisation des animaux. En effet il ne serait pas éthique de réaliser d'emblée l'implantation d'électrodes d'enregistrement si les modèles expérimentaux ne sont pas au point. Idem, il ne serait pas logique d'implanter des électrodes de stimulation, si nous n'arrivons pas à procéder à des enregistrements de qualité. La douleur postopératoire sera dépistée avec une échelle d'expression faciale et traitée avec des pommades sur les cicatrices et des traitements antalgiques (paracétamol et dérivés de la morphine). Il n'est pas attendu de retentissement des interventions chirurgicales sur la capacité de l'animal à s'alimenter ou à se déplacer. Tout animal montrant des signes de souffrance majeure sans efficacité des traitements antalgiques et/ou incapable de s'alimenter avec perte de poids >15% en 3 jours et/ou incapable de réaliser les exercices sera euthanasié avant la fin des expériences afin d'éviter toute souffrance. Les animaux seront hébergés deux par deux et des objets de bois leur seront régulièrement distribués afin qu'ils puissent s'adonner à un comportement de rongeurs, et de ce fait maintenir une usure normale de leurs incisives.

18845 Contexte : Les plaquettes sanguines jouent un rôle fondamental dans les processus d'hémostase. C'est ce qui nous permet d'éviter les hémorragies en cas de blessures ou de lésions. Quand le taux de plaquettes circulantes chute en dessous de 30.000 plaquettes par μL de sang chez un patient, le risque d'hémorragie interne devient important et une transfusion peut être envisagée. Une complication post transfusionnelle connue est la production d'anticorps anti-plaquettes par le receveur dirigés contre les plaquettes du donneur, on parle alors d'allo-immunisation. Ainsi, si le receveur développe de tels anticorps de nouvelles transfusions seront inefficaces sur un plan thérapeutique puisque les plaquettes du donneur seront détruites par ces anticorps : on dit alors que le patient est en état réfractaire. Cette problématique est particulièrement importante chez des patients dont les pathologies nécessitent des transfusions plaquettaires récurrentes.

Objectif : Des études préliminaires au laboratoire ont permis de suggérer l'implication de certaines sous populations de cellules de la rate dans le processus d'alloimmunisation. Nous avons constaté que nous réussissions à diminuer la quantité d'allo anticorps produite en ciblant certaines populations cellulaires. Ce projet nous permettra d'étudier le type d'allo anticorps produits lors de l'alloimmunisation et d'étudier le mode d'action de ces allo anticorps dans l'élimination des plaquettes transfusées lors d'un état réfractaire.

Méthodologie : La compréhension de tels mécanismes nécessite la mise en place d'un modèle animal d'allo-immunisation afin de pouvoir prélever, après la transfusion, différents échantillons (organes, sang, . .) et analyser la prise en charge des plaquettes transfusées et les mécanismes immuns qui en découlent. Ce modèle repose sur la différence entre des molécules qu'on peut retrouver entre le donneur et le receveur. Ce modèle nous permettra de modéliser le phénomène d'alloimmunisation. Une fois les souris alloimmunisées, notre but sera d'étudier les mécanismes conduisant à l'élimination des plaquettes lors d'un état réfractaire.

Réduire : Les nombres d'animaux utilisés lors des expériences seront minimalisés, avec la contrainte d'obtenir des observations suffisamment représentatives. Des expériences préliminaires au laboratoire nous ont permis de fixer à 5 le nombre de souris par conditions testées, ce chiffre tient compte de la variabilité de la réponse immune inter individus. .

Remplacer : Le développement d'une réponse immune met en jeu des mécanismes cellulaires complexes qui se mettent en place sur des durées de plusieurs semaines que seules les expériences avec des animaux permettent de suivre.

Raffiner :

Un soin particulier sera apporté afin de diminuer le stress et la douleur de tous les animaux utilisés dans ce projet : -Hébergement dans des cages munies de particules de bois et enrichie avec un carré en coton compressé afin de permettre aux animaux de réaliser un nid conformément à leurs besoins comportementaux

-Accès permanent à l'eau de boisson et à la nourriture

-Anesthésie de l'animal lors des procédures invasives et Injection d'analgésique le cas échéant.

-Mise en place d'une fiche de suivi pour suivre l'état des animaux et veiller à leur bien être tout au long de l'expérimentation.

Pendant toutes les expérimentations, les animaux sont surveillés par du personnel entraîné. Ils veilleront au bien être des animaux grâce à l'utilisation d'une grille de scoring et à la définition de points limites permettant d'éviter toutes douleurs ou souffrances inutiles de l'animal.

Ce projet nécessitera 266 souris au maximum

18846 De nombreuses études en neurobiologie utilisent la Souris comme modèle animal, afin de tester l'effet comportemental de substances et/ou d'étudier des mécanismes cérébraux. Ces études sont majoritairement menées avec des conditions d'hébergement standards et des tests comportementaux classiques. Ces conditions d'expérimentation, très éloignées de l'état naturel des animaux, restreignent leur répertoire comportemental et sont donc susceptibles de biaiser les résultats de ces études. Notre projet consiste à observer le comportement de souris vivant dans des conditions plus proches de leur environnement naturel, leur permettant d'exprimer une plus grande partie, sinon l'intégralité, de leur répertoire comportemental. Cette méthode nous permettra d'étudier le lien entre l'organisation sociale de groupes de souris et les processus de prise de décision et de vulnérabilité aux drogues, notamment la nicotine, avec une approche éthologique.

Pour ce faire, nous avons développé un large environnement d'hébergement et de test, enrichi socialement et physiquement, en faveur du principe de raffinement. En effet, les animaux vivront en larges groupes, au sein d'un environnement de grande taille, compartimenté et enrichi, attendant à une zone de test individuel où différentes substances pourront être administrées via l'eau de boisson. Des tests comportementaux classiques pourront également être effectués in situ ou dans des environnements plus simples. Les animaux seront suivis individuellement à distance, à l'aide de puces d'identification par radio-fréquence (RFID) implantées en sous-cutanée et détectées par des antennes balisant l'environnement, ainsi que par caméra, et ce pendant plusieurs semaines avec réapprovisionnement régulier en boisson et nourriture (ad libidum). Le stress lié à l'intrusion et à la manipulation humaine est donc réduit au minimum nécessaire. Ce dispositif favorise donc le principe de raffinement. Nous avons par ailleurs créé une base de données afin de récolter et d'exploiter la grande quantité de données générée par ce système. Celle-ci sera complétée par des expériences post-hoc (in et ex vivo) visant à étudier les structures cérébrales impliquées dans la

prise de décision et l'addiction. Ainsi, cette configuration nous permettra de récolter un maximum de données, afin des corrélés de nombreux paramètres comportementaux sur les mêmes animaux. Ceci nous permettra d'utiliser moins d'animaux que ce qui aurait été possible avec plusieurs tests comportementaux "classiques" où le nombre d'animaux aurait été supérieur et le stress imposé aux animaux plus important (à travers différentes conditions d'expérimentation nécessitant plusieurs phases d'habituation), et s'inscrit donc en faveur des principes de raffinement et de réduction.

Ces expériences seront menées sur des souris sauvages et sur des animaux invalidés pour des gènes codant des sous-unités des récepteurs nicotiques, connus comme étant impliqués dans les mécanismes de prise de décision et d'addiction. Nous utiliserons également des pompes osmotiques sous-cutanées capables de délivrer de la nicotine de manière chronique afin d'en observer l'effet sur le comportement des animaux et sur le circuit de la récompense impliqué dans la prise de décision et l'addiction. Nous aurons également recours à l'utilisation d'outils chimogénétiques qui consiste à introduire dans certains neurones un récepteur conçu pour répondre à une substance particulière non endogène. Cette dernière, qui pourra être administrée par l'eau de boisson nous permettra de moduler l'activité de certains neurones et ainsi d'étudier plus précisément les circuits de la récompense et leur implication dans les mécanismes de prise de décision et d'addiction. Toutes les méthodes nécessitant un acte chirurgical sont réalisées sous anesthésie, avec administration locale d'une substance analgésique. Des points limites sont définis et surveillés pour chaque procédure chirurgicale (signes de détresse, lésions. . .). Au delà de ceux-ci, les animaux concernés sont isolés et soignés ou euthanasiés le cas échéant. Au cours des 5 années sur lesquelles ce projet court, nous prévoyons d'utiliser 819 souris au total. Les groupes d'animaux testés seront définis de manière à réduire le nombre d'animaux au minimum nécessaire pour obtenir des résultats robustes, dans les différentes conditions.

18847 Le mélanome et le carcinome rénal à cellules claires (CRCC) sont deux maladies agressives et malgré le développement de thérapies ciblées et d'immunothérapies, les patients diagnostiqués au stade métastatique ont toujours un mauvais pronostic. Il est donc urgent de trouver de nouvelles cibles pour les tests de diagnostic précoce et pour les traitements de la maladie métastatique. Les fonctions cellulaires ne sont pas uniquement réalisées par les protéines mais également par certains acides nucléaires simple brin dont l'expression est souvent spécifique d'un tissu. Plusieurs de ces molécules sont surexprimées dans les tissus cancéreux par rapport aux tissus normaux. Des mécanismes d'inactivation existent et pourraient permettre le développement de médicaments. Nous avons caractérisé un groupe de trois acides nucléaires qui sont déterminants pour la prolifération et la viabilité des mélanomes et des cellules de CRCC in vitro. Pour confirmer davantage leur potentiel en tant que cibles médicamenteuses, nous cherchons à tester les effets de leur surexpression ou de leur inhibition in vivo, par transplantation de lignées cellulaires humaines sur des souris Nude ou de lignées cellulaires murines sur des souris de la même souche. **REMPACEMENT** : nous avons effectué l'inactivation et la surexpression des 3 acides nucléaires dans des lignées cellulaires humaines in vitro, démontrant ainsi leur importance pour la prolifération et la survie des mélanomes et des CRCC. Toutefois, ce modèle a des limites et ne tient pas compte ni de la croissance dans des conditions tridimensionnelles, ni du rôle des autres cellules stromales qui entourent les cellules tumorales. Ces caractéristiques ne peuvent être récapitulées que par un modèle in vivo, c'est-à-dire par injection sur des souris immunodéficientes. En outre, l'injection de lignées cellulaires de CRCC et de mélanomes murins chez des souris immunocompétentes sera la seule méthode permettant de tester l'interaction entre les cellules tumorales et les cellules immunitaires.

REDUCTION : Le nombre total de souris expérimentales sera de 278. Cet effectif correspond au nombre d'animaux nécessaires afin que les résultats obtenus soient exploitables et reproductibles, soit statistiquement valides.

Par ailleurs, plusieurs expériences sont réalisées sur la même cohorte de souris afin de réduire le nombre total de souris nécessaires.

RAFFINEMENT : Nous mesurerons les différences de croissance tumorale dans les différentes conditions à 4 semaines (ou lorsque la tumeur aura atteint un volume maximal de 1cm³). En outre, toutes les lignées ayant été infectées avec un lentivirus permettant l'expression constitutive de la luciférase, elles émettront un signal lumineux, qui pourra être détecté par imagerie (IVIS Lumina) afin de monitorer la taille de la tumeur primaire et la progression métastatique des tumeurs. Nous suivrons journalièrement l'état des souris après injection des lignées tumorales afin de détecter tout effet dommageable. Les souris seront hébergées en cohorte afin de conserver l'interaction sociale. En cas de souffrance liée au phénotype, les animaux seront suivis régulièrement et des points limites appliqués le cas échéant.

18848 Depuis les premiers rapports indiquant l'apparition d'un syndrome respiratoire aiguë sévère (SRAS) induit par le coronavirus-2 (SARS-CoV-2) en Chine en 2019, la COVID-19 a déjà infecté près de 64 millions de personnes à travers le monde et a causé près de 1,5 millions de décès. L'infection à la COVID-19 constitue donc un réel problème de santé publique.

L'infection à SARS-CoV-2 se caractérise par une large palette de symptômes parmi lesquels : fièvre, toux, dyspnées, fatigue, douleurs musculaires, maux de têtes et dans environ 6% des cas, l'état des patients se dégrade et nécessite une hospitalisation en réanimation. Il est également observé que la présence de facteurs de comorbidité (sexe, âges, obésité...) est liée à la survenue de forme sévère de la COVID-19. De nombreuses équipes de recherche se sont intéressées à la réponse immunitaire mise en place lors d'une infection à SARS-CoV-2 afin de comprendre les mécanismes inhérents à cette infection et d'aider les cliniciens dans leurs approches thérapeutiques auprès des patients. De récentes études indiquent que le ratio neutrophile-sur-lymphocyte (NLR) serait un bon marqueur prédictif de la sévérité de la maladie chez ses patients.

Pour notre part, nous avons cherché à comprendre l'implication des neutrophiles dans le développement de la pathologie. Nous avons ainsi étudié les marqueurs de surface des neutrophiles présents dans le sang des patients infectés et nous avons mis en évidence la présence de 2 nouveaux subsets de neutrophiles immatures. De plus ces marqueurs, mesurés en début d'infection, étaient significativement corrélés avec la sévérité de la maladie développée chez ses patients. Disposer de marqueurs prédictifs de la maladie pourrait être un outil indispensable en clinique. Nous aimerions donc à présent caractériser davantage ces populations de neutrophiles et comment cette dérégulation des neutrophiles peut impacter sur la sévérité de la maladie.

Notre projet consiste à étudier le phénotype des neutrophiles, leur fonction et leur dynamique d'apparition et disparition dans des modèles de souris sensibles à la COVID-19. Nous souhaitons également étudier l'impact des facteurs de comorbidités sur les neutrophiles et l'effet de différentes approches thérapeutiques ayant pour visée la modulation de la fonction des neutrophiles. Par ailleurs, les patients ayant développé une infection à SARS-CoV-2 peuvent par la suite développer une seconde infection ayant un tropisme pulmonaire sans que nous ne connaissions l'impact de cette première infection sur la seconde (facilitante ou au contraire protectrice) ainsi, nous souhaitons mettre en place un modèle de seconde infection (2 hits) afin d'étudier l'impact de la primo infection au SARS-CoV-2 sur une seconde infection ayant elle aussi un tropisme pulmonaire. Ainsi, les modèles que nous souhaitons développer seront des modèles d'infections à SARS-CoV-2 par voie intranasale.

A. Définition de la dose infectante afin d'obtenir une infection à COVID modérée dans nos conditions expérimentales à raison de 36 animaux

B. Etude de la réponse immunitaire durant la cinétique de l'infection à raison de 84 animaux

C. Impact des facteurs de comorbidités (obésité) sur la mise en place et le profil de la réponse immunitaire à raison de 48 animaux

D. Etude de la distribution tissulaire des leucocytes lors de l'infection en utilisant des souris MacApple (leucocytes tagués en rouge) x h-ACE-2 à raison de 60 animaux

E. Etude de la distribution tissulaire des populations macrophagiques lors de l'infection et en présence de comorbidités en utilisant des souris MacBlue (macrophages tagués bleus) x APOE (souris spontanément obèses) x h-ACE-2 à raison de 60 animaux

F. Effet de traitements ciblant les marqueurs des neutrophiles dans le développement de la réponse immunitaire et de la pathologie à raison de 192 animaux

G. Impact de l'infection à SARS-CoV-2 dans un contexte de seconde infection sur le développement de cette seconde infection et la réponse immunitaire qui en découle à raison de 240 animaux

Notre projet de recherche s'intéresse à l'infection au SARS-CoV-2. Cette dernière induit une réponse de l'hôte qui est évolutive au cours du temps et qui présente un tropisme multi-organes et de grandes fonctions biologiques c'est pourquoi, il nous est impossible de remplacer le modèle animal par un modèle d'étude in vitro dans le cadre de ce projet de recherche. Nos expérimentations mettront en jeu des souris car d'une part c'est l'animal le plus riche en outils pour l'étude du système immunitaire et d'autre part, des souris sensibles au SARS-CoV-2 ont été développées (ce qui est crucial puisque tous les animaux ne sont pas sensibles au SARS-CoV-2). De plus, nous souhaitons utiliser des animaux adultes âgées de 8 à 12 semaines afin de nous permettre de faire un parallèle entre les résultats observés sur nos cohortes de patients et ceux obtenus à partir des expérimentations sur animaux.

Nous réaliserons les expérimentations en animalerie A3. Pour se faire, seules les personnes compétentes et habilitées pourront accéder aux locaux, en portant les EPI adéquats et en adoptant les procédures validées par le responsable de l'A3. Les infections sont réalisées sous PSM et dès lors que les animaux seront infectés, toutes les manipulations suivantes seront réalisées sous PSM, y compris le change, le sacrifice des animaux, les prélèvements d'organes et sang et cela jusqu'à fixation des échantillons.

Ce programme de recherche est développé dans le respect de la règle des 3R. Il sera tiré profit de chaque animal pour nous apporter un maximum d'information. Ainsi, nous réaliserons plusieurs analyses sur chaque animal (suivi des poids, étude de la réponse immunitaire mise en place dans le sang, les poumons, les reins et la moelle osseuse, histologie des poumons et reins, dosages protéiques sur le sang, le poumon et le rein). Nous essayerons de regrouper les expérimentations afin de réduire le nombre de groupes contrôles (réalisation d'un effet dose comprenant le groupe contrôle et les différentes doses de souches infectantes en une seule expérimentation). De plus, nous optimiserons au maximum nos protocoles afin de maîtriser la souffrance animale. Enfin, un suivi journalier de l'état de santé des animaux sera réalisé par du personnel compétent. Une pesée des animaux sera réalisée quotidiennement. Le milieu des cages sera enrichi avec des nidifications biodégradables en papier kraft et des maisons en carton afin stimuler les activités cognitives et exploratrices des animaux tout en satisfaisant leurs instincts naturels.

En prenant en compte l'ensemble des procédures appliquées et la diversité des protocoles expérimentaux, le nombre d'animaux utilisés sera de 720 animaux sur 5 ans.

18849 La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est la première cause de malvoyance après 50 ans. On estime à un million le nombre de personnes concernées en France et ce nombre ne cesse de croître avec le vieillissement de la population. Les causes précises de la maladie restent mal connues à ce jour.

Afin de mieux comprendre la biologie de la DMLA et de pouvoir développer des thérapies efficaces, une étude pangénomique de plus de 17 000 patients atteints de DMLA et de 60 000 contrôles a été réalisée. Cette étude a mis en évidence plusieurs loci comme étant associés à un risque accru de développer la DMLA.

Parmi ceux-ci, un en particulier a attiré notre attention. Il s'agit d'un allèle du gène codant pour le transporteur de lactate MCT3, le gène SLC16A8.

Dans des études antérieures, l'équipe avait montré que le facteur trophique RdCVF protège les cônes en stimulant la glycolyse aérobie, or le lactate est un produit de la glycolyse aérobie.

Afin de mieux comprendre le rôle du gène SLC16A8 dans le développement de la DMLA, nous avons fait créer un modèle murin porteur de l'allèle à risque du gène SLC16A8 identifié dans l'étude pangénomique associative.

Le but de ce projet est d'étudier le phénotype rétinien de ce modèle au cours du vieillissement.

Au total 360 souris seront nécessaires à ce projet en incluant les contrôles.

L'importance du transporteur du lactate MCT3 pour la vision ne peut que s'étudier chez l'animal qui est un complément indispensable à nos études biochimiques réalisées avec des cellules iPS différenciées en épithélium pigmenté rétinien issue de patients portant des allèles à risque pour la DMLA du gène SLC16A8. Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Les animaux sont hébergés dans les conditions conformes à la réglementation. Les rongeurs bénéficieront d'une anesthésie générale fixe et d'une anesthésie cornéenne pour les électrorétinogrammes. Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée. Une observation régulière des animaux est effectuée pour s'assurer du bien-être des animaux.

Le nombre d'animaux a été réduit au minimum pour pouvoir obtenir suffisamment de données statistiquement significatives et atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R » : Remplacer, 2) Réduire et 3) Raffiner.

Les seules cellules qui expriment le gène SLC16A8 sont les cellules ARPE19 (lignée transformée) et les cellules induites à la pluripotence différenciées in vitro en cellules de l'épithélium pigmenté rétinien. Bien que ces outils puissent permettre de faire des analyses biochimiques du transport du lactate, elles ne peuvent en aucun cas tester les conséquences d'un défaut du transport du lactate sur la vision.

18850 Le projet : Le facteur de différenciation Preadypocyte factor 1 (ou Pref1) est un facteur crucial pour formation du tissu adipeux et sa capacité à sécréter de la leptine, l'hormone principale signalant la satiété au cerveau. Des altérations de la croissance ont été observées chez les souris présentant une déficience globale en Pref1 et une altération de l'axe somatotrope est suspectée. L'axe somatotrope est un axe neuro-endocrinien qui régule la croissance staturo-pondérale après la naissance. Il est contrôlé par des neurones situés à la base du cerveau dans une région appelé hypothalamus. Ces neurones régulent la production et la libération de l'hormone de croissance (Growth hormone, GH) par l'hypophyse située juste en dessous du cerveau. Une partie des effets de l'hormone de croissance seront relayés par un facteur produit au niveau du foie, l'IGF-1 (insulin like growth factor 1). Néanmoins, le mécanisme sous-jacent permettant de relier l'action de Pref1 à cet axe somatotrope n'a pas encore été élucidé.

De manière intéressante, l'expression du facteur Pref1 a été observé dans l'hypothalamus et l'hypophyse de souris. Nous supposons que Pref1 pourrait agir de manière local (fonction paracrine) sur le développement des neurones hypothalamiques sécrétant le Growth Hormone releasing hormone (GHRH) et qui contrôlent l'axe somatotrope. Nous souhaitons réaliser une délétion de Pref1 au niveau de l'hypothalamus uniquement, par le croisement de souris exprimant la recombinase Cre sous le promoteur du gène NKX2-1. Ceci permettra d'étudier le rôle de la protéine locale et d'éliminer les nombreux et lourds effets secondaires dû aux nombreux rôles de Pref1 dans d'autres tissus qui sont visibles lors d'une invalidation globale.

Au sein de ce protocole, nous étudierons la croissance postnatale (poids corporel) des souris invalidées pour Pref1 dans l'hypothalamus et leurs contrôles respectifs, leur taille adulte (longueur naso-anale), ainsi que l'expression de plusieurs gènes clés dans l'activité de l'axe somatotrope. Ceci sera complété par des mesures de concentration de plusieurs hormones dans le sang. De plus, nous étudierons l'impact de cette délétion en Pref1 sur le développement de l'axe somatotrope et des neurones GHRH à des étapes importantes, préalablement identifiées lors de nos précédentes études.

Les animaux :

* Type : Souris *mus musculus* transgéniques

* Nombre: Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 384 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R

». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

La conformité au principe des 3R :

* Remplacement : Un système vivant est nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu dans le développement de ce projet impliquant de nombreux aspects métaboliques. Il n'est pas possible de recréer in vitro la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires rentrant en jeu.

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

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

18851 La paraplégie spastique héréditaire (HSP) est un groupe de maladies génétiques rares caractérisées par une faiblesse lentement progressive (Paraplégie) et une augmentation du tonus musculaire et de la raideur (Spasticité) des muscles de la jambe. La prévalence est comprise entre 1 et 10 personnes sur 100 000. A ce jour, aucun traitement effectif n'a encore été développé pour cette maladie.

Des mutations de type perte de fonction ont été trouvées chez les patients souffrant de HSP. Un modèle souris de HSP portant une mutation retrouvée fréquemment chez les patients, a été développé. Dans ce modèle, les souris développent des symptômes neurologiques proches de ceux rencontrés chez l'homme, comme des déficits comportementaux et une atrophie progressive du cerveau sans avoir de phénotype sévère. Dans notre projet, l'objectif est de suivre l'apparition des symptômes neurologiques pendant 8 mois afin de mieux caractériser le modèle au niveau des symptômes d'une part et des mécanismes d'action dans le cerveau d'autre part. Il est important de mentionner que les souris dans ce modèle n'ont pas de phénotype dommageable sévère visible sans une étude comportementale adéquate. Les bénéfices escomptés de ce projet sont une meilleure compréhension des mécanismes d'action conduisant au phénotype neurologique afin de découvrir et d'explorer de nouvelles pistes thérapeutiques pour cette maladie rare.

REMPACEMENT : Nous voulons approfondir l'étude des symptômes. Les effets de cette étude ne peuvent être observés que sur un organisme vivant car ils dépendent du métabolisme d'un organisme complet. C'est pourquoi nous utiliserons des souris. Aucune autre alternative n'existe.

REDUCTION: Nous avons déterminé un nombre minimal de souris pour cette étude. Un nombre de 16 souris par génotype sera utilisé afin de garantir la validité scientifique de l'étude. Un nombre de 32 souris sera utilisé pour l'ensemble du projet.

RAFFINEMENT : Afin d'améliorer le bien-être animal tout au long de sa vie, les conditions d'élevage et d'hébergement seront optimisées par un enrichissement dans toutes les cages (coton et frisure pour faire un nid, tunnel en carton pour se réfugier, bâtons à ronger). Au cours de l'étude, tout signe d'inconfort sera pris en charge en prenant les mesures appropriées en fonction du niveau observé, limitant ainsi la souffrance à l'animal. Des points limites prédictifs seront établis permettant d'interrompre l'étude limitant ainsi la souffrance, la douleur et le stress pour l'animal

18852 Les tumeurs osseuses primitives ont une faible incidence (300 nouveaux cas par an en France) affectant préférentiellement des adolescents et jeunes adultes (pic de survenue à 15 ans pour les sarcomes d'Ewing et 18 ans pour les ostéosarcomes, les deux tumeurs osseuses primitives les plus fréquentes). Malgré des avancées dans la prise en charge de ces tumeurs par des cures de poly-

chimiothérapie moins agressives associées à une chirurgie large de la tumeur en zone saine et conservation du membre, les taux de survie demeurent très faibles pour les formes métastatiques d'emblée ou pour les patients mauvais répondeurs à la chimiothérapie (20-30% à 5 ans). C'est pourquoi il est nécessaire de définir de nouvelles stratégies thérapeutiques pour ces groupes de patients qui demeurent à haut risque.

Le développement tumoral en site osseux est associé à un dérèglement par les cellules tumorales de l'équilibre apposition / résorption osseuse, appelé « cercle vicieux » : les cellules tumorales induisent la production (directe ou indirecte via les cellules stromales ou les ostéoblastes) de facteurs activateurs des ostéoclastes (tels que RANKL, TNF, IL-6, PTH-rP...) qui vont induire la différenciation et l'activation de précurseurs ostéoclastiques en ostéoclastes matures capables de dégrader l'os. Lorsque la matrice osseuse est dégradée, elle va permettre la libération de facteurs de croissance stockés dans cette matrice qui vont à leur tour activer la prolifération des cellules tumorales. L'hypothèse thérapeutique développée dans le laboratoire est de bloquer ce cercle vicieux entre prolifération tumorale / résorption osseuse en ciblant à la fois les cellules tumorales et les cellules osseuses.

Le projet portera sur le développement de nouvelles approches thérapeutiques des tumeurs osseuses primitives par l'utilisation de molécules, antisense, miRNA à activité anti-tumorale et/ou anti-résorption osseuse en monothérapie ou en bithérapie. Ces approches seront testées in vivo dans des modèles murins xénogéniques d'ostéosarcome ou de sarcome d'Ewing.

Ces expérimentations sont indispensables au bon déroulement du projet, permettant de faire un lien entre les résultats obtenus in vitro, et l'éventuelle application clinique. Elles sont incontournables avant une application clinique et ne peuvent être remplacées par des expérimentations in vitro. Le nombre d'animaux utilisés pour mener à bien ce projet sera réduit au strict minimum pour pouvoir conclure de façon statistiquement significative, à savoir 8 animaux par condition, à raison de 4 conditions par molécule à tester, soit un total de 32 animaux par expérimentation. Nous évaluons à 6 le nombre de molécules anti-résorption et 6 les molécules anti-tumorales, soit 12 molécules au total sur une période de 5 ans. Ces molécules seront testées à la fois en monothérapie dans des expériences d'effet-dose (3 doses testées) et en bi-thérapie. Chacune des expérimentations sera confirmée une fois. Si les résultats sont homogènes nous ne renouvelerons pas inutilement l'expérimentation selon la règle des 3R. Néanmoins, si les résultats des 2 expérimentations sont hétérogènes ou discordants, nous renouvelerons l'expérimentation (pour un total de 3).

Il s'agit d'un protocole générique qui permettra de faire la preuve de concept préclinique de l'intérêt thérapeutique de certaines molécules pressenties après un premier screening in vitro. Un total de 2304 souris immuno-déficientes est prévue sur une période de 5 ans.

Le bien être des animaux sera primordial durant les expérimentations, notamment par des phases d'acclimatation, un enrichissement de l'environnement (ajout de papier dans chaque cage pour leur permettre la conception d'un « nid »). Afin de raffiner les procédures expérimentales, les animaux seront observés quotidiennement afin de détecter le plus précocément possible tout signe de douleur. Les animaux anesthésiés seront placés sur un tapis chauffant lors de la réalisation des gestes techniques, une analgésie sera appliquée dès que nécessaire et des points limites strictes seront établis (développés ci-dessous).

18853 Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), on définit l'infertilité comme l'incapacité pour un couple de procréer après deux ans de rapports sexuels non protégés. Il est généralement admis qu'environ 15 % des couples sont confrontés à des problèmes d'infertilité. L'infertilité est donc un problème majeur de Santé Publique et représente un enjeu médical et scientifique important. Les causes de l'infertilité sont multiples mais demeurent souvent inconnues. On estime qu'une large partie de ces causes inexplicables pourrait être d'ordre génétique et récemment de nombreux gènes de méiose ont été impliqués dans cette pathologie. La mutation de ces gènes affecte aussi bien la fertilité féminine que masculine. Une meilleure connaissance de ces gènes permettrait d'améliorer le diagnostic de l'infertilité.

La méiose est le processus central de la reproduction qui permet de former les gamètes (spermatozoïdes ou ovocytes). Cet événement cellulaire qui n'a lieu qu'une fois au cours de chaque cycle de reproduction est finement orchestré à travers l'expression d'un jeu de gènes spécifiques. Ces gènes méiotiques ne sont exprimés que dans les organes reproducteurs et sont extrêmement conservés entre la souris et l'homme. La mutation de ces gènes entraîne en général des défauts de fertilité. Cependant de nombreux gènes méiotiques sont encore inconnus. Ce projet de recherche portera sur l'étude d'un nouveau gène méiotique récemment identifié. Pour comprendre sa fonction, nous proposons de l'invalider (de réaliser un KO/knock-out). De plus il conviendra d'étiqueter la protéine correspondante (KI/Knock-In) afin de pouvoir la localiser et de comprendre son rôle au cours de la méiose dans l'espèce murine (*M. musculus*). La fertilité des souris mutantes pour ce gène sera étudiée sur deux générations. Leurs organes reproducteurs seront prélevés et analysés afin de déterminer la fonction de ce gène au cours de la méiose. Ce projet requiert la génération de souris transgéniques par la technique d'édition du génome (Crispr). Ces souris pourraient être hypofertiles ou stériles sans qu'aucun autre tissu ne soit atteint (pas d'autre effet délétère) car ce gène ne s'exprime que dans les cellules méiotiques (dans le testicule ou l'ovaire). Le suivi des stades successifs au cours de la méiose permettra d'identifier les éventuels stades défectueux de la gamétogenèse, si un phénotype d'hypofertilité est avéré. Pour cela l'injection par voie intrapéritonéale d'un analogue de la thymidine (une base de l'ADN), le BrdU, sera utilisée. Le BrdU permet de marquer les cellules au moment où elles débutent la méiose et ainsi d'affiner l'analyse de ces cellules sur coupes histologiques. Le recours aux animaux est une étape nécessaire pour étudier la fonction de reproduction qui ne peut être mimée in vitro à partir de lignées cellulaires. En effet, aucune lignée cellulaire, à ce jour, n'est capable d'entrer en méiose. Enfin les tests de fertilité comportent une analyse quantitative de la reproduction des souris (comptage des bébés) et cette fonction ne peut être reproduite in vitro. Une fois la fonction biologique (méiotique) du gène validé, la caractérisation biochimique de la fonction de la protéine sera poursuivie par des tests cellulaires in vitro. Ces tests biochimiques viennent compléter les approches in vivo et limitent le recours aux animaux.

Nous estimons qu'au maximum 4453 souris seront utilisées au cours des cinq années de ce projet.

Le nombre nécessaire d'animaux pour que les résultats de cette étude puissent être analysés statistiquement avec fiabilité a été déterminé sur la base d'une fertilité normale des animaux mutants car on ne peut, à ce stade, préjuger de l'impact de la mutation (KO) sur la fertilité. Il est ainsi de 132 souris adultes ; 30 souris jeunes et 4291 embryons et nouveau-nés pour toute la durée de l'étude (5 ans). Ce nombre pourrait être réduit si un défaut de fertilité est observé. Par exemple, si les souris mutantes étaient stériles, seuls 278 animaux (du fait de l'absence de petits) seraient requis pour ce projet. Le but de ce projet étant de déterminer la fertilité de ces mutants, ce paramètre est inconnu. Les animaux sont nés et élevés dans des élevages agréés. L'état de santé des animaux est surveillé quotidiennement tout au long des expériences afin d'éviter l'apparition éventuelle d'une souffrance. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum. Pour leur bien-être, les animaux sont hébergés à plusieurs par cage (dans la limite réglementaire) dans un milieu enrichi comprenant du coton de nidification et des tunnels. L'étude ne modifie pas l'espérance de vie des animaux. En cas de besoin, l'application de critères d'arrêts nous permettra d'intervenir immédiatement dès le moindre signe de souffrance en utilisant des traitements antalgiques appropriés ou de décider d'une euthanasie.

18854 L'hypertension pulmonaire (HP) est une maladie cardiopulmonaire chronique très sévère caractérisée par l'occlusion progressive des vaisseaux pulmonaires qui induit une insuffisance cardiaque droite conduisant à la mort du patient. Diverses formes d'HP existent - classifiées en 5 groupes d'HP primaires ou secondaires à d'autres pathologies - qui touchent jusqu'à 1% de la population mondiale. Aucun traitement ne permet de réverser ou d'arrêter la progression de la pathologie et la survie ne dépasse pas 60% après 5 ans suivant le diagnostic. Nous avons identifié un récepteur impliqué dans le remodelage vasculaire au cours de l'HP expérimentale chez la souris. Il est maintenant primordial de vérifier si le blocage spécifique de cette voie améliore la fonction vasculaire pulmonaire et la survie dans un modèle pré-clinique de la pathologie couramment utilisé

en recherche: le rat traité à la monocrotaline. L'inhibition spécifique de ce récepteur se fait à l'aide d'un anticorps bloquant (Ac). Le projet que nous proposons est d'étudier l'effet d'un anticorps bloquant spécifiquement ce récepteur dans le modèle de rat traité à la monocrotaline (MCT, modèle d'HP sévère) dans un protocole de prévention de la pathologie mais aussi dans un protocole curatif, une fois la maladie installée. Le projet se découpe en 4 grandes parties. Une première partie sera l'étude de l'effet dose-réponse de l'anticorps bloquant sur le remodelage vasculaire pulmonaire dans un modèle d'hypertension pulmonaire afin de déterminer la meilleure dose à administrer dans le modèle d'hypertension pulmonaire pré-clinique. Dans la 2ème partie nous étudierons l'effet préventif du traitement sur le développement de l'hypertension pulmonaire (4 groupes de rats : contrôle ou MCT, traités avec l'Ac contrôle ou l'Ac anti-Récepteur). L'anticorps bloquant sera administré dès l'injection de MCT (traitement préventif). La 3ème partie consistera à étudier l'effet curatif de l'anticorps bloquant le récepteur en débutant le traitement 14j après l'injection de MCT, une fois l'HP installée (2 groupes de rats: MCT+Ac contrôle et MCT+Ac anti-Récepteur). Enfin, la 4ème partie du projet consistera à étudier l'effet de l'anticorps bloquant le récepteur sur la survie des rats jusqu'au 42ème jour après administration de MCT afin d'évaluer si le traitement retarde suffisamment le développement de la pathologie pour avoir un effet sur la mortalité des animaux (2 groupes de rats: MCT+Ac contrôle et MCT+Ac anti-Récepteur). Cette partie sera réalisée soit en préventif, soit (préférentiellement) en curatif selon les résultats obtenus au cours de deux précédentes étapes. Cette étude chez le rat permettra de déterminer si cette stratégie induit une protection contre le développement de la maladie (réduction de la pression artérielle pulmonaire, de l'hypertrophie cardiaque droite et du remodelage vasculaire) et améliore la survie.

Nous utiliserons 150 rats au total sur 3 ans. Nous étudierons les mâles car toutes les études de ce type sont réalisées sur les mâles qui sont plus atteints dans ce modèle. Dans nos protocoles et analyses, nous prendrons les mesures suivantes pour appliquer la règle des trois R :

1. Dans nos protocoles et analyses, nous prenons les mesures suivantes pour appliquer la règle des trois R :

a. Remplacer: Dès que possible, les voies et les molécules impliquées seront étudiées in vitro sur des cellules en culture (progéniteurs en culture, cellules vasculaires en culture), cependant la régulation de la pression artérielle pulmonaire et l'effet de cet anticorps bloquant sur l'hypertension pulmonaire et sur la survie ne peuvent être évalués qu'in vivo, c'est pourquoi ce projet nécessite un modèle murin.

b. Réduire: Le nombre d'animaux par groupe a été établi avec notre expérience concernant ce type d'analyses et ces modèles murins pour être au minimum. A notre connaissance, ces expériences n'ont jamais été réalisées ni en France, ni dans le monde, par d'autres équipes dans un protocole expérimental semblable.

c. Raffiner

c. 1. Les volumes injectés (en intrapéritonéal) seront établis en accord avec le poids de l'animal afin d'injecter les plus petits volumes possibles. Les animaux sont soumis à une anesthésie rapide en isoflurane (98%O₂ + Isoflurane 2%) pour permettre l'injection en ip.

c. 2. Nous suivrons l'évolution de la pathologie par échographie cardiaque réalisée sous anesthésie gazeuse (98%O₂ + Isoflurane 2%) sur une table thermostatée à 37°C.

c. 3. Les animaux seront surveillés attentivement pour tout signe de souffrance, en particulier dans le 4ème protocole, afin de les euthanasier dès l'apparition de ces signes. Ils seront pesés 2 fois par semaine. De plus, une surveillance quotidienne et attentive sera effectuée par les zootechniciens ou par les responsables de projet pendant laquelle les points limites seront évalués : - perte de poids -lésion cutanée, -incapacité à se déplacer, -toiletage et -posture de l'animal. De manière globale, le comportement et l'aspect physique et expression faciale seront analysés. Dans le cas où un de ces points limites serait atteint, des procédures d'euthanasie appropriées afin de réduire la souffrance seront mises en place.

18855 Chez l'homme, le défaut d'activité des lymphocytes tueurs est associé à différentes pathologies immunitaires d'origine héréditaire. Toutes ces affections sont caractérisées par l'apparition d'un

syndrome lymphoprolifératif avec activation macrophagique ou syndrome hémophagocytaire (SH). Il semble que les événements responsables du déclenchement du SH soient la persistance des cellules présentatrices d'antigène et la sécrétion d'une molécule pro-inflammatoire. Notre hypothèse de travail est qu'en modulant la sécrétion de cette molécule pro-inflammatoire, nous puissions traiter le SH.

Notre projet a pour but de mieux comprendre la physiopathologie des syndromes hémophagocytaires d'origine héréditaire par la caractérisation de différents modèles murins invalidés pour des gènes responsables de cette pathologie chez l'homme. Pour cela, nous induirons la pathologie en infectant ces différents modèles par le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV), et nous suivrons différents paramètres immunitaires suite à l'infection. D'autre part, nous regarderons l'effet de différentes thérapeutiques sur cette pathologie.

Afin de tester différentes approches thérapeutiques, les modèles murins des SH héréditaires sont les meilleurs modèles animaux qui permettent de reproduire la pathologie humaine. 9 traitements pharmacologiques capables de neutraliser différents types cellulaires, cytokines ou voies de signalisation seront utilisés sur des souris qui ont été préalablement infectées par le LCMV afin d'initier le SH. Les différentes manifestations cliniques et biologiques du SH (hypothermie, cytopénie, sécrétion de molécules pro-inflammatoires, hémophagocytose, infiltration des organes par les lymphocytes et macrophages activés) seront alors regardées au cours de l'infection (numération sanguine) puis après euthanasie de l'animal. Cette étude, prévue sur 5 ans nécessitera au total 2988 souris.

Remplacement : Afin de pouvoir reproduire la pathologie humaine et tester différentes approches thérapeutiques, l'utilisation d'animal vivant est indispensable. Il n'est en effet pas possible de reproduire la pathologie avec un modèle in vitro.

Réduction : Pour tenir compte des 3R, les différents protocoles expérimentaux ont été consciencieusement élaborés afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en permettant d'obtenir des résultats interprétables et statistiques. Le protocole de l'infection par le LCMV permettant d'induire le SH a été déterminé par un précédent projet et permet donc de limiter le nombre d'animaux utilisés.

Raffinement : Nous nous attachons à réduire au maximum la souffrance des souris. Des points limites ont été établis et entraîneront la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire. De plus, tous les prélèvements sanguins seront réalisés sous anesthésie générale. Les souris auront dans leur cage du coton, ainsi que des maisons en cartons et des batonnets à ronger.

Ce projet devrait permettre de mieux comprendre la physiopathologie du SH chez l'homme et de proposer de nouvelles thérapeutiques pour traiter le SH chez l'homme.

18856 La myasthénie grave est une maladie auto-immune. Elle est liée à la production d'auto-anticorps dirigés essentiellement contre le récepteur à l'acétylcholine (RACH), situé à la jonction neuromusculaire. Ces auto-anticorps altèrent la transmission de l'influx nerveux entre le nerf et le muscle conduisant à des faiblesses musculaires plus ou moins invalidantes. Il n'existe actuellement aucun traitement curatif pour la myasthénie. Les traitements actuels sont essentiellement symptomatiques ou non-spécifiques, et doivent être pris à vie.

Dans la myasthénie, si le muscle est l'organe cible, l'organe effecteur est le thymus. En effet, le thymus des patients est caractérisé par l'expression accrue de cytokines inflammatoires, la présence anormale de nombreux lymphocytes B et souvent de centres germinatifs ectopiques (thymus hyperplasique). Le thymus présente tous les acteurs nécessaires à une réaction immunitaire contre le RACH. En effet, les différentes sous-unités du RACH sont directement exprimées dans le thymus. De plus, des cellules T auto-réactives pour le RACH sont détectées dans le thymus et les lymphocytes B des centres germinatifs produisent des anticorps contre le RACH. Des travaux de recherche ont démontré que l'interféron (IFN)- β est l'orchestrateur principal des changements thymiques observés dans la myasthénie. Cet IFN- β serait produit par l'activation des voies de signalisation des acides nucléiques, et notamment l'ARN double brin. Récemment, il a été observé une diminution du nombre de macrophages dans le thymus des patients myasthéniques.

Notre hypothèse est que ce défaut en macrophages altère le processus d'efferocytose (processus par lequel les cellules apoptotiques sont éliminées par les cellules phagocytaires) des thymocytes et que les thymocytes passent alors en nécrose libérant leur contenu intracellulaire, et notamment des acides nucléiques, dans l'environnement thymique. Ce projet de recherche a pour objectif de démontrer chez la souris qu'une augmentation de la quantité de thymocytes

apoptotiques/nécrotiques, associé à un défaut en macrophages thymiques, induit des changements thymiques comme ceux observés chez les patients, et à long terme une myasthénie. Pour induire l'apoptose/nécrose des thymocytes, les souris seront traitées avec du Poly(I:C) ou de la dexaméthasone : molécules connues pour induire une mort accrue de thymocytes. Ces molécules seront testées sur des souris C57Bl6 et des souris NR4A1-/- ayant une déficience en macrophages thymiques.

Ce projet implique l'utilisation de souris; environ 174 souris : 126 C57bl/6 et 48 NR4A1-/. Ce chiffre ainsi que toute la démarche scientifique a été établi afin de respecter la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner) et obtenir des résultats statistiquement significatifs avec le moins de souris possible. A ce jour, ce projet découle d'observations faites chez des patients myasthéniques et d'expériences in vitro autant que possible. Pour valider ces observations, nous sommes obligés de passer sur des modèles animaux pour des études au niveau d'un organe entier (le thymus) et de l'organisme entier pour la mise en place d'une réaction autoimmune. Les différents protocoles seront réalisés les uns après les autres afin de les adapter en fonction des résultats et observations précédentes et ainsi minimiser à chaque fois le nombre de souris. Le raffinement des expériences est assuré par la mise en place de points limites pour éviter l'inconfort et la douleur des souris. De plus, toutes les dispositions visant à prévenir le stress (ex : utilisation du Sizzlenests, cycle jour/nuite de 12h) et la douleur (ex : analgésie pour réduire la douleur) seront mises en oeuvre. Les souris seront surveillées quotidiennement par les animaliers pour repérer d'éventuels signes de mal-être ou de blessures. Toutes les semaines ou tous les 10 jours les souris seront pesées et regardées attentivement par la personne menant le projet.

L'objectif de ces travaux de recherche est de comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires conduisant à l'émergence de la myasthénie.

18857 La prévalence de l'obésité est en constante augmentation au niveau mondial. Cette pathologie résulte d'un déséquilibre entre les apports (alimentation) et les dépenses (exercice physique) d'énergie. Une de ses complications majeures est le diabète de type 2, caractérisé par un taux de glucose dans le sang (glycémie) trop élevé, dû à une altération de la sécrétion et/ou de l'effet de l'hormone pancréatique hypoglycémisante, l'insuline. Le GLP-1 (pour glucagon-like peptide-1) est une incréatine, hormone produite par l'intestin qui stimule la sécrétion d'insuline lorsque la glycémie est élevée. Depuis plusieurs décennies, les analogues du GLP-1 sont utilisés comme antidiabétiques, mais leurs mécanismes d'action sur le cerveau sont très mal connus.

Le bulbe olfactif (BO) est une structure cérébrale qui permet d'informer sur la toxicité ou l'aspect agréable des aliments : un mauvais fonctionnement du BO peut entraîner une dérégulation du comportement alimentaire et être impliqué dans le développement de l'obésité.

Notre travail porte sur l'étude de la voie du GLP-1R (récepteur du GLP-1) dans le BO et son implication dans la régulation de l'homéostasie glucidique. Il a été montré que l'activation de cette voie permet d'améliorer la glycémie de souris rendues obèses par une alimentation hypercalorique, en augmentant les quantités d'insuline dans le sang. Des données préliminaires suggèrent que cet effet est consécutif à l'inhibition du système nerveux sympathique, qui est un régulateur négatif de la sécrétion d'insuline. Dans ce projet, nous voulons donc identifier les mécanismes à l'origine de cette augmentation d'insuline plasmatique et caractériser le réseau cérébral et nerveux mis en jeu pour transmettre les effets du GLP-1 dans le BO au pancréas.

Pour faire cette étude, sur une durée de 5 ans, nous avons choisi de travailler sur des modèles murins (chez les invertébrés, il n'y a pas de pancréas, ni de GLP-1) qui nous permettent d'étudier des paramètres sanguins, métaboliques et olfactifs dans un contexte d'organisme entier, in vivo. En nous limitant à un panel statistiquement représentatif, nous aurons besoin de 360 souris. Dans le

but de réduire au maximum le nombre d'animaux employés, nous réutiliserons les mêmes souris pour diverses expériences. Nos protocoles ont été mis au point de façon à veiller au bien-être animal en améliorant leur environnement et en surveillant leur état de santé: notamment nous chercherons à éviter et limiter la douleur et la souffrance, à assurer des soins pré-, per- et postopératoires adéquats, à recourir à l'anesthésie et à l'analgésie, à appliquer les points limites établis préalablement et, enfin, à utiliser les procédures réglementaires et appropriées de mise à mort.

18858 L'hémophilie est une maladie hémorragique héréditaire due à l'absence ou au déficit d'un facteur de la coagulation. L'hémophilie A, la forme la plus répandue qui frappe environ 80% des hémophiles, concerne une naissance sur 5000 et est causée par des mutations sur le gène Facteur VIII (FVIII) portée par le chromosome X (lié au sexe des individus).

La personne hémophile ne parvient pas à former un caillot solide au cours du processus de la coagulation et souffre de saignements spontanés ou incontrôlables après un traumatisme. Les épisodes hémorragiques répétés endommagent durablement les articulations, les os et, sans traitement approprié, la destruction articulaire peut être irréversible. Les hémorragies internes, si elles ne sont pas prises en charge, peuvent être mortelles. Aujourd'hui le traitement consiste à administrer par voie intraveineuse le facteur de la coagulation défaillant plusieurs fois par semaine. Le principal risque est le développement d'anticorps inhibiteurs chez les patients traités, rendant ainsi inefficace ce traitement (30% des cas). Au vu des succès obtenus dans le traitement de l'hémophilie B par thérapie génique, la correction/addition du gène du FVIII dans les cellules souches pourrait représenter une alternative thérapeutique à long terme pour les patients, étant donné qu'une légère hausse du taux de facteur (>1%) suffirait à réduire considérablement la fréquence des saignements et à prévenir l'arthropathie. Plusieurs vecteurs lentiviraux ont été désignés et produits pour exprimer différents transgènes du FVIII dans des lignées cellulaires hématopoïétiques différenciées. Malgré le fait que des études in vitro aient été réalisées sur des cellules murines et humaines pour analyser l'expression du gène thérapeutique, ces modèles in vitro ne peuvent pas reproduire complètement la complexité du système hématopoïétique, notamment les dynamiques de prolifération et différenciation terminale. Il est donc nécessaire de réaliser une étude in vivo afin de caractériser la production du FVIII dans le contexte de l'hématopoïèse physiologique de la moelle osseuse ainsi que les interactions complexes entre les cellules transduites et le système immunitaire. Un essai spécifique pour le FVIII humain nous permettra de mesurer l'expression du transgène dans le plasma murin. Dans ce projet, nous nous servirons que de souris saine (WT) et non pas de souris hémophile, ce qui permet à la fois d'éviter l'utilisation d'animaux malades mais nous permet aussi de réduire le nombre d'animaux utilisé car nous pouvons nous servir de souris mâle et femelle (maladie liée au sexe). De plus, les différents vecteurs ont déjà été testés et caractérisés in vitro ce qui réduit aussi le nombre d'animaux à utiliser dans cette étude (180 souris seront utilisées dans ce projet au lieu de 230). Les procédures expérimentales potentiellement douloureuses (prélèvement sanguin et injection des cellules corrigées) seront effectuées sous anesthésie gazeuse (Isoflurane). Afin de prévenir de possible infections bactériennes après l'irradiation des souris, celle-ci seront traitées avec un antibiotique à spectre large (marbocyl) pendant 20 jours.

18859 La Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC) est une maladie du sang maligne, c'est à dire cancéreuse, qui se traduit par la prolifération anormale d'une cellule du système immunitaire : le lymphocyte B. Elle reste une maladie fréquente avec 4 500 nouveaux cas chaque année. Pour les patients, le traitement, jusqu'ici reposait sur la chimiothérapie et l'immunothérapie. Depuis 5 à 6 ans, de nouvelles possibilités thérapeutiques sont apparues. Parmi celles-ci, on peut trouver les peptides thérapeutiques (séquences de plusieurs acides aminés) qui vont cibler spécifiquement la cellule cancéreuse. Nos précédentes études sur l'efficacité de peptides chez la souris pour le traitement de la LLC nous ont permis de montrer l'efficacité de certains peptides qui permettent de prolonger la survie des souris.

Ce projet s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherche translationnelle et appliquée dans le domaine "cancer humain PT21" (classification européenne). Cette étude est réalisée pour

déterminer la localisation et la distribution d'un peptide chez la souris par imagerie de fluorescence après une injection intraveineuse. Des études précliniques antérieures, réalisées chez la souris, ont démontré l'intérêt thérapeutique de ce peptide pour le traitement de la LLC. Le nombre total d'animaux utilisé dans ce projet est de 14 souris. Le projet comporte deux procédures dans lesquelles les 14 souris seront incluses: une procédure de classe légère et une procédure de classe sans réveil pour la mise à mort par une méthode non réglementaire justifiant une dérogation.

Le déroulé du projet se fera en 3 étapes au cours de la procédure 1, 7 souris recevront une injection intraveineuse de cellules de LLC, puis les 14 souris recevront une injection intraveineuse du peptide suivie d'une série de 8 imageries maximum sous anesthésie générale. La durée maximale de la procédure est de 24h. L'avantage à court terme de cette étude est qu'elle devrait contribuer à la compréhension de ce modèle en nous permettant de voir si la localisation et la distribution du peptide sont différentes ou similaires entre des animaux qui ont injectés avec des cellules de LLC et ceux qui n'ont pas reçu de cellules de LLC. Le bénéfice à plus long terme de l'étude est le développement d'une nouvelle thérapie potentielle, en vue de prolonger l'espérance de vie des patients atteints de LLC.

L'ensemble de ce projet respecte la règle des 3R (principes de remplacement, de réduction et de raffinement). Concernant le principe de remplacement, nous sommes obligés d'utiliser des animaux car l'objectif du travail est de suivre au cours du temps la localisation et la distribution du peptide chez la souris. Le nombre d'animaux a également été réduit au maximum sans compromettre les objectifs du projet (principe de réduction). Le bien-être des animaux est primordial durant ce projet, les souris sont hébergées selon les normes de soins et d'hébergement mentionnées à l'article R. 214-95 du code rural et de la pêche maritime. Elles sont logées en groupes sociaux stables formés d'individus compatibles. Les souris disposent d'un espace suffisant avec des cages répondant à la réglementation et enrichies d'igloos. Les souris, après avoir observé une phase d'acclimatation, sont incluses dans la procédure expérimentale, elles bénéficient d'un suivi quotidien approprié (principe de raffinement).

18860 Les maladies du système nerveux (sclérose latérale amyotrophique (SLA), Parkinson, Alzheimer, Huntington, . . .) sont une préoccupation croissante en santé publique. De nouveaux outils diagnostiques associés à de nouvelles stratégies thérapeutiques sont nécessaires pour améliorer la prise en charge des patients.

La SLA est une maladie extrêmement invalidante et d'évolution rapide, caractérisée par une dégénération des motoneurones de la colonne vertébrale qui conduit à une paralysie progressive fatale. Elle est due à une mutation (anomalie de l'ADN) qui entraîne une mort neuronale, touchant principalement le cortex et les motoneurones de la moelle épinière responsables des mouvements.

Dans un premier temps, nous avons développé une approche de thérapie génique qui consiste en l'administration d'une enzyme impliquée dans le métabolisme du cholestérol au moyen d'un vecteur adéno-associé (AAV) par injection intraveineuse. Cette thérapie se révèle être prometteuse et encourageante dans notre modèle de souris reproduisant fidèlement la maladie.

Nous souhaitons ici investiguer l'importance du métabolisme du cholestérol neuronal dans les motoneurones et évaluer son importance dans la physiopathologie de la SLA.

Pour cela nous souhaitons utiliser des souris wild-type auxquelles nous souhaitons administrer un AAV codant shRNA inhibant une enzyme neuronale cruciale dans le métabolisme du cholestérol.

Le phénotype attendu chez nos souris est une dégénérescence des motoneurones de la moelle épinière ainsi qu'une diminution des capacités motrices.

Dans ce projet, nous souhaitons étudier la survie à long terme ainsi que l'activité physiologique du nerf.

Enfin cette étude sera complétée avec la mise en place de la même procédure sur deux modèles murins de la sclérose latérale amyotrophique.

Remplacement : Pour le réaliser, nous souhaitons utiliser un modèle animal (souris), car aucun modèle in vitro ou de culture cellulaire ne permet aujourd'hui d'étudier les symptômes de perte de la locomotion typique de cette maladie.

Réduction : Enfin, le nombre d'animaux utilisés est optimisé pour obtenir des résultats statistiques. En effet, des travaux précédents ont permis d'établir les doses de virus à injecter, les temps d'analyses. Ils ont également montré que l'étude de groupes de 20 animaux permettait d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. Ainsi, dans ce projet, nous prévoyons un total de 420 souris. De plus, un maximum d'analyses sera réalisé sur les cerveaux et la moelle épinière prélevés pour éviter des doublons des procédures expérimentales.

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

Raffinement : En cas d'observation de la moindre douleur, les souris recevront un traitement analgésique et anti-inflammatoire, et si cette douleur devait persister, les animaux seraient euthanasiés pour éviter toute souffrance. De l'hydrogel pourra être mis à disposition des souris en cas de difficulté à se nourrir, et les souris seront euthanasiés si leur perte de poids est supérieur à 20% de leur poids d'origine.

18861 En dépit des efforts réalisés ces dernières années dans la validation de nouvelles cibles thérapeutiques. Leurs échecs restent fréquents pour le traitement du cancer. Pour éviter ceci, il faut impérativement comprendre les mécanismes de résistances impliqués et développés des modèles précliniques plus pertinents. Il existe donc aujourd'hui un consensus selon lequel l'amélioration de nos systèmes d'évaluation passe par la mise au point de modèles in vivo mieux caractérisés et plus proche des pathologies cancéreuses étudiées. Les greffes de tumeurs humaines chez la souris permettent de conserver les caractéristiques de celle-ci à la fois d'un point de vue histologique, moléculaire et pharmacologique.

Les thérapies ciblées, médicaments qui bloquent des mécanismes spécifiques des cellules cancéreuses, ont connu un grand succès dans de multiples indications. Cependant, la cellule tumorale acquiert une résistance à ces thérapies et la maladie progresse dans les 5-7 mois. La compréhension des mécanismes de résistance est donc d'un enjeu majeur. L'obtention de modèle in vivo est essentielle pour comprendre ces mécanismes et pour identifier de nouvelles stratégies capables de reverser ces résistances. Un projet clinique initié il y a 6 ans a pour but d'étudier les mécanismes de résistance. A l'aide d'analyse génétique à haut débit nous étudierons sur une large cohorte de patients les mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance. En plus de l'étude de ces mécanismes, l'objectif est de développer des modèles précliniques ayant acquis une résistance à une thérapie innovante. A ce jour nous avons développé 80 modèles précliniques permettant de trouver de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Nous avons prévu d'utiliser un maximum de 4360 souris immunodéprimées pour le projet. Ce nombre se justifie par le fait que le développement de modèles est un processus à plusieurs étapes : -La primo-greffe de 250 patients (1000 souris) -Etablissement des modèles jusqu'à P2 (640 souris)- Pression de sélection avec la thérapie de résistance et biobank P3 à P5 (2400 souris), et -décongélation (300 souris). Pour chacun des modèles développés, des lignées cellulaires ou organoïdes seront générés à partir des PDX afin de permettre des explorations fonctionnelles et des tests pharmacologiques à hauts débits. Les résultats ainsi obtenus permettront de sélectionner les meilleurs médicaments à tester in vivo et ainsi de réduire le nombre d'animaux utilisés. Pour le bien-être animal, nous prévoyons pour tout acte pouvant engendrer un stress ou une douleur, l'utilisation d'anesthésie et d'analgésique. Afin de réduire le stress de l'animal, l'environnement sera enrichi. Ces modèles générés constitueront des outils très importants pour aider les chercheurs et les médecins à comprendre et lutter efficacement contre le cancer.

18862 Ce projet se résume à l'administration de produits pharmaceutiques humains ou vétérinaires par différentes routes d'administrations à des chiens ou des mini-porcs afin de permettre de décrire le comportement et le devenir du produit dans un organisme vivant. Classiquement il s'agit de

modéliser son absorption, sa distribution dans l'organisme, son métabolisme c'est à dire comment l'organisme procède à sa transformation et enfin à son élimination. Ce projet fait partie des dossiers présentés aux autorités.

L'évaluation pharmacocinétique et pharmacodynamique d'un ou de plusieurs composés administrés se fait généralement à des doses pharmacologiques et avec l'ensemble des voies administrations utilisées chez l'homme ou l'animal pour les produits vétérinaires. Cependant, les doses toxicologiques peuvent être utilisées pour déterminer l'exposition du produit suite à l'administration de doses toxicologiques. Des prélèvements sanguins, tissulaires, de feces, urinaires ou/et de fluides corporels seront réalisés à différents temps. Ces prélèvements biologiques sont analysés par différentes techniques afin de déterminer les niveaux du ou des composés administrés, de leurs métabolites et/ou des marqueurs pharmacologiques au cours du temps pour définir l'exposition d'un organisme vivant au produit administré et à ces métabolites ainsi que leurs effets pharmacologiques.

L'évaluation de l'absorption, de la distribution, du métabolisme et de l'élimination d'un produit dans un organisme vivant ne peut pas être réalisée in vitro. Seule l'observation sur un organisme vivant dans son ensemble permet d'évaluer les différentes phases d'absorption, de métabolisme, de distribution et d'élimination du composé, de définir les relations et/ou interactions entre ces différentes phases et de pouvoir déterminer l'exposition du composé ou de plusieurs composés administrés dans l'organisme. Le nombre d'animaux sur 5 ans est estimé à maximum 300 chiens et 50 mini-porcs. , soit un total de 350 animaux maximum sur 5 ans. Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés, certains animaux peuvent être utilisés plusieurs fois pour tester différents produits à condition de respecter une période de repos et sous réserve de l'avis favorable du vétérinaire sanitaire.

Les espèces chiens et mini-porc sont couramment utilisées pour ce type de procédure et sont acceptés par les autorités réglementaires. Le chien et le mini-porc sont utilisés pour l'évaluation de produits pharmaceutiques humains et vétérinaires. Le nombre d'animaux est optimisé en utilisant si possible un seul sexe, le minimum d'animaux pour obtenir des résultats statistiquement fiables et pour répondre aux objectifs du projet.

Les chiens sont hébergés en groupe par défaut, conformément à la Directive 2010/63 avec enrichissement et sur litière. Les mini-porcs peuvent être hébergés individuellement avec enrichissement et sur litière en raison de l'incompatibilité sociale fréquente des porcs et mini-porcs matures. Les chiens peuvent être hébergés individuellement avec enrichissement uniquement pour permettre de faire les bilans d'élimination en collectant les urines et féces ou pour certaines voies d'administration.

L'état de santé des animaux est contrôlé tous les jours et évalué par rapport à des points limites définis de façon à éviter un inconfort/souffrance prolongé. Certains prélèvements biologiques et voies d'administration sont réalisés sous anesthésie et/ou analgésie afin d'éviter tout inconfort et souffrance. Si nécessaire, un vétérinaire peut intervenir, mais si la souffrance d'un animal est jugée trop importante et si aucun soin ne peut lui être apporté, il sera euthanasié selon une procédure éthiquement acceptée.

18863 Aujourd'hui, l'industrie des biomédicaments, tels que les anticorps monoclonaux est en plein essor. En effet leur utilisation a complètement modifié la prise en charge des patients atteints de cancers, de maladies auto-immunes et/ou inflammatoires. Ces anticorps thérapeutiques offrent un vrai potentiel pour le traitement des maladies respiratoires, notamment des infections respiratoires qui représentent 13% des décès en Europe et un coût important pour la société avec 6 millions d'hospitalisations chaque année.

A l'heure actuelle, les anticorps (Ac) disponibles sur le marché sont majoritairement administrés par voie intraveineuse (i. v). Dans le contexte des pathologies respiratoires, la voie i. v n'est pas optimale pour que les Ac atteignent leur cible dans les poumons. De nouvelles stratégies thérapeutiques sont donc nécessaires pour améliorer l'administration et in fine l'efficacité des Ac. Nos travaux antérieurs ont permis de démontrer que la voie pulmonaire permettait, pour les Ac

entiers, d'obtenir une réponse thérapeutique efficace dans différents modèles animaux de pathologies respiratoires. Néanmoins, nos données préliminaires suggèrent que la voie pulmonaire serait associée à une immunogénicité accrue. Cette immunogénicité qui se caractérise par le développement d'anticorps contre les Ac thérapeutiques (anti-anticorps ou ADA), pourrait altérer le profil pharmacocinétique et l'efficacité des Ac, ce qui est particulièrement préjudiciable, notamment dans le cadre d'une administration répétée. Des études précliniques solides sont donc nécessaires pour mieux comprendre l'immunogénicité de la voie pulmonaire pour les anticorps thérapeutiques et la comparer à celles d'autres voies d'administration.

Pour notre projet, nous utiliserons un anticorps anti-infectieux dirigé contre la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (PsA), responsables d'infections pulmonaires, et nous nous attacherons à comparer l'administration par voie pulmonaire à la voie intraveineuse (i. v). Nous évaluerons l'immunogénicité, le profil pharmacocinétique et l'efficacité thérapeutique selon ces deux voies d'administrations. Le projet fait intervenir 5 procédures et un total de 7109 animaux sur 3 ans.

Ce projet expérimental répond aux exigences des 3R, à savoir :

Raffiner : les souris seront élevées en communauté dans des cages comprenant des éléments d'enrichissement (sous la forme de papier, de fragments de boîte à œuf ou de tunnels en PVC). L'ensemble des procédures sera réalisée de manière à limiter la souffrance des animaux (anesthésie,...).

Remplacer : les modèles *in vitro* ne permettent pas de modéliser la complexité de la réponse immunitaire d'un organisme entier, face à l'administration de thérapeutiques et l'impact de la voie d'administration. Ils sont aussi insuffisants pour envisager des essais cliniques chez l'Homme. Les modèles murins d'infection pulmonaire à PsA sont bien décrits et permettent de mimer le phénomène observé chez l'Homme.

Réduire : le modèle d'infection à PsA est maîtrisé par l'équipe et le porteur de ce projet, ce qui permet de limiter les étapes de mises au point. De plus, les expériences sont organisées dans un ordre précis, avec des témoins choisis de sorte à limiter la répétition d'expériences. La souris est l'espèce modèle la plus adaptée pour ces études précliniques et le couple modèle infectieux immunocompétent-anticorps thérapeutique de la même espèce permettent d'envisager des études d'immunogénicité pertinentes.

18864 La qualité sanitaire des aliments est une préoccupation majeure en France et en Europe. L'homme et les animaux sont potentiellement exposés à certains contaminants toxiques comme les mycotoxines, présents dans les aliments. Le porc est un modèle de choix pour étudier les effets de ces contaminants sur la réponse immunitaire. Il est naturellement exposé aux mycotoxines de par son alimentation riche en céréales et il est l'une des espèces les plus sensibles à ces contaminants. D'autre part, ses similitudes avec l'homme au niveau digestif et immunitaire en font un bon modèle pour évaluer chez l'homme les conséquences de la consommation de nourriture contaminée. Enfin, l'étude chez le porc des effets de compléments alimentaires ayant pour objectif de remédier aux effets délétères de certains contaminants présente également un intérêt certain.

Nous souhaitons évaluer *in vitro* l'effet des mycotoxines, d'autres contaminants ou de compléments alimentaires sur différents types de cellules immunitaires (neutrophiles, lymphocytes, monocytes, cellules dendritiques. . .) isolées à partir de prélèvements sanguins réalisés sur animaux vivants. Ces effets peuvent être évalués à différents niveaux comme celui de l'expression de gènes, de protéines ou de marqueurs spécifiques des capacités fonctionnelles des cellules (prolifération, activation métabolique, production de cytokines, production d'immunoglobulines).

L'utilisation d'un modèle animal vivant est indispensable pour obtenir les cellules destinées à évaluer les effets de contaminants ou compléments alimentaires sur la santé immunitaire. Il permet de s'affranchir des biais liés à l'utilisation de lignées cellulaires.

Les procédures seront conduites dans le respect de la règle des 3R. Les travaux sur les cellules sanguines isolées contribuent à la réduction du nombre d'animaux. Six animaux par expérimentation permettent de prendre en compte la variabilité inter-individuelle. En effet, le prélèvement de sang maîtrisé permet des mesures répétées sur un même individu. Il permet un

screening de nombreuses conditions ainsi que la comparaison des effets observés sur différents types de cellules immunitaires isolées à partir d'un même prélèvement. De plus, dans chaque expérimentation, chaque condition de traitement peut être comparée à la situation contrôle non traitée, issue du même animal.

Les animaux seront hébergés dans des conditions d'alimentation et d'environnement classique. Les conditions de logement prennent en compte des mesures de raffinement (boîtes enrichies par des tapis et des jouets en caoutchouc, surveillance, points limites de prise alimentaire et de poids et arrêt du prélèvement en cas de souffrance ou de stress, contacts positifs avec les animaux avec apprentissage, soins vétérinaires appropriés si besoin). Les porcs sont logés à 3 par box pour limiter le stress et ont un accès permanent à l'eau et à la nourriture. Les prélèvements de sang sont réalisés dans des conditions de contention qui génèrent un minimum de stress dans le respect de la réglementation sur les volumes maximums autorisés et les périodes de récupération entre chaque prélèvement.

Par ailleurs, dans le contexte de la réduction du nombre d'animaux de laboratoire prévu par le principe des 3R, la culture d'explants d'organes représente une alternative particulièrement intéressante. Cette méthode permet d'obtenir plusieurs dizaines d'explants à partir d'un seul animal, réduisant ainsi le nombre d'animaux nécessaires pour une étude donnée. La structure histologique du tissu est préservée ex vivo et l'exposition aux toxines ou à des compléments alimentaires permet d'évaluer leurs effets au niveau histomorphologique ou moléculaire (expression des gènes ou des protéines).

Pour les différents projets envisagés dans les 5 ans à venir, 90 animaux seront nécessaires. Si en fin d'expérimentation, certains animaux ne sont pas utilisés, ils seront, dans la mesure du possible, remplacés par le biais d'une association comme le GRAAL.

18865 Des mutations d'un gène chez l'homme sont à la base d'une maladie génétique osseuse rare appelée Chérubisme qui se traduit par des déformations de la mâchoire et de la dentition. Des modèles de la maladie Chérubisme chez la souris ont permis de montrer que ces mutations altèrent l'activité normale d'une protéine qui amplifie la réponse aux agents infectieux des globules blancs, entraînant une inflammation chronique responsable des déformations observées. Cependant, les mécanismes exacts de cette inflammation pathologique sont encore mal connus.

Notre projet de recherche consiste à développer des lignées de souris porteuses de la mutation génétique responsable de la maladie Chérubisme et/ou déficientes pour des protéines nécessaires au développement de l'inflammation et cela dans le but de mieux comprendre les processus pathologiques à l'origine du Chérubisme chez l'homme. En parallèle, la caractérisation de l'effet anti-inflammatoire de molécules médicaments ciblant l'inflammation dans le modèle pré-clinique de Chérubisme chez la souris pourrait conduire à proposer de nouvelles thérapies dans cette maladie génétique rare.

Pour satisfaire au Remplacement, nous réaliserons des études préliminaires in vitro sur des lignées cellulaires de macrophages. Cependant, il nous est nécessaire de réaliser des études in vivo car les études in vitro ne permettent pas de reproduire les interactions complexes qui existent entre les différents organes et entre les différents types cellulaires au cours de l'inflammation.

Pour satisfaire à la Réduction, nous utiliserons indifféremment des animaux mâle et femelle et nous utiliserons des tests statistiques pour limiter au plus juste le nombre d'animaux nécessaires à la réalisation de nos expériences.

Pour satisfaire au Raffinement, nous serons particulièrement attentifs à tout changement physique ou de comportement. Leur bien-être sera scrupuleusement pris en compte dans toutes les procédures en terme de conditions d'élevage (température, hygrométrie), d'hébergement enrichi (présence de tige en coton et d'igloo dans les cages) et de soins afin de réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommages durables que pourraient ressentir les animaux. Le suivi sanitaire quotidien assuré par les animaliers auquel s'ajoutent les visites régulières des expérimentateurs nous permettra de détecter précocement tout signe de stress ou de douleur et d'appliquer les points limites que nous avons définis pour chaque procédure. Pour l'ensemble des

procédures, et pendant la durée de l'expérience, les souris seront pesées 3 fois par semaine et l'apparition d'un phénotype inflammatoire caractéristique du Chérubisme sera estimée de manière semi-quantitative selon une grille de score établie à partir de nos observations précédentes. Le point limite sera l'apparition d'un phénotype inflammatoire au score élevé, qui dans tous les cas se traduira par l'euthanasie des animaux. De même, on notera toute modification physique et toute variation anormale de poids qui ne devra pas être supérieure à 10% du poids de la semaine précédente, ou des signes de douleur qui conduiront à l'euthanasie des souris. Si un animal est prostré ou arrête de se nourrir et/ou de boire, une séparation avec une mise à disposition de croquettes humides et d'eau gélifiée dans la litière sera réalisée. Si pas d'amélioration après 24 heures, l'animal sera sacrifié. Si une plaie est présente, une séparation et une application quotidienne pendant 3 jours de Vétédine seront réalisées. Si pas d'amélioration après 3 jours, l'animal sera sacrifié.

Notre projet comprend deux procédures nécessitant un total de 920 animaux.

18866 Chez les mammifères, l'horloge biologique principale est située dans le cerveau et est responsable des rythmes biologiques circadiens. Cette horloge est synchronisée au cycle lumière-obscurité. De nombreuses études ont établi une corrélation entre les perturbations du cycle veille-sommeil et l'apparition de troubles métaboliques (obésité et diabète, troubles cardio-vasculaires) et psychiatriques (addiction, anxiété et dépression). Dans ce projet nous nous intéressons au cas particulier des conséquences sur la santé du jetlag social, phénomène caractérisé par des horaires de levé-coucher plus tôt la semaine que le week-end et expérimenté par environ 70% de la population.

Au sein de notre laboratoire nous avons développé un modèle chez la souris qui mime cette condition de jetlag. Le protocole consiste à retarder le week-end le cycle lumière-obscurité auxquels sont exposés les animaux, et ce pendant plusieurs semaines. Nos premières études montrent qu'exposés à ce protocole de jetlag, les souris présentent des effets semblables à ceux observés chez l'humain, à savoir un décalage du rythme veille-sommeil, une mauvaise qualité de sommeil et des troubles d'ordre émotionnels. Parmi ces troubles émotionnels, les animaux en jetlag présentent un comportement pouvant s'apparenter à une « prise de risque », phénomène observé aussi chez l'humain en dette de sommeil qui est observable en condition de jetlag social.

Le but du projet est d'évaluer ce comportement de prise de risque des animaux soumis au protocole de jetlag par un test qui a été validé expérimentalement. Ce test consiste à placer l'animal dans une situation conflictuelle, à laquelle sont confrontés les animaux dans leur milieu naturel, celle d'aller trouver une nourriture face à un risque de prédation. Basé sur l'aversion innée des souris pour les odeurs que dégagent leurs prédateurs (chat, renard ou rat), les souris devront traverser un compartiment avec une odeur de renard pour aller consommer une nourriture très appétente.

Ce projet utilisera au total un nombre maximal de 60 animaux et durera maximum 4 ans. L'effectif a été déterminé dans le respect des règles statistiques en vigueur et de manière à obtenir une bonne reproductibilité des résultats. En ce qui concerne le raffinement, les animaux sont hébergés à plusieurs avec du matériel d'enrichissement (nids en coton, bâtons à ronger). Les animaux sont suivis quotidiennement. Concernant le remplacement, il s'agit ici d'une mesure comportementale et nécessite donc une approche in-vivo.

18867 Ce projet porte sur le développement et l'optimisation de transfert de gènes par l'utilisation de vecteurs synthétiques innovants dans le cadre de stratégies de thérapies géniques appliquées au traitement de myopathies comme la myopathie de Duchenne. Nous souhaitons ici évaluer l'efficacité du transfert de gènes in vivo de formulations préalablement testées de façon approfondie en condition in vitro. Nos investigations nous ont permis de sélectionner différentes formulations représentant les candidates les plus intéressantes à tester au niveau des cellules musculaires chez la souris. L'une des méthodes employée dans certaines études concernant la myopathie de Duchenne est une méthode hydrodynamique qui consiste en l'injection d'un volume de l'ordre de 1 mL de solution médicament par membre traité (chez la souris). Cette méthode est donc localisée (locorégionale) au niveau des membres inférieurs et n'impacte pas le reste de l'organisme. Au cours

de ce projet un nombre total de 30 souris (15 souris de deux souches différentes) sera utilisé. Pour chaque souche, ce nombre se répartit comme suit : 3 lots de 5 souris qui auront les différentes formulations (comprenant une formulation contrôle). Ce projet se divise en trois procédures. La première est de classe modérée puis elle est suivie d'une procédure de classe légère. Enfin la dernière procédure est dite de classe sans réveil. L'administration se fait sur les deux membres postérieurs de chaque animal. Le suivi des animaux se fait par imagerie de bioluminescence et/ou fluorescence car ces méthodes permettent de limiter le nombre d'animaux nécessaires en permettant d'effectuer un suivi longitudinal (animal suivi sur plusieurs jours; plusieurs mesures peuvent donc être réalisées sur un même animal) et ainsi d'éviter la mise à mort d'animaux superflus. De plus, toutes les séances d'imagerie sont réalisées sous anesthésie. Enfin, une imagerie par résonance magnétique (IRM) pourra être effectuée sur chaque souris à la fin du protocole expérimental. Ce projet s'inscrit dans le respect de la règle des 3R. Dans le cadre du remplacement, toutes nos expérimentations sont précédées d'une phase de test in vitro permettant de ne retenir que les molécules présentant les meilleures chances de succès. La réduction du nombre d'animaux est au maximum, sans mettre en péril l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Ces expérimentations sont indispensables pour optimiser nos protocoles et nous permettre de faire un lien entre les résultats obtenus in vitro et un éventuel développement clinique. Le raffinement sera assuré notamment par des phases d'acclimatation, un enrichissement de l'environnement, un suivi quotidien des animaux ainsi qu'une gestion de la douleur suivant une échelle stricte et des points limites bien établis.

18868 CONTEXTE : Notre étude s'intéresse aux mécanismes d'ajustement mis en place par les poissons face au changement global, et en particulier face à la diminution de disponibilité alimentaire en acides gras oméga 3 dans le réseau trophique, combinée à une hausse de température.

Les acides gras oméga 3 sont les composants majoritaires des membranes cellulaires de tous les organismes, y compris les poissons. Ils jouent ainsi un rôle essentiel dans le maintien des fonctions physiologiques vitales (e. g. croissance, maturité sexuelle, fonction cardiaque, locomotion...).

En milieu naturel, ces oméga 3 sont produits majoritairement par les microalgues marines qui sont consommées par le zooplancton, lui-même consommé par les poissons, assurant ainsi le transfert de ces molécules le long de la chaîne trophique. La disponibilité des oméga 3 dans la chaîne trophique n'a pas contraint les poissons marins au cours de l'évolution à devoir les synthétiser. En revanche, les poissons d'eau douce évoluant dans un environnement trophique moins riche en oméga-3 (peu de microalgues productrices) ont conservé la capacité de produire des oméga-3 à partir des précurseurs présents dans leur alimentation.

La capacité des poissons euryhalins (qui tolèrent une large gamme de salinité, et sont donc retrouvés en eau marine et douce), comme le bar européen *Dicentrarchus labrax*, à activer ou désactiver ces voies de synthèse des oméga 3 reste mal comprise.

En milieu marin, la production en acides gras oméga 3 varie selon les espèces et la physiologie des microalgues. Une modification de la composition des microalgues par le changement climatique pourrait conduire à une diminution globale de la production d'oméga 3, et donc à une diminution du transfert de ces molécules le long de la chaîne trophique. Cette diminution de disponibilité en oméga 3 dans l'alimentation pour les poissons, associée aux faibles capacités de synthèse des poissons marins peut avoir de lourdes conséquences sur leurs fonctions physiologiques et comportementales.

De plus, chez les organismes ectothermes (dont la température du corps reflète celle du milieu) tels que les poissons, les hausses de température induites par le changement climatique modifient la structure en acides gras des membranes cellulaires. Cet effet de la température, couplée à une diminution en oméga 3 dans l'aliment est susceptible d'altérer d'autant plus la composition en acides gras des membranes cellulaires des poissons.

La compréhension de ces effets combinés (température et disponibilité des oméga 3 dans la chaîne trophique) sur la physiologie et le comportement des poissons est un enjeu important pour la

prédiction de l'évolution des stocks de poissons, de leur contenu en oméga 3, et de l'approvisionnement en oméga 3 pour l'homme.

Dans ce projet, nous posons la question de savoir comment les poissons pourraient s'ajuster physiologiquement à ces changements environnementaux, et si cette capacité d'ajustement dépend du milieu d'origine des individus. Ce projet contribue à la nécessité de tenir compte de la capacité, peu ou pas considérée, des organismes à s'ajuster physiologiquement (plasticité) à leur environnement, dans les modèles prédisant les réponses des écosystèmes au changement global.

OBJECTIF : L'objectif est d'évaluer les ajustements physiologiques et comportementaux face à un scénario futur couplant une baisse en oméga-3 dans l'alimentation et une hausse de température des océans chez un poisson euryhalin d'une grande importance écologique et économique, le bar Européen *Dicentrarchus labrax*. Ce modèle présente aussi l'intérêt de pouvoir être maintenu facilement dans des structures expérimentales.

Nous utiliserons 240 individus juvéniles de première année, issus de deux environnements naturels différents par leurs conditions physico-chimiques et d'alimentation en terme d'oméga 3 disponibles (estuaires de la Loire et de la Seine); ceci afin de comparer l'effet du milieu d'origine (en particulier température et qualité de l'alimentation) sur les ajustements mis en place. A leur arrivée au laboratoire, les 240 individus (120 par estuaire) seront marqués individuellement (marquage électronique sous-cutané). A l'issue d'une période d'acclimatation aux structures expérimentales, ils seront conditionnés pendant 5 mois à 4 scénarios combinant deux températures et deux teneurs d'oméga 3 dans l'alimentation, qui sont des pratiques de zootechnie acquises au niveau de l'établissement. Les aliments testés (carencé et contrôle) sont isolipidiques et isoprotéiques et ne diffèrent que par leur teneur en oméga 3 établie selon les besoins du bar juvénile. Ce type d'aliment déjà utilisé par le passé n'entraîne pas de pathologies ni de diminution du taux de survie.

Sur chacun des lots, nous suivrons :

-La croissance : Le taux de croissance individuel avec des biométries bimensuelles

-Le comportement : le comportement de nage, l'évitement des prédateurs

-L'activité métabolique au repos et lors d'un effort

-La capacité de synthèse des oméga 3 des individus par la mesure, au début (par biopsie musculaire, n=240), et à l'issue de l'expérience (sang, foie, muscle, cerveau), de leur composition en oméga 3, et par l'évaluation des mécanismes moléculaires (expression de gènes) à l'origine de cette synthèse d'acides gras.

Le projet sera organisé en 2 procédures (n=120 individus par procédure) :

Procédure 1 : Respirométrie et test de nage

Procédure 2 : Test de fuite

PRINCIPES ÉTHIQUES : Notre étude répond aux critères des 3R :

Remplacement : Dans le cadre d'une étude destinée à caractériser le résultat d'interactions complexes entre différents tissus et fonctions, il n'est pas possible de faire appel à des méthodes de remplacement. En effet, les processus étudiés s'appliquent à l'organisme vivant, dans son intégrité et toute sa complexité.

Réduction : le nombre de poissons a été réduit au minimum et défini au seuil de la pertinence scientifique et statistique, compte-tenu de l'étendue de la variabilité interindividuelle des processus étudiés dans cette étude.

Raffinement : Les mesures de raffinement tiennent compte des contraintes zootechniques et notamment de la densité minimale d'animaux requise pour permettre aux animaux d'exprimer les meilleurs répertoires physiologiques et comportementaux possibles. Lors du marquage, des biopsies, et prises de sang, les poissons seront anesthésiés. Afin de favoriser une récupération rapide de la biopsie, une incision de la peau permettra au punch à biopsie d'atteindre le muscle sans enlever de peau. Pour la mesure des taux métaboliques et le test de nage, l'ensemble du montage expérimental sera placé derrière un rideau. Le niveau d'oxygénation du respiromètre sera contrôlé en permanence et ne descendra pas en dessous de 75% de saturation en oxygène,

considéré comme la limite de la normoxie. Les animaux seront en surveillance permanente. Ils seront retirés de la procédure dès que le point limite sera atteint. Les points limites sont identifiables à travers le comportement des poissons (activité de nage anormale), la perte de poids ou des signes extérieurs de stress (couleur de peau, plaies). Pour le test de fuite, le poisson sera complètement isolé de l'environnement extérieur, et son comportement sera observé en permanence par vidéo.

18869 Les leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) touchent près de 3 personnes sur 100 000 par an en France. Malgré les traitements (chimiothérapies ou greffes de cellules souches hématopoïétiques) et une rémission dans 50 à 80% des cas, les cellules leucémiques persistent chez l'hôte sous forme de maladie résiduelle minimale (MRD) et sont responsables des rechutes à plus ou moins long terme. Les études visant à déterminer les mécanismes conduisant à cette persistance tumorale dans différents modèles animaux de tumeurs solides font état de la participation de la réponse immunitaire.

Les seuls modèles à notre disposition aujourd'hui, outre les modèles animaux expérimentaux, sont des lignées cellulaires leucémiques de patients. Dans le cadre de la LAM et de la MRD leucémique, le remplacement du modèle animal par des modèles de culture cellulaire en trois dimensions s'avère difficile car ces derniers ne permettent pas de recréer un microenvironnement médullaire et une dynamique de la réponse immunitaire favorables à la persistance des cellules leucémiques. De plus, il a été montré que les propriétés phénotypiques et fonctionnelles de ces lignées diffèrent in vitro et in vivo d'où la nécessité d'induire et d'étudier directement la leucémie chez l'animal pour son étude.

Nous disposons, depuis quelques années, au laboratoire d'un modèle animal expérimental de LAM basé sur l'injection d'une lignée leucémique C1498 à des souris syngéniques (C57BL/6J) ou congéniques. Le nombre de cellules à injecter, les voies d'injection et la cinétique de la maladie ont été bien décrits dans la littérature ce qui nous a permis de réduire le nombre d'animaux pour cette étude. Nous avons également récemment mis en place un modèle de MRD leucémique après traitement par chimiothérapie (cytarabine) des souris leucémiques qui conduit à la survie d'environ 55% d'entre elles. Les souris développent la LAM ou survivent à la chimiothérapie de façon reproductible ce qui réduit la variabilité entre les expériences permettant de réduire le nombre d'animaux à 1314 pour ce projet.

Les souris sont hébergées en environnement SPF avec enrichissement des cages et manipulées calmement afin de réduire leur stress. Elles sont injectées par voie intra-veineuse au niveau de la queue avec les cellules leucémiques puis 10 jours après avec l'agent de chimiothérapie (cytarabine) par voie intra-péritonéale. L'injection des cellules leucémiques et de la chimiothérapie n'entraîne pas de douleur ou de souffrance des animaux et permet la survie de plus de la moitié (environ 55%) des souris leucémiques. Elles sont surveillées régulièrement dès le lendemain des injections puis quotidiennement dès le 25ème jour jusqu'à l'apparition des premiers signes de souffrance de la maladie. En effet, les premiers signes de la LAM (poil hérissé, animal postré et isolé dans le coin de la cage, paralysie possible des membres postérieurs) sont visibles entre 34 et 45 jours post-injection de 100 000 cellules et représentent un seuil d'arrêt de l'expérimentation. Chaque souris est alors euthanasiée individuellement.

Grâce à ces deux modèles animaux, nous analyserons au cours de la LAM et de la MRD leucémique :

- 1) les cellules leucémiques (analyses génétiques),
- 2) le rôle des cellules du système immunitaire (lymphocytes T, cellules NK, cellules myéloïdes) présentes dans les organes lymphoïdes (moelle osseuse, ganglions lymphatiques, rate). En effet, les données de la littérature, réalisés dans des modèles murins expérimentaux de tumeurs solides, soulignent que ces dernières ainsi que les cytokines de type Th1 qu'elles produisent pourraient jouer un rôle dans la persistance des cellules tumorales.

18870 L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une pathologie humaine grave. Cette pathologie est due à une prolifération des cellules musculaires lisses des artères pulmonaires et par voie de conséquence une augmentation de la pression sanguine.

Le seul traitement efficace contre une HTAP grave est la transplantation pulmonaire chez le patient. Actuellement, il n'existe aucun traitement chimique disponible pour traiter des HTAP graves.

Notre objectif est de définir de nouvelles stratégies thérapeutiques de l'HTAP en se basant sur l'hypothèse que la pression artérielle pulmonaire engendre un stress mécanique de ces cellules musculaires lisses et une ouverture du canal ionique mécano-sensible nommé Piezo1. Ainsi, pour traiter l'HTAP, nous ciblerons l'inhibition de l'activité de ce canal et par conséquent la réduction de la prolifération de ces cellules vasculaires.

Pour ce faire, on utilisera un modèle expérimental d'hypoxie qui engendre l'HTAP chez des animaux normaux et génétiquement modifiés pour le gène Piezo1.

Le nombre total pour notre projet est de 192 souris pour une durée de 3 ans.

Notre modèle expérimental ne peut être réalisé que sur des animaux et ne peut pas être actuellement remplacé par des tests alternatifs pour l'étude des effets explorés.

Tous ces animaux auront un suivi tout au long des expériences pour éviter leur souffrance comme la perte de poids ou la difficulté à respirer. Afin d'enrichir le milieu des animaux, nous leur rajoutons des bâtonnets de bois, du coton, et des maisonnettes.

18871 L'oxaliplatine est utilisée en chimiothérapie dans le cadre du traitement du cancer colorectal. Cette molécule entraîne chez les patients de nombreux effets indésirables, notamment une atteinte des nerfs périphériques. Nous avons récemment montré, sur un modèle murin, que l'administration d'oxaliplatine induisait une atteinte subtile de la fonction auditive. En effet, nous avons pu mettre en évidence une dégénérescence d'une catégorie de fibres nerveuses auditives sans être associée à une atteinte des cellules neurosensorielles de l'oreille interne. Il n'y a donc pas de perte auditive, pas d'ototoxicité comme décrite avec d'autres molécules. Néanmoins, cette atteinte neurale n'est pas sans conséquence, et elle est identifiée sous la terminologie de « neuropathie auditive ». En effet, les patients présentant des neuropathies auditives se plaignent de ne plus comprendre leurs proches, leurs interlocuteurs dans un contexte de repas de famille ou de réunion. Les propositions de réhabilitations de l'audition avec des aides auditives (amplifiant les sons) sont sans succès, car il n'y a pas à proprement parlé de surdité mais un mauvais codage neural.

Il est donc indispensable de développer de nouveaux protocoles d'exploration électrophysiologique auditif permettant de mettre en évidence cette atteinte subtile. Ceci autorisera également à court terme l'évaluation 1) d'approche préventive avec l'administration de molécules neuroprotectrices et 2) dans une situation pathologique de neurodégénérescence extrême, l'efficacité de réhabilitation par l'implant cochléaire, seule neuroprothèse actuellement efficace qui stimule plus précisément le nerf auditif.

Le recours à l'animal demeure indispensable pour la modélisation et l'étude de la complexité des mécanismes la physiologie auditive et neurale et du décryptage des processus physiopathologiques qui se mettent en place chez les patients (règle des 3R « remplacer »).

Si la souris ou le rat sont des modèles de prédilection des études expérimentales, le cobaye est un modèle animal plus fidèle de la physiologie de la fonction auditive humaine. En effet son spectre auditif et sa physiologie neurale auditive sont superposables à ceux retrouvés chez l'Homme. De plus, l'anatomie de son oreille interne autorise également l'utilisation d'implant cochléaire quasiment identique à ceux utilisés en clinique humaine.

Nous souhaitons donc répliquer -chez le cobaye- nos données obtenues chez la souris concernant l'étude de l'impact de l'administration de l'oxaliplatine. Parallèlement, ceci nous permettra de mettre en place et de valider des tests électrophysiologiques non invasifs qui pourront rapidement (car ne nécessitant qu'une simple adaptation de matériel) être transposables auprès des patients. Chez l'animal anesthésié (règle des 3R « raffiner » = anesthésie gazeuse pour éviter tout mouvement et de courte durée car de moins de 15min), ces tests électrophysiologiques auditifs non invasifs ne

nécessitent que le positionnement de 3 fils électrodes intradermiques (au niveau de la mastoïde, du vertex et entre les omoplates) pour recueillir les réponses électrophysiologiques auditives évoquées par un écouteur délicatement positionner au niveau du conduit auditif externe (tests validés dans la littérature scientifique ; règle des 3R « raffiner » = caractère mini-invasif).

L'examen de la littérature scientifique ne permet de pouvoir répliquer un protocole d'administration de l'oxaliplatine chez le cobaye. Nous adapterons donc le protocole d'injection de l'oxaliplatine précédemment utilisé dans notre étude chez la souris (3mg/kg, 2 injections par semaine en intrapéritonéale, pendant 3 semaines). Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés (règle des 3R), nous appliquerons une méthodologie par bloc d'animaux (n=6 par groupe de traitement : contrôle, oxaliplatine 1 mg/kg, 2 mg/kg et 3 mg/kg ; injection en intrapéritonéale ; soit un nombre total de 24 animaux). Ceci permettra des analyses intermédiaires et le cas échéant d'interrompre les analyses en cas de significativité avant un nombre maximal de n=9 animaux par groupes de traitement (soit un nombre total de 36 animaux). Les animaux seront stabulés dans des conditions standards, minimum 2/ maximum 3 animaux par cage, dans une salle climatisée et auront un libre accès à la boisson et à la nourriture tout au long des expérimentations. Des tubes PVC et des cartons seront déposés dans les cages pour l'enrichissement. Tous les animaux bénéficieront d'un suivi quotidien (manipulation, mesure du poids) et tout signe de souffrance entraînera l'écartement de l'animal concerné de l'étude. A l'issue du projet les animaux seront euthanasiés pour réaliser des prélèvements des os temporaux pour une analyse histologique de l'impact de l'administration de l'oxaliplatine sur l'oreille interne.

18872 Le virus de la fièvre catarrhale ovine (FCO) infecte les ruminants domestiques et sauvages. Depuis 1998, la FCO fut responsable, en Europe, de plusieurs épidémies chez les animaux avec plus de 2 millions de moutons morts. Le virus de la FCO provoque des infections chez les moutons, qui peuvent causer de la mortalité, des malformations, une baisse de la productivité, qui sont à l'origine de pertes économiques importantes.

Aucun traitement n'existe pour guérir les animaux de la FCO et seuls les vaccins peuvent les protéger. Le virus de la FCO existe sous la forme de 32 variants. Un variant du virus de la FCO est aussi connu sous le nom de sérotype. La différence entre les sérotypes est principalement due à la protéine de surface (aussi connu comme protéine de capsid externe). Il existe des vaccins autorisés en Europe contre 3 variants du virus de la FCO, mais leur efficacité est de courte durée (1 an environ).

Des candidats vaccins contre la FCO à large spectre visant à induire une réponse immunitaire de longue durée ont été développés et vont être évalués dans le cadre de ce projet. Notre projet vise à évaluer la protection assurée par ces nouveaux candidats vaccins chez des ovins immunisés puis éprouvés avec du virus de la FCO. Nous espérons que ces nouveaux candidats vaccins permettront de bloquer la réplication du virus et la transmission entre animaux contribuant ainsi à l'amélioration du bien-être animal dans les élevages.

Les protocoles ont été conçus en respectant les principes des 3R (réduire, raffiner, remplacer) avec une réduction au maximum de la douleur (définir un point limite qui prévient une souffrance inutile pour les animaux) et du nombre d'animaux requis (tout en gardant une bonne résolution statistique) et un raffinement des élevages en hébergeant les animaux en groupes. Ces expériences nécessitent l'utilisation de moutons pour évaluer la protection des animaux par nos candidats vaccins, puisque le mouton est l'espèce de ruminants la plus sensible à l'infection par le virus de la FCO. Notre protocole expérimental nécessite 75 moutons pour deux procédures. Suite aux vaccinations des prélèvements de sang total seront réalisés pour évaluer la réponse immunitaire des moutons ainsi que la protection assurée par nos candidats vaccins.

18873 Les cancers des voies aéro-digestives supérieures se situent au cinquième rang des cancers les plus fréquents en France. Malgré les associations de différentes thérapies (chirurgie, chimiothérapie, radiothérapies) des récurrences loco-régionales ou à distance sont fréquemment observées conduisant à une survie inférieure à 35% à 5 ans. De nouvelles associations thérapeutiques sont donc à tester en vue d'améliorer ce pronostic. Des travaux de l'équipe ont

montré un bénéfice thérapeutique chez la souris de combiner l'immunothérapie à la radiothérapie conventionnelle. L'objectif de l'étude actuelle est maintenant d'évaluer l'efficacité thérapeutique de l'association de l'immunothérapie à une modalité innovante de radiothérapie (protonthérapie) dans un modèle de cancer ORL métastatique et d'appréhender les mécanismes moléculaires de la réponse immunitaire mis en jeu. En effet, la synergie entre la protonthérapie et l'immunothérapie pourrait être supérieure à celle de la radiothérapie conventionnelle. Cette étude constitue un prérequis incontournable à une étude clinique de phase 1 chez l'homme. De ce fait, l'utilisation d'un modèle in vivo est indispensable pour se rapprocher au plus près de la pathologie humaine. Le modèle murin nous permettra tout d'abord d'évaluer l'efficacité et ensuite d'apprécier la toxicité et la tolérance du traitement. Il n'existe pas à l'heure actuelle ni modèle informatique, ni de modèle in vitro, pouvant remplacer ce modèle animal. En outre, ce travail permettra de définir l'intérêt d'associer l'immunothérapie à la protonthérapie par rapport à la radiothérapie conventionnelle.

Compte-tenu des objectifs et en application du principe des 3R, un modèle de souris immunocompétentes, greffées avec des cellules tumorales de souris apparaît comme pertinent. Concernant la « réduction », le nombre d'animaux a été calculé à minima par rapport à l'effectif nécessaire pour une exploitation statistique des résultats et a donc été fixé à 96 souris sur base de résultats antérieurs obtenus dans l'équipe en combinant radiothérapie conventionnelle et immunothérapie. Les souris seront traitées selon le schéma thérapeutique similaire à l'homme avec une immunothérapie encadrant une radiothérapie par protons. Les souris seront ensuite randomisées à la fin de la séquence thérapeutique en deux groupes d'analyses, les souris prévues pour l'analyse sur la tumeur et les souris prévues pour l'analyse des mécanismes moléculaires sous-jacents.

La radiothérapie locale sera contrôlée, réalisée sous anesthésie et n'excédera pas 1 minute, 1h de surveillance est prévue suite aux différents traitements. Le suivi des animaux sera quotidien lors des traitements puis trois fois par semaine lors de l'évaluation de l'efficacité thérapeutique et comprend la pesée, l'évaluation de leur état

Général, l'imagerie non-invasive (scanner X) et les points limites. Concernant le « raffinement », la présence de signes de souffrance conduira à l'administration d'antalgiques, voire à l'arrêt de l'expérimentation et à la mise à mort de la souris si ces signaux persistent.

18874 Le trouble du spectre autistique (TSA) est une maladie neurodéveloppementale qui touche environ 1 enfant sur 70. Le TSA est caractérisé par des difficultés de communication et d'interactions sociales et par des altérations comportementales, telles que des activités répétitives, des centres d'intérêt restreints, ainsi que des anomalies de la régulation sensorielle de l'environnement. Ces symptômes ont des conséquences extrêmement négatives sur la vie quotidienne des personnes atteintes de TSA, entraînant des inégalités dans l'accès à l'éducation et à une vie professionnelle. À ce jour, il n'existe aucun traitement ciblé pour améliorer les symptômes spécifiques observés chez les patients atteints de cette maladie. L'élucidation des nouvelles approches pharmacologiques nécessite d'abord une meilleure compréhension des mécanismes neurobiologiques sous-jacents à cette maladie. Ce projet porte sur l'étude des altérations neurobiologiques sous-jacentes au comportement atypique chez les modèles murins de TSA. Les bénéfices attendus de notre projet de recherche sont une meilleure compréhension des altérations neuronales sous-jacentes au TSA, et, à terme, l'identification de nouvelles stratégies thérapeutiques pour améliorer les symptômes de TSA. L'utilisation d'un modèle animal (souris transgénique) est indispensable à la réalisation de ce projet à fort impact clinique.

En accord avec le principe des 3Rs (réduction, raffinement, remplacement), nous avons réfléchi à notre projet de recherche de façon à réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés ainsi que la souffrance imposée par les procédures détaillées dans ce document. Réduction : Une conception expérimentale soignée garantira la reproductibilité des résultats et permettra, en combinaison avec une analyse statistique appropriée, une estimation de la taille minimum d'échantillon requise pour obtenir des résultats fiables. En outre, dans la mesure du possible, les données comportementales et physiologiques recueillies porteront sur les mêmes animaux, permettant une réduction du nombre d'effectifs totaux utilisés lors de la réalisation de ce projet. Raffinement : Les

animaux seront hébergés dans une manière adaptée à leurs besoins et recevront une surveillance quotidienne et les soins adaptés. Tous les animaux seront hébergés en groupe avec du matériel de nidification et auront accès à de la nourriture et de l'eau sous forme liquide ou solide (gel). Tous les animaux seront en cycle jour-nuit pour ne pas perturber leur rythme circadien et ils seront habitués à la manipulation et aux procédures comportementales. Plusieurs raffinements spécifiques aux procédures seront également appliqués (utilisations des produits anesthésiques et analgésiques, définition des points limites précoces et mesures conservatoires, et soins adaptés). Remplacement : Le projet porte sur l'étude d'une maladie neuropsychiatrique, caractérisée principalement par les marqueurs comportementaux. Les expériences proposées dans cette étude nécessitent des circuits intacts et des mesures à la fois physiologiques et comportementaux. Un modèle animal est absolument nécessaire pour reproduire la complexité de ces interactions neuronales et ne peut pas être remplacé par les études in vitro ou in silico. Les études cliniques ne sont pas adaptées à notre objectif expérimental car il s'agit d'une population clinique fragile et car les approches invasives sont nécessaires pour répondre à notre question scientifique. Les circuits neuronaux sont bien conservés chez les différentes espèces de mammifères et sont donc susceptibles d'être fonctionnellement similaires chez les rongeurs et les humains. L'utilisation des modèles de plus faible sensibilité neuronale (tels que la mouche à vinaigre) n'est pas adapté à notre projet, parce que cet organisme manque la structure cérébrale ciblée par notre étude. Cependant certaines études seront a priori effectuées in vitro afin d'évaluer la conséquence de l'application des molécules novatrice, avant leur administration in vivo. Nous avons estimé le nombre maximum d'animaux nécessaire à ce projet crucial à 524 animaux.

18875 La lipolyse du lait correspond à une dégradation enzymatique de la matière grasse du lait et conduit à l'accumulation d'acides gras libres dans le lait. L'accumulation dans le lait et les produits laitiers des acides gras libres issus de cette dégradation provoque l'apparition de goûts rance et de savon. Une lipolyse induite peut survenir lors de la traite ou de la fabrication des produits laitiers à la suite de chocs mécaniques ou thermiques du lait qui endommagent les globules gras du lait. Il existe également une lipolyse spontanée résultant d'une interaction complexe entre pratiques d'élevage, physiologie et génétique des animaux. La lipolyse spontanée du lait de vache est assez bien documentée, mais les mécanismes fins de sa régulation sont mal connus. Chez la chèvre, les facteurs physiologiques et nutritionnels, notamment la restriction alimentaire, ont des effets sur la lipolyse spontanée du lait qui sont différents de ceux observés chez la vache. Ainsi, alors que chez la vache la restriction alimentaire augmente la lipolyse, celle-ci diminue chez la chèvre. De plus, la lipolyse des matières grasses du lait des chèvres est affectée par leur génotype au locus de la caséine Alpha-S1. Le lait des chèvres de génotype nul (OO : absence de caséine Alpha-S1 dans le lait) a une lipolyse plus élevée que celui des chèvres de génotype fort (AA : taux élevé de caséine Alpha-S1 dans le lait) probablement du fait de différences de structure des globules gras du lait ou de leur mécanisme de sécrétion entre les chèvres OO et AA. L'objectif de cet essai est d'étudier chez la chèvre Alpine, comparativement à la vache (cf une étude précédente réalisée dans le cadre du même projet), l'effet d'une restriction alimentaire modérée (alimentation représentant 65% de la matière sèche ingérée à volonté) sur la lipolyse spontanée du lait en prenant en compte sa susceptibilité initiale à la lipolyse, notamment son génotype, et d'explorer les caractéristiques de son système lipolytique. Dans cet essai, la restriction alimentaire (qui est susceptible de survenir en élevage en cas de manque de fourrage par exemple en été) est utilisée comme modèle d'étude pour comprendre ce qui diffère entre les 2 espèces. Cette expérimentation sera réalisée sur des chèvres en milieu de lactation. A travers ce projet nous cherchons à répondre aux questions suivantes chez les caprins laitiers:

- Quels sont les mécanismes biochimiques qui contrôlent et régulent la lipolyse spontanée ?
- En fonction des taux de lipolyse initiaux, quel est l'effet d'une restriction alimentaire modérée sur la lipolyse spontanée ?

Pour répondre à ces questions, 24 chèvres de race Alpine seront suivies sur une durée de 25 jours dont 5 jours de restriction alimentaire ce qui correspond à une procédure de restriction alimentaire modérée (procédure légitime). Ces chèvres seront caractérisées sur des critères de composition du

lait dont la lipolyse (six prélèvements de lait), de métabolisme énergétique (deux prélèvements sanguins: procédure légère), d'état corporel (par 3 mesures de notes d'état corporel et 7 pesées). Toutes les chèvres seront restreintes en nourriture mais à deux périodes différentes. Les 2 génotypes seront étudiés puisqu'ils sont répartis de façon homogène entre les 2 lots.

Nous veillerons au respect de la règle des 3R :

Remplacer : l'évolution de la lipolyse provoquée par une restriction alimentaire implique des modifications biologiques complexes, qui ne peuvent être étudiées qu'in vivo.

Réduire : Le nombre d'animaux correspond au nombre minimum nécessaire calculé pour mettre en évidence une différence du niveau de lipolyse entre les 2 niveaux d'alimentation des 2 groupes de génotypes au locus de la caséine Alpha-S1

Raffiner. Les chèvres seront hébergées en lots dans un environnement adapté à leurs besoins, sur une litière paillée. Des disques à mordiller suspendus seront disposés dans les lots. Les chèvres feront l'objet d'une surveillance à plusieurs reprises dans une journée pendant toute la durée du protocole, notamment lors des 2 distributions d'aliments et des 2 traites quotidiennes. Les indicateurs de souffrance de l'animal tels que la baisse de l'ingestion (plus de 50%), la perte de poids (plus de 15%) et l'état général seront observés. En cas de symptômes inquiétants, une intervention vétérinaire aura lieu et l'animal sera retiré du protocole si nécessaire et retrouvera des conditions classiques d'élevage.

18876 Pour comprendre les fonctions de l'ensemble de nos gènes, il est nécessaire de générer, analyser et caractériser des modèles de souris génétiquement modifiées. Notre module est en charge de la création des lignées de souris génétiquement modifiées par des techniques de transgénèses. Ces lignées de souris peuvent devenir des modèles de maladie humaine et vont permettre de mieux comprendre le processus de développement de ces maladies. Ces modèles peuvent également répondre à d'autres intérêts scientifiques tout aussi importants (comme par exemple devenir des modèles de choix pour la recherche fondamentale). Ces souris, en tant que modèle de maladies humaines, vont également permettre de tester des médicaments et de valider (ou d'invalider) des cibles thérapeutiques. Toutes les lignées générées seront au stade hétérozygote et donc aucun phénotype lié à la modification génétique n'est attendu.

La création de nouvelles lignées de souris nécessite différentes étapes :

-La production d'embryons. Elle se traduit par la mise en accouplement de femelles productrices d'embryons superovulées ou non avec des mâles fertiles.

-La microinjection des embryons (deux techniques différentes utilisées) : la microinjection de nucléases dans un ovocyte fécondé (embryon 0,5 jours post-coïtum) ou la microinjection de cellules souches embryonnaires murines (ES) dans un blastocyste (embryon à 3,5 jours post-coïtum).

-La réimplantation des embryons microinjectés. Les embryons sont réimplantés dans des femelles pseudogestantes (mères porteuses) par acte chirurgical. Ces femelles sont au préalable mises en accouplement avec des mâles vasectomisés. L'utilisation de ces mâles vasectomisés est nécessaire pour obtenir des femelles qui sont à l'issue de l'accouplement réceptives homonalement à la nidation des embryons microinjectés.

-La transmission de la modification génétique.

Dans le cas des souris obtenus par l'injection des nucléases, les progénitures sont identifiées (par marquage aux oreilles) et sont mises en accouplement avec des souris de fond génétique « sauvage » afin de transmettre la mutation à la descendance.

Dans le cas des souris obtenus par l'injection d'ES, les progénitures sont constituées de deux génomes différents (celui de l'embryon et celui de la cellule ES microinjectées), ces dernières contiennent donc en partie la modification génétique attendue. Ces souris sont mises en accouplement avec des souris de fond génétique « sauvage », ce qui permettra d'obtenir des souris hétérozygotes (porteur de la mutation génétique d'intérêt).

La création de lignées de souris nécessite l'utilisation d'animaux. En revanche, il est indispensable de se préoccuper de l'éthique et de leur bien-être. Il est important d'enrichir leur environnement

(coton, papier), de respecter les conditions d'élevage (le nombre d'animaux par cage, la température, l'hygrométrie, cycle nycthéral, etc). Il faut sans cesse raffiner les techniques utilisées, ainsi que le travail effectué en périphérie, afin de réduire l'utilisation des animaux. Pour la centaine de lignées produites chaque année qui sont l'objet de cette autorisation, nous estimons nos besoins en animaux à 4650 souris maximum pour les 5 ans du projet.

18877 Dans le cadre de la production de vaccins poliomyélitiques inactivés, l des contrôles de l'immunogénicité (capacité de l'antigène à induire une réaction immunitaire) des vaccins doivent être réalisés pour des raisons réglementaires.

Le contrôle est réalisé par inoculation de vaccins à des poulets qui sont ensuite hébergés le temps nécessaire au développement des anticorps.

Une prise de sang permet ensuite de mesurer le taux d'anticorps et si ce taux est conforme aux exigences, les lots de vaccins sont libérés pour être mis sur le marché.

Le bénéfice attendu est de contribuer à la libération de lots de produits fiables et conformes aux spécifications afin d'assurer la vaccination des personnes contre la poliomyélite.

Aucune douleur n'est attendue pour les animaux lors de la réalisation de ce test.

Pour la durée du projet (5 ans) il est prévu d'utiliser 7830 poulets.

Mise en œuvre des 3R :

Remplacement / Réduction :

Ce test est en cours de suppression auprès des autorités de santé. Un projet est d'ailleurs engagé afin d'arrêter ce contrôle comme c'est déjà le cas pour un certain nombre de vaccins antipoliomyélitiques commercialisés. L'arrêt de ce contrôle a déjà permis de diminuer le nombre de poulets de 8000 à moins de 1600 poulets par an.

Raffinement :

Les prélèvements de sang sont réalisés sous anesthésie générale.

Les poulets sont hébergés en groupe, au sol, sur litière de copeaux de bois.

Ils sont observés quotidiennement. En cas de problème de santé, un vétérinaire est consulté et décide des soins à porter à l'animal.

18878 1-Intitulé du projet : Évaluation de l'effet cérébroprotecteur d'une molécule visant à réduire le stress oxydant dans un modèle murin d'AVC ischémique

2-Durée du projet : 24 mois

3-Mots-clés : Accident vasculaire cérébral, imagerie par résonance magnétique, neuroprotection

4-Finalité du projet : Recherche translationnelle et appliquée

5-Objectifs et bénéfices escomptés du projet :

L'accident vasculaire cérébral (AVC) constitue la première cause de handicap acquis chez l'adulte, la deuxième cause de démence et la troisième cause de mortalité : c'est donc un enjeu majeur de santé publique. Dans 85% des cas, l'AVC est d'origine ischémique, c'est-à-dire qu'il provient de l'occlusion d'une artère cérébrale. Le seul traitement disponible en phase aiguë d'un AVC ischémique (dans les premières heures) consiste à déboucher l'artère occluse (recanalisation). La recanalisation artérielle entraîne une restauration du flux sanguin au sein d'un territoire qui en était privé. Cette reperfusion du tissu cérébral est nécessaire, mais elle déclenche des cascades pathologiques qui contribuent aussi au déficit clinique global. L'un des enjeux du développement de nouvelles approches thérapeutiques dans l'AVC ischémique, en complément des traitements actuels, serait de combattre les dommages liés à la reperfusion.

A ce jour, aucun traitement visant à protéger le tissu cérébral (neuroprotection) n'a démontré d'efficacité chez l'Homme. Ce projet de recherche a pour objectif de tester un nouveau traitement de neuroprotection dans les premières heures suivant la survenue d'un AVC ischémique. La molécule testée a déjà montré des bénéfices dans l'infarctus du myocarde. Si notre étude apporte

des preuves d'efficacité dans l'AVC ischémique, un essai clinique pourrait être mis en place rapidement pour évaluer cette nouvelle approche thérapeutique chez les patients. L'évaluation de nouveaux traitements dans un modèle d'AVC ischémique chez le rongeur est une étape nécessaire pour pouvoir concevoir correctement de futurs essais cliniques.

6-Nuisances prévues :

L'induction d'un AVC ischémique chez le rat nécessite une procédure de classe modérée avec une chirurgie réalisée sous anesthésie générale d'une durée de 30 minutes. L'AVC ischémique n'induit pas de douleur en soi (de même que chez les patients) ; l'analgésie donnée de manière systématique vise à prévenir la douleur liée à la chirurgie et à d'éventuelles complications rares telles qu'un œdème cérébral malin. La durée de l'ischémie est de 90 minutes et le traitement sera administré pendant 2 heures à la suite de la reperfusion, d'où une anesthésie totale de 4 heures. Par ailleurs, le modèle animal induit des déficits sensoriels et moteurs reproduisant ainsi la physiopathologie humaine. Des mesures sont prises pour permettre aux animaux de s'hydrater et de s'alimenter correctement en prenant en compte la présence de ces déficits. De plus, nous utilisons une grille de score associée à des points limites pré-définis, afin d'évaluer et de limiter au maximum une éventuelle souffrance liée à ces déficits sensoriels et/ou moteurs. Dans tous les cas, le suivi post-AVC est limité à 24h, et immédiatement suivi de l'euthanasie des animaux. Les cerveaux seront prélevés en fin de procédure afin d'évaluer les mécanismes d'action du traitement sur le cerveau.

Un nombre total de 70 rats au maximum seront utilisés au cours de ce projet, afin de disposer d'une étude statistique robuste.

7-Application de la règle des «trois R» :

Remplacement. Ce projet s'appuie sur des données in vitro déjà publiées. L'utilisation d'animaux vivants est justifiée par le rôle central de l'imagerie in vivo dans nos procédures, grâce à l'utilisation d'appareils d'imagerie par résonance magnétique (IRM) dédiés aux petits animaux, afin de reproduire la prise en charge de l'AVC chez l'Homme.

Raffinement & Réduction. La chirurgie et les examens d'imagerie sont entièrement réalisés sous anesthésie profonde avec couverture analgésique adaptée. L'imagerie in vivo permet un suivi longitudinal sans avoir à mettre à mort des animaux à intervalles donnés pour faire la même observation. Chaque animal est son propre contrôle, ce qui permet d'augmenter la puissance statistique des résultats tout en limitant le nombre d'animaux.

18879 Notre projet vise à améliorer notre connaissance de la structure et de la fonction de l'innervation cholinergique du striatum, une structure du cerveau incluse dans les ganglions de la base, un système sous-cortical mis en cause dans de nombreuses pathologies neuropsychiatriques. Le dysfonctionnement du striatum est associé entre autres à la manifestation de mouvements stéréotypés répétitifs, sans finalité apparente, qui entrent dans le cadre des comportements dits compulsifs qui compromettent fortement l'adaptation aux conditions changeantes de l'environnement. L'innervation cholinergique du striatum est assurée en majeure partie par une population spécialisée d'interneurones impliqués dans la flexibilité comportementale, c'est-à-dire l'aptitude à adapter les actions au regard des modifications environnementales ou contextuelles. Notre hypothèse est que les mouvements incontrôlés caractéristiques des comportements compulsifs sont une conséquence d'un défaut de contrôle exercé par les interneurones cholinergiques (INChs) sur les neurones "de sortie" du striatum, qui projettent vers les circuits de commande du mouvement. Dans ce projet, nous cherchons (1) à comprendre comment les INChs sont connectés anatomiquement aux neurones de sortie du striatum ; (2) à examiner comment ces deux populations neuronales interagissent lors de la planification et de la sélection de l'action; et (3) à établir un lien de causalité entre l'inactivation des INChs et l'apparition de mouvements compulsifs. Il s'agit d'un projet de recherche fondamentale sur 5 ans, dont le modèle d'étude est le primate non humain (macaque rhésus) et concernera un échantillon de 8 animaux. Ce projet ouvre des perspectives en clinique humaine dans la mesure où la compréhension des mécanismes neuronaux sous-jacents aux comportements compulsifs peut permettre de développer de nouvelles thérapies

ciblant précisément ces mécanismes. Nous avons choisi le macaque rhésus chez lequel les circuits neuronaux et leurs caractéristiques neurochimiques et physiologiques sont bien connues et proches de ceux de l'homme. De plus, les conduites que nous étudions (planification et sélection de mouvements d'atteinte de la main) ont des spécificités propres au répertoire comportemental des primates et les anomalies induites par manipulation expérimentale sont mieux à même d'être comparées à celles observées en clinique humaine.

Le projet a été élaboré dans le respect de la règle des 3R : Remplacement: Nous n'avons pas d'alternative à l'expérimentation chez l'animal entier car il est impossible d'aborder la complexité des interactions neuronales en lien avec le comportement sur une préparation *in vitro* (tranche de tissu) ou une simulation informatique sur un modèle de réseaux de neurones formels. Il est difficile de reproduire, sur une espèce autre que le primate non humain, des signes compulsifs comparables à ceux observés en clinique humaine. Réduction: Nous avons diminué, autant qu'il soit possible, l'effectif d'animaux sans risquer de compromettre la fiabilité des résultats et les objectifs scientifiques. Pour cela, nous nous efforçons par exemple d'optimiser le recueil de données en intervenant, dans certaines parties du projet, sur les deux hémisphères cérébraux de chaque animal. Raffinement: Les sources de stress et de souffrance sont minimisées par l'emploi de procédures validées depuis de nombreuses années dans notre équipe. Les singes sont hébergés par groupes de 2 ou 3, selon les affinités, avec accès à des volières et enrichissement des espaces d'hébergement (objets à manipuler, perchoirs, cordages). Les chirurgies respectent des conditions d'anesthésie et d'asepsie strictes. Une surveillance constante est assurée par un personnel technique qualifié et les expérimentateurs en charge des animaux, sous la supervision d'une structure de contrôle du bien-être animal et d'un vétérinaire.

18880 L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre du développement d'une série de 3 composés d'intérêt thérapeutique (chacun existant sous deux formes), destinés à l'amélioration des troubles métaboliques, notamment l'obésité. Une première étude pilote, réalisée par le laboratoire pharmaceutique client de l'étude, a montré que ces composés induisent une perte de poids corporel associée à une diminution de prise alimentaire chez des souris obèses.

L'objectif de la présente étude sera de confirmer et de compléter ces résultats préliminaires en évaluant l'impact à plus long terme de ces composés sur la prise alimentaire, le poids corporel et la régulation glycémique chez des souris rendues obèses par un régime hyperlipidique (60% de l'énergie issue des graisses) pendant 10 semaines avant démarrage du traitement. Les traitements seront administrés par voie orale pendant les 8 semaines suivantes, pendant lesquelles les animaux seront soumis au même régime enrichi en graisse. Au cours du traitement, les paramètres suivants seront mesurés: poids corporel et prise alimentaire, composition corporelle, glycémie à jeun ou à l'état nourri et tolérance au glucose. Le traitement sera administré à trois doses différentes pour chaque composé afin d'obtenir une dose-réponse. Par ailleurs, afin d'explorer l'implication éventuelle de la thermogenèse dans les effets du composé, les animaux seront hébergés à une température de thermoneutralité (29-32°).

La présente étude sera réalisée en trois lots d'études indépendantes pour des raisons de contrainte de production des composés tests. Chaque lot d'étude nécessitera l'emploi de 72 souris C57Bl/6 réparties en 6 groupes expérimentaux de 12 animaux. Au total, 216 animaux (3x72) seront donc nécessaires pour tester les 3 composés en développement.

La règle des 3Rs a été prise en compte dans l'élaboration du présent protocole:

- Raffinement: Le modèle animal qui sera utilisé est un modèle parfaitement caractérisé dans la littérature et couramment utilisé dans les études précliniques cherchant à mettre en évidence les effets bénéfiques de composés sur la prise alimentaire, le poids corporel et les troubles métaboliques. Le protocole a été planifié de façon à limiter au maximum tout stress et tout inconfort pour les animaux. Les animaux seront hébergés en cages individuelles du fait de la nécessité de mesurer précisément l'impact du composé sur leur prise alimentaire individuelle.

Néanmoins, les animaux conserveront des contacts visuels avec leurs congénères et un enrichissement des cages sera assuré par l'ajout d'igloos et de matériels de nidification. Enfin, un

suivi journalier des animaux à l'aide d'une grille de score permettra une action rapide en cas d'atteinte des points limites établis.

- Réduction: Le nombre d'animaux utilisés a été rationalisé à partir de l'expérience acquise par notre laboratoire sur l'analyse des paramètres d'intérêt. Ainsi, le nombre d'animaux par groupe a été adapté pour chaque série expérimentale en fonction des paramètres d'intérêt de façon à être en mesure de mettre en évidence une différence statistiquement significative sur les paramètres étudiés.

- Remplacement: L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe aucune méthode de substitution n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude de l'impact d'un composé sur le poids corporel, la prise alimentaire et les troubles métaboliques.

18881 En 2018, les cancers du côlon et du poumon font partie des quatre cancers les plus fréquents avec le cancer de la prostate et du sein. Ces 2 types de cancers représentent les cancers causant le plus de décès avec les cancers du pancréas et du sein. Actuellement, le traitement des cancers colorectaux, du pancréas et du poumon repose sur l'utilisation de chimiothérapies. Bien que ces chimiothérapies aient un effet antitumoral avéré, elles ne conduisent pas systématiquement à une rémission totale du patient, en particulier dans les cas de cancers avancés. Il a été montré récemment que le système immunitaire jouait un rôle important dans la réponse aux traitements par chimiothérapie. En effet l'activation de certaines cellules immunitaires pourra favoriser la réponse des patients au traitement, alors que leur blocage conduira à son inefficacité. Ainsi, l'immunothérapie a été associée à la chimiothérapie afin d'augmenter son efficacité. Bien qu'ayant montré des effets bénéfiques chez certains patients, cette combinaison reste inefficace pour un grand nombre d'entre eux. Il serait donc intéressant de trouver des molécules capables de lever la résistance à la chimio-immunothérapie.

Le but du projet est d'évaluer l'efficacité antitumorale d'une association immunothérapie et chimiothérapies utilisées en clinique en association avec des inhibiteurs de certaines voies de résistance dans trois modèles de cancers chez la souris, un pour le côlon, un pour le poumon et un pour le pancréas.

Dans ce projet, nous évaluerons :

- l'efficacité des traitements sur la croissance tumorale chez des souris standards. Ceci permettra d'évaluer l'efficacité d'une combinaison chimio-immunothérapie + composés testés par rapport à une chimio-immunothérapie seule. Etant donné que certaines cellules du système immunitaire peuvent contribuer à l'élimination des cancers, nous étudierons leur état d'activation chez les souris traitées par la chimio-immunothérapie seule ou en association avec les composés testés, par rapport aux souris non traitées (immunomonitoring, Nanostring).

- la nécessité du système immunitaire, en réalisant les mêmes expériences chez des souris génétiquement modifiées, comme par exemple la souris de type Balb/nude (dépourvue de lymphocytes T et ayant un système immunitaire affaibli).

Le nombre total maximum de souris prévues pour la mise en œuvre de ce projet est de 3500. Si aucun effet bénéfique de certains composés seuls ou en association avec la chimio-immunothérapie sur la réponse anti-tumorale (croissance et infiltrats immunitaires) n'est observé à la fin de la première étape, alors ces composés ne seront pas utilisés pour les étapes suivantes. Si aucune différence n'est observée entre les effets des traitements chez la souris standard et la souris nude, alors l'étude sera arrêtée à la fin de l'étape 2. Ainsi le nombre de 3500 souris annoncé est une estimation maximale et le nombre de souris réellement utilisées pourrait être moins important que prévu.

La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R. Tout d'abord, les expériences ne seront répétées que deux fois ce qui permet donc de réduire le nombre d'animaux de l'étude. Dans la même optique, si les premières expériences ne montrent pas d'effet d'un ou de plusieurs produits testés, celui-ci ou ceux-ci ne seront plus utilisés dans les expériences suivantes. L'étude de l'effet des inhibiteurs de MEK ou de l'IL-1 sur des cellules immunitaires in vitro permet de s'affranchir de l'utilisation d'animaux non justifiée (remplacement). Enfin, les animaux seront

hébergés dans des conditions qui répondent à leurs besoins (en groupes, dans un environnement enrichi). Les animaux seront habitués aux techniques de préhension et la totalité des manipulations effectuées sera réalisée sous anesthésie afin de réduire l'inconfort potentiel à son minimum permettant ainsi le raffinement de l'étude.

18882 Le syndrome ICF (Immunodéficience-Instabilité Centromérique-Anomalies Craniofaciales) est une maladie génétique humaine caractérisée par un déficit de la réponse anticorps contre les agents pathogènes, qui se traduit par des infections récurrentes du système respiratoire et une incapacité à répondre aux vaccins.

Nous souhaitons étudier un modèle de souris pour cette maladie, qui consiste en une lignée de souris déficientes pour l'un des gènes mutés chez les patients. Ce modèle reproduit plusieurs aspects de la maladie humaine et différents facteurs susceptibles d'expliquer ces défauts ont été identifiés. L'objectif de l'étude actuelle est d'utiliser ces souris pour comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine de la maladie.

Notre étude consistera dans un premier temps à approfondir la caractérisation du modèle de souris ICF, chez l'embryon et chez l'adulte. Nous étudierons les populations de lymphocytes B présentes chez les embryons mutants. Nous immuniserons des souris mutantes adultes afin de caractériser les propriétés de leurs cellules immunitaires. Parallèlement, les cellules immunitaires isolées à partir des souris immunisées seront réimplantées *in vivo* dans des souris receveuses, par voie intraveineuse, afin d'étudier leur devenir. Enfin, nous comparerons l'effet de la perte de fonction du gène d'intérêt dans l'ensemble des cellules sanguines, à celui causé par une perte limitée aux lymphocytes B. Ces expériences nous permettront d'identifier de nouveaux facteurs susceptibles d'expliquer le mécanisme à l'origine du déficit immunitaire de ces souris.

Nous testerons ensuite le rôle des facteurs identifiés précédemment de deux façons :

- par des traitements pharmacologiques modulant l'activité de ces facteurs, administrés par gavage oral ou par injection intra-péritonéale
- en modulant leur expression à l'aide d'une stratégie de thérapie génique.

Notre projet nécessite l'utilisation de souris car l'étude directe des patients ICF est très délicate en raison de l'impossibilité d'accéder aux organes au sein desquels se déroule normalement la réponse immunitaire. Par ailleurs, il n'existe pas à l'heure actuelle de modèle *in vitro* capable de reproduire fidèlement l'ensemble des événements et des interactions cellulaires survenant lors de cette réponse.

Les deux parties de ce projet nécessiteront l'utilisation de 652 au maximum (636 adultes de plus de 6 semaines et 16 embryons), sur une durée de 3 ans.

1) Réduire : le nombre de souris a été réduit au minimum grâce à la prise en compte des effectifs utilisés dans nos études précédentes, qui ont permis des comparaisons statistiquement significatives de groupes de souris mutantes et contrôles.

2) Remplacer : en parallèle, nous adapterons des protocoles de cultures d'organoïdes afin d'effectuer certains tests *in vitro*, dans le but de limiter le nombre d'animaux à utiliser pour la deuxième phase du projet.

3) Raffiner : les interventions seront réalisées sous anesthésie générale et nous veillerons également à l'enrichissement de l'environnement de nos souris, à l'aide de maisonnettes et de tubes en cartons, de coton, ainsi que de bâtonnets de bois à ronger, disponibles au sein de l'animalerie.

Nous porterons une attention particulière aux animaux subissant les greffes de moelle osseuse après irradiation : ces animaux bénéficieront d'une surveillance quotidienne pendant les 14 jours suivant les greffes de cellules souches, afin de vérifier le succès de la greffe et l'absence d'effets secondaires graves consécutifs à l'irradiation. Les animaux dépourvus de système immunitaire recevront un traitement préventif pour limiter le risque d'infection par des bactéries du tube digestif. Des points limites précis ont été définis en termes d'aspect des animaux (ouverture des yeux, pelage), de comportement (locomotion) et de perte de poids ; ces points limites nous permettront de mettre à mort les animaux de façon anticipée en cas de détérioration marquée de l'état général,

afin de limiter toute souffrance. Les autres procédures qui seront appliquées dans notre projet ne sont pas censées générer de douleur intense ou prolongée, dans la mesure où nous limiterons les volumes injectés et les fréquences de gavage et d'injection au strict minimum. Par ailleurs, les animaux qui seront élevés ne présentent pas de problème particulier dans les conditions d'élevage au sein de notre animalerie. Un suivi régulier de l'ensemble des animaux sera néanmoins effectué pour pouvoir détecter rapidement d'éventuels signes de douleur ou de détresse.

Les connaissances acquises au cours de ces trois années de projet nous permettront de mieux cerner les facteurs impliqués dans le déficit immunitaire des patients ICF, ce qui pourrait inspirer des stratégies thérapeutiques pour stimuler leur réponse à la vaccination. Nous espérons également que cette étude débouchera sur des procédés améliorant la réponse vaccinale au sein de la population générale.

18883 Le trouble de déficit d'attention avec hyperactivité (TDA/H) est un trouble neuro-développemental qui se caractérise par trois symptômes qui sont un trouble de l'attention, de l'hyperactivité et de l'impulsivité et qui affecte négativement de nombreux aspects de la vie quotidienne. Il n'existe qu'un traitement palliatif qui minore les symptômes afin de soulager les sujets atteints et leur famille : l'usage d'amphétamine (psychostimulant).

Malgré de nombreuses études, les causes neurobiologiques du TDA/H demeurent largement inconnues. Une des hypothèses est le dysfonctionnement de la voie de sortie indirecte du striatum dans le système des ganglions de la base (GGB). Récemment, il a été suggéré dans une étude chez l'Homme, que des altérations de la connectivité fonctionnelle cérébrale pourraient être un biomarqueur du TDA/H. Les cartes de connectivité fonctionnelles permettent de suivre l'activité spontanée synchronisée entre des régions cérébrales distantes liées par des connexions anatomiques et permettent donc d'analyser l'organisation fonctionnelle de ces régions.

Il est nécessaire de mieux comprendre la physiopathologie du TDA/H. Ce projet, en collaboration, a pour objectifs de mieux comprendre la connectivité fonctionnelle et ses dysfonctionnements entre les structures des ganglions de la base qui pourrait sous-tendre le TDA/H, afin de proposer de nouveaux traitements plus ciblés et efficaces. Notre hypothèse est que dans le TDA/H nous observerons des modifications des cartes de connectivité fonctionnelle dans les structures des GGB qui seront réversées par l'injection d'amphétamine.

A cette fin, nous disposons d'un modèle murin expérimental de TDA/H (nommé A2A-Cre-iDTR), proche de la physiopathologie humaine, développé par une équipe collaboratrice : les souris présentent une hyperactivité locomotrice et un déficit cognitif dans des tâches attentionnelles. Ce modèle de TDA/H est induit par l'injection unique de toxine diphtérique (DT) dans le striatum.

Nous utiliserons l'imagerie rapide ultrasonore (fUS) chez ce modèle murin de trouble de déficit d'attention avec hyperactivité afin de construire des cartes de connectivité fonctionnelle dans les GGB avec une très grande résolution spatiale et temporelle. Nous réaliserons les cartes chez des souris éveillées en contention tête-fixée : avant l'induction du phénotype TDA/H, pendant l'expression du phénotype TDA/H et après traitement avec de l'amphétamine. Nous ferons également des enregistrements chez la souris modèle anesthésiée afin de comparer les cartes de connectivité construites avec le fUS aux cartes obtenues précédemment en Pet Scan, dans les mêmes conditions, mais avec une résolution spatiale nettement plus faible.

La mise en œuvre de ce projet nécessitera l'utilisation de 120 animaux pour une durée de 3 ans. 1/ Remplacement : A l'heure actuelle, ce modèle ne peut pas être remplacé par une approche alternative in-vitro car le TDA/H est une pathologie complexe qui ne peut être modélisée qu'au niveau de l'animal entier. 2/ Réduction : le nombre d'animaux, nous ferons une analyse longitudinale et nous enregistrerons l'activité de nombreuses structures cérébrales simultanément. Nous avons également estimé la taille des échantillons permettant une analyse statistique efficace des résultats grâce aux données collectées au cours d'expériences précédentes. 3/ Raffinement : Pour éviter toute souffrance les procédures de chirurgie se feront sous anesthésie générale associée à un protocole analgésique en pré-,per- et pos-opératoire. Les animaux seront observés et manipulés quotidiennement afin de minimiser le stress et la douleur qui seront évalués à l'aide de points limites.

En plus de la justification purement fondamentale liée à l'intérêt de comprendre le fonctionnement des noyaux de la base, ce projet a une dimension translationnelle et aide à établir les bases scientifiques solides qui permettront d'avoir des applications pour la prévention et le traitement du TDA/H et, plus largement, des maladies neuropsychiatriques.

18884 Les troubles anxieux et de l'humeur associés au stress, tel que la dépression et le stress post-traumatique, sont parmi les premières causes d'invalidité dans le monde. Pour autant, les changements cérébraux qui précipitent l'apparition de ces pathologies sont loin d'être compris, et les cibles thérapeutiques actuelles insuffisantes. L'objectif de ce projet est de mettre en place au sein de notre laboratoire un modèle chez la souris permettant de récapituler les changements comportementaux associés aux expériences de stress chronique et facilitant l'utilisation d'outils biologiques afin de cartographier, d'enregistrer et de manipuler les circuits cérébraux impliqués dans ces changements comportementaux. Ce modèle devra être à la fois 1) très reproductible, 2) permettre d'étudier la variabilité inter-individuelle au stress, car tous les individus exposés au stress ne développent pas nécessairement de troubles mentaux, une qualité appelée résilience, 3) induire des effets comportementaux forts et durables dans le temps, 4) être flexible dans sa mise en place afin de pouvoir l'utiliser chez l'adulte mais aussi à un stade juvénile, afin d'étudier comment le stress précoce, qui est le plus grand facteur prédictif de la dépression, modifie durablement le cerveau et précipite l'apparition de troubles dépressifs et anxieux chez l'adulte. Pour ces raisons le modèle que nous souhaitons mettre en place sera le stress de défaite sociale (SDS), largement utilisé dans la littérature et remplissant ces différentes conditions. Ce modèle consiste à introduire une souris « test » dans la cage d'une souris plus agressive (en l'occurrence une souris CD1 adulte, une lignée non consanguine qui est largement utilisée pour son comportement agressif), provoquant l'attaque et la défaite de l'individu « test », suivi par une période d'interaction sensorielle prolongée entre la souris « test » et l'agresseur, mais sans contact physique direct. Cette expérience de défaite sociale négative, renforcée par la répétition de contacts sociaux avec l'agresseur induit des changements comportementaux et neurobiologiques durables qui ont des points communs avec certains symptômes présents dans la dépression chez l'homme, notamment l'anhédonie, l'anxiété, l'aversion sociale, une suractivation du système neuroendocrinien du stress, etc. Par ailleurs, sur la base du comportement d'évitement social qui est induit par ce modèle, il est facile de séparer les individus dits susceptibles au modèle, c'est-à-dire qui présentent une diminution du comportement d'interaction social, des individus dits « résilients », qui eux ne montrent pas de modification comportementale à la suite du modèle. Si ce modèle a été largement utilisé chez des souris mâles, son utilisation chez la femelle est marginale de par la sporadicité des comportements agressifs des souris mâles envers une femelle, ou de comportements agressifs d'une femelle envers une autre femelle. Cependant les maladies psychiatriques liées au stress, en particulier la dépression, étant plus observées chez les femmes, ce projet visera à implémenter le modèle de SDS à la fois chez les mâles et les femelles. Cela nous permettra à long terme d'étudier les dimorphismes sexuels des bases neurobiologiques de la dépression et de son traitement.

Cette étude nécessitera au total 280 souris.

Concernant l'application de la règle des 3 R dans notre étude :

Remplacement : aucune méthode alternative in vitro n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée. Le stress chez l'animal, comme modèle de pathologie psychiatrique humaine, repose sur l'observation du comportement de l'animal vivant. La souris est par ailleurs un choix pertinent de par les homologues structurelles qui existent avec l'homme dans l'organisation des zones cérébrales impliquées dans la réponse au stress et les émotions.

Réduction : les effectifs sont optimisés pour prendre en compte qu'une partie des animaux (~15 à 30% selon les études) sera résiliente au protocole de SDS, ces effectifs sont donc nécessaires pour pouvoir comparer statistiquement les groupes expérimentaux pour les différentes variables comportementales (témoins, SDS susceptibles, SDS résilients). Il est par ailleurs essentiel de pouvoir identifier des CD1 agressives, ce qui est un prérequis à l'étude. Finalement, les CD1 agressives sélectionnées peuvent être réutilisées par la suite en tant qu'agresseurs au cours de nouveaux protocoles de SDS.

Raffinement : Les conditions d'élevage des animaux seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu (cabanes plexiglass et cartons, tubes). Les animaux en SDS seront suivis quotidiennement, dans l'heure suivant l'épisode de défaite sociale, avec une attention particulière portée à l'état général, l'état de chair et aux plaies cutanées potentielles des animaux tests, ce qui sera facilité par des formulaires de santé précis pour chaque souris. Des points limites énoncés plus bas seront mis en place avant intervention ou exclusion du protocole.

18885 Les cancers représentent en France la première cause de décès prématuré avant 65 ans chez l'homme et la deuxième chez la femme constituant un problème majeur de santé publique avec 382 000 nouveaux cas estimés en 2018. Pour comprendre le fonctionnement complexe de la cellule cancéreuse et faire ainsi progresser la prévention, le diagnostic et le traitement des cancers, il est indispensable de disposer de modèles intégrés animaux proche de l'Homme, permettant d'évaluer in vivo l'interaction de ces cellules avec leur environnement. Les souris représentent ainsi un modèle de choix pour les études menées en cancérologie.

Les cancers sont caractérisés par des altérations portant sur de nombreux gènes. Après une première étape d'analyse in vitro, le recours à la souris génétiquement modifiée permet de comprendre le rôle de ces gènes au niveau d'un organisme entier. Notre projet consiste à développer de nouvelles lignées murines pour permettre aux chercheurs d'avoir les outils les plus adaptés à leurs études. Bien évidemment, les lignées ne sont créées que si elles présentent un intérêt biologique potentiel et si elles n'existent pas par ailleurs dans d'autres établissements de recherche. Notre expertise nous permet d'avoir d'excellents résultats et donc de minimiser le nombre d'animaux nécessaires.

Nous prévoyons d'utiliser 165 souris pour les 2 années à venir.

Dans un souci de raffinement, toutes les mesures seront prises pour éviter le stress et la douleur des animaux. Ainsi, les gestes techniques sont assurés par du personnel qualifié, avec un recours à l'analgésie lors des procédures chirurgicales.

18886 L'évaluation et le développement des nouveaux dispositifs et techniques pour les affections cardiaques en général et des troubles de la conduction cardiaque en particulier nécessite une phase de recherche pré-clinique et développement qui permet de mettre au point le dispositif et vérifier leur sécurité.

La rythmologie concerne l'étude des troubles du rythme cardiaque, tels que la tachycardie (fréquence cardiaque rapide) ou la bradycardie (fréquence cardiaque lente). En matière de rythmologie, d'importants progrès ont été réalisés aussi bien en matière d'explorations électrophysiologiques qu'en matière d'électrophysiologie interventionnelle. Le défibrillateur automatique implantable (DAI), capable de détecter une tachycardie ventriculaire (TV) ou une fibrillation ventriculaire (FV) et de délivrer une stimulation et/ou un choc pour les arrêter, ainsi que le stimulateur multisite (ou triple chambre – STC), sont devenus des outils thérapeutiques incontournables avec un élargissement progressif des indications.

La fibrillation atriale (FA) est caractérisée par une fréquence cardiaque rapide et irrégulière qui limite la possibilité de l'oreillette à pomper du sang de manière efficace vers les ventricules. Une étude publiée fin 2006 avait montré qu'il existe dans la population générale une augmentation significative de l'incidence de la fibrillation auriculaire et cela indépendamment de l'âge. Les auteurs montraient que la fibrillation auriculaire va devenir une véritable épidémie, notamment aux Etats-Unis, et que, même si l'incidence de la fibrillation auriculaire cesse dorénavant d'augmenter, on peut estimer qu'entre 2008 et 2050 le nombre de patients porteurs d'une fibrillation auriculaire va probablement doubler.

L'ablation a été fréquemment décrite comme le traitement de la fibrillation atriale. L'ablation est une technique médico-chirurgicale visant à détruire la zone de myocarde arythmogène, les voies accessoires ou le tissu de conduction, à l'aide d'un cathéter d'ablation au travers duquel une source d'énergie est appliquée sur le substrat arythmogène.

La pose de pacemakers est aujourd'hui un acte parfaitement maîtrisé et codifié mais qui nécessite toujours de la recherche et du développement pour améliorer les performances électriques, augmenter l'espérance de vie des pacemakers, diminuer les risques de délogements, de fractures de sondes, d'infection, de fibrose autour des sondes, etc.

À cause des limites des médicaments, la transplantation cardiaque et les dispositifs médicaux ont été proposés pour améliorer la qualité de vie et la survie des patients en insuffisance cardiaque chronique. Récemment, la stimulation biventriculaire comme une thérapie adjuvante pour des patients en insuffisance chronique a été proposée comme une option viable. La stimulation biventriculaire qui implique la mise en place d'un pacemaker stimulant à gauche et à droite simultanément peut vraisemblablement fournir des nouveaux schémas de stimulation ventriculaire mieux coordonnés et de cette façon potentiellement réduire l'espace QRS aussi que la synchronie intraventriculaire est interventriculaire.

En résumé, l'enjeu médical pour l'homme de la recherche sur cette thématique des troubles de la conduction électrique dans le cœur est majeur.

La chronologie médicale inclura l'implantation et le suivi par imagerie de type échographique, angiographique, et scanner par exemple et de suivi télémétrique et clinique et examens complémentaires permettra d'assurer un cadre d'évaluation scientifique optimal mais aussi un suivi rapproché de l'évaluation de l'état de santé générale et du bien-être des animaux implantés. Des modèles de grande taille seront utilisés, avec environ 240 implantations par an sur une durée de 5 ans, sur des porcins, ovins, et plus rarement canin. Cela permettra sur 5 ans de valider les différents prototypes et réaliser les tests réglementaires de sécurité requis par les autorités. Il est donc indispensable d'avoir recours à la modélisation au préalable afin de vérifier le bon fonctionnement et la sécurité. Cela doit impérativement se faire sur des organes de taille identique aux organes de l'homme dans des conditions qui reproduisent la réalité de l'organe et de vérifier les effets secondaires néfastes sur l'ensemble de l'organisme. Les tests sur l'organisme entier sont donc incontournables. Cette phase de recherche pré-clinique est le filtre indispensable pour assurer la sécurité des futurs patients. Afin de réduire au maximum le nombre de modèles, des méthodes d'imagerie non douloureuses permettront de sélectionner au mieux les modèles avant leur entrée en procédure (screening échographique, angiographique, IRM, scanner / reconstruction 3D afin de simuler numériquement l'adéquation du prototype. L'ensemble des tests seront réalisés sous anesthésie générale, et 3 modes d'analgésie permettront de traiter la douleur, un mode local, et deux modes généraux de médicaments anti douleurs puissants comme la morphine. Ce projet permettra donc de développer des nouvelles techniques peu invasives dans le cadre des affections cardiaques.

18887 Du fait du fort nombre de cas de cancers et d'une mortalité associée encore élevée, l'oncologie représente un enjeu scientifique et clinique très important. Dans le but d'identifier de nouveaux candidats médicaments, les chercheurs développent de nouveaux outils in vitro permettant de sélectionner et d'optimiser des composés. Afin de développer de nouvelles approches thérapeutiques, nous proposons la réalisation de modèles expérimentaux de tumeurs métastatiques chez la souris. En effet, dans 90% des cas, la mortalité liée au cancer fait suite aux métastases de la tumeur primaire qui empêchent alors le bon fonctionnement des organes. Les modèles que nous proposons permettront d'évaluer l'effet bénéfique ou délétère de composés pharmacologiques dans ce contexte pathologique particulier. Nous développons de nouvelles approches thérapeutiques en oncologie ayant pour but de restaurer l'activité du système immunitaire et permettant ainsi un arrêt de la progression tumorale / l'élimination de la tumeur. Ces approches sont basées sur l'utilisation d'anticorps innovants ciblant une molécule impliquée dans l'échappement immunitaire tumoral ou alors l'injection de cellules immunes modifiées pour mieux reconnaître la tumeur et/ou booster le système immunitaire (thérapie cellulaire). Dans cette optique, nous proposons les modèles dans une activité de recherche pré-clinique sur des composés thérapeutiques (déjà utilisés en clinique ou en cours de développement), avec un nombre de 20 études par an, comprenant environ 140 souris par étude (pour un total sur 5 ans à 14000 souris). Nous proposons donc d'évaluer, les propriétés de nouvelles molécules ou de thérapies cellulaires particulières sur différents modèles

murins bien décrits dans la littérature. Ces modèles sont basés sur l'implantation de cellules tumorales sur des souris de même fonds génétiques que les lignées cellulaires. Dans le cas particulier d'étude sur des lignées de cellules tumorales humaines, nous proposons aussi des modèles sur des souris immunodéficientes. Les tumeurs sont des ensembles cellulaires complexes avec un fonctionnement de type « organe », c'est pourquoi l'utilisation de modèles animaux est justifiée et ne peut être substituée par de l'expérimentation in vitro. Ces expériences seront réalisées dans les meilleures conditions en respectant les règles de bioéthiques (grâce à l'utilisation d'analgésie, au recours à l'anesthésie) et conformément à la législation en vigueur. A ces fins, les composés testés auront été préalablement testés in vitro, afin de déterminer les doses à utiliser, de s'affranchir de la toxicité des composés et de limiter le nombre d'animaux. Les groupes sont de 10 animaux pour obtenir des tests statistiques robustes, évitant ainsi de réitérer une étude. Pour suivre l'évolution tumorale, nous aurons recours à des techniques d'imageries qui nous permettront d'éviter le sacrifice des animaux et ainsi de faire des suivis d'un même animal sur toute la durée de l'étude. Les animaux des études sont hébergés dans des conditions veillant au respect de leur bien-être (en fratrie) et avec un milieu enrichi afin de limiter leur stress. Les animaux sont suivis quotidiennement afin de détecter tout inconfort ou souffrance. Une étroite collaboration entre le personnel de l'animalerie et notre équipe d'expérimentateurs permet d'intervenir immédiatement sur les animaux en cas de nécessité.

18888 Cette autorisation est demandée en vue d'utiliser des animaux, plus spécialement des Lamas Glama et Alpaga qui servent pour la production d'anticorps monoclonaux (immunisation) à visée diagnostique ou thérapeutique. Les anticorps monoclonaux sont utilisés pour établir un diagnostic dans le domaine de la recherche scientifique et en thérapie. Ce sont des substances immunobiologiques qui réagissent de façon hautement spécifique avec certaines structures cellulaires. Ils sont utilisés en immunologie, virologie et biochimie ainsi que dans d'autres domaines de recherche. De nombreux tests de diagnostic modernes sont basés sur ces techniques (ELISA, ELISpot). Les anticorps monoclonaux ont permis d'avancer dans certains domaines de la recherche médicale, notamment en cancérologie avec la destruction sélective des cellules cancéreuses, le dépistage précoce du cancer et d'autres maladies ainsi que la possibilité de produire des immunoglobulines (sérum spécifique) à des fins thérapeutiques. Des milliers d'anticorps monoclonaux différents (dont beaucoup sont conjugués) sont proposés par diverses firmes, surtout aux USA, en Grande-Bretagne et en Hollande. En outre, de nombreux groupes de chercheurs développent leurs propres anticorps monoclonaux pour l'élucidation de questions spécifiques. Les Lamas ont la particularité de produire des anticorps à domaine unique que l'on appelle également des Nanobodies.

Il s'agit ici d'un projet d'immunisation qui est l'étape animale indispensable pour la réalisation de la technique de phage display. Une fois le sang collecté cette technique n'utilise plus les animaux.

La production d'anticorps monoclonaux se déroule en plusieurs étapes :

-l'immunisation du Lama contre un antigène

-la récolte de 300mL de sang dans lequel seront extrait l'ARN des lymphocytes B sécrétant les anticorps

-la modification de l'ARN extrait par une méthode de biologie moléculaire afin d'obtenir des clones sécrétant des anticorps spécifiques de l'antigène ayant servi à l'immunisation

Nous pensons faire 16 immunisations par an, soit 80 sur 5 ans. Un Lama peut être réutilisé pour une nouvelle vaccination après 6 mois de repos entre deux cycles d'immunisations donc 35 lamas seront suffisants.

Les Lamas seront sous la responsabilité de Diaclone le temps du projet. L'élevage des Lamas se fera dans une ferme spécialisée membre de l'AFLA (association française lamas et alpagas), afin de bénéficier de leur expérience et leur savoir-faire. Les injections et prélèvements seront réalisés par un vétérinaire travaillant avec la ferme depuis plusieurs années.

18889 Les coccidioses du poulet sont des maladies parasitaires très fréquentes dans les élevages, qui peuvent avoir un impact important sur la santé, le bien-être et la croissance des oiseaux atteints. La lutte contre ces maladies est obligatoire et deux approches sont majoritairement utilisées sur le terrain : des additifs coccidiostatiques dans l'aliment et des vaccins anticoccidiens. Les additifs coccidiostatiques sont confrontés à des résistances des parasites et une image négative auprès des consommateurs qui souhaitent un élevage utilisant des produits naturels. Les vaccins anticoccidiens sont coûteux et ne protègent pas les oiseaux pendant les deux à trois premières semaines, le temps de la mise en place d'une immunité protectrice efficace.

Dans une démarche de développement de nouveaux moyens de lutte contre les coccidies, nous participons à un consortium qui étudie des extraits végétaux. Une étape de criblage *in vitro* réalisée par un des partenaires a permis de sélectionner des candidats, et notre rôle est de vérifier et éventuellement confirmer leur intérêt pour contrôler les coccidies dans un modèle de reproduction expérimentale de la maladie sur poulets.

Des séries d'essais seront menées sur trois années avec des coquelets frères de poules pondeuses et des poulets de chair, en fonction des résultats *in vitro* et de la disponibilité des produits pour les essais *in vivo*. Au maximum, cinq essais avec coquelets sont prévus, avec 300 sujets mis en place pour chaque essai, et cinq essais avec poulets de chair avec 160 oiseaux mis en place pour chaque essai, soit un total pour les trois ans de 2. 300 oiseaux pour l'ensemble du projet.

La sévérité est modérée, le but étant de reproduire une coccidiose clinique sans mortalité chez les sujets témoins infectés. Les seules interventions sur les oiseaux seront les manipulations pour les pesées. Des prélèvements de sang seront réalisés lors de la mise à mort par saignée, après électronarcose les ayant rendus inconscients.

Ce projet vise à l'amélioration du contrôle des coccidioses en aviculture. Ces essais réalisés avec un modèle d'infection expérimentale adapté pour respecter la règle des trois R permettront d'évaluer des méthodes de criblage de molécules *in vitro*, qui pourront permettre, si elles sont pertinentes, de réduire ou de remplacer le recours à l'expérimentation animale pour ce genre d'investigations. Le modèle d'infection expérimentale est équipé des raffinements et enrichissements suivants : élevage en groupes homogènes, cordelettes suspendues pour stimuler l'activité des oiseaux, éclairage naturel complété par un éclairage artificiel en jours courts, qui permet de respecter le rythme circadien des oiseaux.

18890 Les maladies inflammatoires endommagent les vaisseaux et peuvent conduire à des perturbations de perméabilité vasculaire conduisant notamment à des oedèmes. Cependant, les facteurs circulants chez les malades et impliqués dans les changements de perméabilité ne sont pas tous connus. C'est pourquoi nous proposons d'étudier l'impact de sérums issus de malades ayant des artérites ou des maladies inflammatoires rénales sur la perméabilité vasculaire *in vivo* afin d'identifier les facteurs circulants responsables et de pouvoir tester de nouvelles cibles thérapeutiques dans ces maladies. L'espèce animale utilisée sera la souris car l'étude de la perméabilité induite par les sérums ne peut se restreindre à une étude *in vitro* sur une seule couche cellulaire mais doit être étendue au système vasculaire entier, la paroi vasculaire étant composée de plusieurs couches et les vaisseaux étant plus ou moins perméables selon leur localisation anatomique. Afin de respecter les règles d'éthique, la règle des «3 R Réduction/Remplacement/Raffinement» sera appliquée. Réduire le nombre d'animaux utilisé consistera à se limiter aux seules expériences absolument indispensables et à utiliser des statistiques lors de la conception du protocole expérimental pour une estimation préalable du nombre d'animaux nécessaire et suffisant à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Le concept de raffiner, autrement dit optimiser l'expérimentation, concerne la méthodologie appliquée aux animaux dans l'optique de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse subie par les animaux. Ainsi, le protocole sera planifié correctement afin d'éviter les perturbations susceptibles de limiter l'expérience et de plus, il sera établi des points limites les plus précoces possible en fonction de l'objectif de l'expérimentation. Enfin, chaque fois que cela sera possible le modèle *in vivo* sera remplacé par des modèles *in vitro* ou "in silico" (modèles mathématiques, bio-informatique). Les animaux disposent de nestlets, nids végétal à base de fibres

courtes de coton, utilisé comme enrichissement de l'environnement et matériau de nidification, ainsi que de tunnels afin de réduire l'ennui et de diminuer le stress en stimulant l'activité et en procurant un sentiment de sécurité à l'animal. Ainsi, nous utilisons le nombre d'animaux nécessaires à la réalisation de tests statistiques selon la méthode statistique pour le calcul d'effectif, soit un total de 100 souris.

18891 Développée à partir des années 80 en médecine humaine et encore largement utilisée aujourd'hui, la cryothérapie corps entier (CryoCE) pourrait avoir des effets bénéfiques chez l'athlète dans le cadre de la récupération post-effort et plus largement dans la prise en charge des affections myo-arthro-squelettiques qu'elles soient d'origine traumatique, sportive ou dégénérative. Ce procédé s'appuie sur un refroidissement rapide du corps (choc thermique) conduisant à un ensemble de processus physiologiques à l'origine de ses effets.

Chez le cheval les affections ostéo-articulaires et tendineuses représentent également une dominante pathologique et sont une des causes les plus fréquentes d'arrêt de carrière et de baisse de performances chez les chevaux de sport et de courses. Elles affectent aussi le vieux sujet exposé aux lésions d'arthrose dégénérative. Outre les conséquences sur le bien-être des chevaux affectés et la carrière sportive des athlètes, ces affections sont la cause de pertes économiques majeures directes et indirectes pour la filière équine.

L'objectif du développement de la CryoCE chez le cheval est d'améliorer la prise en charge des affections locomotrices et d'améliorer la récupération des chevaux athlètes post-effort.

Le présent projet a pour objectif de vérifier l'innocuité et la tolérance de la CryoCE chez le cheval et d'en étudier les effets biologiques. Pour ce faire 3 séances de CryoCE seront réalisées à 24 heures d'intervalle de durée progressivement augmentée (3, 5, 7 minutes) sur un effectif de 6 chevaux sains. En cas d'absence d'effet biologique observé et de bonne tolérance de la séance à 7 minutes une dernière séance de 9 minutes 24 heures après la troisième sera mise en place. Ces séances sont réalisées grâce à un van de cryothérapie utilisant de l'azote propulsé à -140°C. Un système de ré-aspiration du gaz, et le fait que le cheval garde la tête à l'extérieur du van, permet de limiter le risque d'inhalation d'azote par ce dernier. Outre l'évaluation du stress éventuel du cheval un suivi des paramètres vitaux, une évaluation de la fonction respiratoire et un suivi des paramètres biologiques sanguins seront réalisés afin de valider la tolérance et l'innocuité des séances de CryoCE. L'évaluation des effets biologiques, se basera sur le suivi de la température corporelle, et cutanée par un examen thermographique, ainsi qu'une étude des effets vasculaires périphériques et centraux et une évaluation de la locomotion du cheval avant et après séance.

Il est attendu que la CryoCE soit bien tolérée et inoffensive pour le cheval et qu'elle induise un refroidissement corporel suffisant pour produire des effets biologiques potentiellement bénéfiques. Il n'est pas attendu de dommages susceptibles de nuire à l'intégrité physique des chevaux.

Conformément au principe de raffinement, aucun examen post-mortem n'est envisagé, les chevaux seront gardés en vie en fin de protocole. Enfin toujours concernant le raffinement, les chevaux seront les chevaux seront hébergés dans leur environnement naturel (paddock en herbe avec abris) pour limiter le stress, et seront examinés (visuellement) au moins deux fois par jour afin de s'assurer de leur bien-être. Ils ne seront hébergés en box (4x4mètres) que les deux semaines précédant les séances de CryoCE et la semaine où elles seront réalisées.

Lorsqu'ils seront en box, un contact visuel entre eux sera assuré et une mise à disposition permanente de fourrage et d'eau sera réalisée. Pour la réalisation des manipulations un effort permanent de limitation du stress va être mené en habituant préalablement les chevaux à monter et stationner dans le van de cryothérapie, dont le design est similaire à un van de transport avec ouverture à la tête pour limiter le stress. L'évaluation des voies respiratoires par endoscopie sera réalisée sous sédanalgie. Enfin le protocole autorise en cas de réaction locale (non attendue), de douleur de l'animal, le recours à l'utilisation d'anti-inflammatoires et d'analgésiques appropriés.

Le principe de remplacement ne peut s'appliquer à notre projet car il existe des spécificités d'espèce (épaisseur de la peau, rapport masse corporelle / surface corporelle, stratégies de thermorégulation,

comportement) qui nécessitent de travailler sur l'espèce cible car les données recueillies sur d'autres espèces ne pourraient être transposables au cheval.

Le nombre de 6 chevaux a été défini comme le meilleur compromis entre limité au maximum le nombre d'animaux tout en ayant un effectif suffisamment large pour être représentatif.

18892 De nombreuses cellules de notre organisme sont pourvues de cils primaires. Ce sont des extensions du cytoplasme de ces cellules. Ils permettent de transmettre un stimulus (mécanique, chimique, lumineux, ...) qui arrive depuis l'extérieur vers l'intérieur de la cellule, provoquant ainsi une série de réponses. Ces cils primaires peuvent par exemple contrôler le cycle cellulaire ou la polarité d'une cellule épithéliale.

Chez l'homme comme chez la souris, au niveau de la rétine, il existe des neurones appelés photorécepteurs. Au niveau de ces photorécepteurs, l'élément responsable de la vision est un cil primaire spécialisé. Il transforme le stimulus lumineux en influx nerveux.

Au niveau de la rétine, il existe également des cellules juxtaposées les unes aux autres et qui forment un tissu que l'on appelle épithélium rétinien pigmentaire ou RPE. Les cellules du RPE émettent elles aussi in vivo un cil primaire dont on ignore le rôle dans la vision.

Dans le système visuel, que ça soit au niveau des neurones photorécepteurs ou des cellules du RPE, lorsque les cils primaires sont défectueux, cela a pour conséquence de nombreuses maladies classées dans la catégorie " ciliopathie" ; conduisant dans la majorité des cas à une cécité.

Récemment, il a été démontré l'implication de notre protéine d'intérêt dans la régulation de la formation du cil primaire dans des cultures cellulaires issus d'épithéliums pigmentaires rétiens (RPE) humains.

Notre projet vise à apporter une meilleure compréhension in vivo des maladies rétiennes classées dans les ciliopathies. Pour cela, notre hypothèse de travail est que notre protéine d'intérêt pourrait être impliquée dans les mécanismes de la vision au niveau des photorécepteurs et des cellules RPE car peu de protéines sont actuellement connues pour être impliquées dans la formation de ce cil primaire au niveau de l'œil.

Suite à des expériences réalisées in vitro sur des cultures de cellules, nous nous sommes intéressés au rôle in vivo de notre protéine d'intérêt dans le système visuel de souris mâles C57Bl6/J.

Nous avons d'ores et déjà réalisés une série d'expériences au niveau des neurones photorécepteurs et de l'épithélium pigmentaire rétinien (RPE) de ces souris. L'ensemble de ces résultats scientifiques générés a été soumis pour publication à une revue scientifique. Cependant, l'un des rapporteurs de la revue scientifique dans laquelle nous souhaitons publier nos résultats nous demande des expériences complémentaires.

C'est dans ce cadre que nous souhaitons réaliser chez des souris C57Bl6/J des expériences de micro-injection dans l'œil. En pratique, il s'agira d'une microchirurgie sous anesthésie générale qui consiste à introduire une aiguille de diamètre 34G soit environ 0.3mm de diamètre dans l'oeil d'une souris; ceci afin de pouvoir lui injecter un produit inoffensif afin d'en connaître sa localisation. Cette expérience nous permettra de pouvoir finaliser la publication de notre article et porter ainsi les résultats de nos recherches à la connaissance de la communauté scientifique internationale.

Afin de prendre au mieux en considération toute souffrance éventuelle de nos animaux, nous mettrons en application la règle des 3Rs de la façon suivante :

Remplacement :

L'ensemble des expériences de caractérisation de notre protéine d'intérêt a été fait sur des cultures de cellules. L'étude chez des souris C57Bl6/J a également été faite. Cependant afin de pouvoir valoriser les résultats déjà générés, nous devons réaliser des expériences complémentaires sur la souris. Et pour cela, notre seule possibilité est d'utiliser des souris C57Bl6/J du même âge.

Réduction

Nous souhaitons vérifier si le produit injecté se retrouve dans l'une des 4 couches qui composent la rétine. Nous avons calculé le nombre d'animaux nécessaires en fonction. Nous prévoyons 35% d'animaux en plus afin de pallier aux aléas expérimentaux. Cependant, dès lors que nous aurons

obtenu notre réponse statistiquement robuste sur la localisation du produit injecté, nous arrêterons les expérimentations.

Raffinement

Bien que n'occasionnant aucune douleur et ce afin de minimiser le stress de nos animaux, nous réaliserons nos expériences de micro-injection sous anesthésie générale. Nous appliquerons également un anesthésique local au niveau de l'œil avant injection à titre préventif. Enfin, nous avons défini des points limites précis, précoces et adapter à notre expérience de micro injection dans l'œil ainsi qu'une grille de score précisant les actions mises en place en cas d'éventuels signes de gêne. Le détail de cette grille de score se trouve en annexe de ce présent projet.

Dans ce projet, nous utiliserons au maximum 68 souris

18893 L'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) est classée en danger critique d'extinction depuis 2008 par l'UICN (Union Internationale pour la Conservation de la Nature). Actuellement, l'origine et la quantité des anguilles argentées qui contribuent au stock reproducteur restent inconnues. Le stade argenté de l'anguille constitue son dernier stade de vie en milieu continental et signale son départ imminent pour sa migration retour vers sa zone de reproduction de l'autre côté de l'océan Atlantique. Depuis 2007, des plans de gestion nationaux de l'anguille sont instaurés conformément au règlement européen (n°1100/2007). L'étude vise un des sites retenus par le plan de gestion Anguille français sur le bassin Rhône-Méditerranée pour suivre l'état de la population de l'anguille européenne. Ce plan y fixe des objectifs de suivis du recrutement et d'échappement. Aujourd'hui, il apparaît indispensable de mieux comprendre le déroulement de la dévalaison des anguilles vers la mer, une étape du cycle de vie qui reste d'ailleurs méconnue sur l'ensemble du bassin Rhône-Méditerranée. La compréhension de cette migration et de l'ensemble des facteurs pouvant l'influencer permettra d'adapter la gestion des usages (modalité de gestion des ouvrages de connexion, quotas et période de pêche).

La présente action s'inscrit dans un projet à but de conservation de l'anguille européenne. Il a pour objectif de suivre une sous-population en capture-marquage-recapture (CMR) et de suivre le déplacement des individus à l'aide d'un système télémétrique RFID (radio-frequency identification) au niveau d'un bassin hydrographique connecté à un système lagunaire. Le suivi en télémétrie RFID consiste à détecter le passage d'individus marqués avec un code alpha-numérique unique par une station d'écoute fixe. Les objectifs de ce projet sont (i) de tester la technologie RFID dans un canal relativement profond (1m-1m50) et qui peut varier de conductivité au cours du temps, (ii) de suivre les déplacements de la sous-population des anguilles entre deux systèmes hydrographiques, et (iii) de caractériser les facteurs influençant la dévalaison grâce au suivi en parallèle des paramètres environnementaux. L'étude portant sur le comportement de poissons en milieu naturel, l'expérimentation doit être réalisée avec des individus capturés dans le milieu, et ne peut donc s'affranchir de l'emploi de poissons sauvages. Afin de considérer les déplacements longitudinaux de l'anguille en fonction de son stade de vie (jaune ou argenté) et de la variabilité environnementale (température, salinité, précipitations, etc.), il est nécessaire de mener cette étude sur plusieurs années. En effet, une anguille femelle met en moyenne 4 à 5 ans pour devenir argentée, et parfois beaucoup plus (7-12 ans). Afin d'obtenir des résultats pertinents, représentatifs de la sous-population de l'anguille, une estimation maximale de 500 anguilles la première année puis de 350 anguilles les 4 années suivantes seront marquées, soit un total de 1850 individus utilisés au maximum. Ce projet durera 5 années. Une procédure expérimentale est mise en oeuvre nécessitant la capture des individus à l'aide de verveux, engins de capture passifs, et le marquage des individus avec des transpondeurs type PIT-Tags de 23mm de longueur. Le marquage des individus s'effectue sous anesthésie et analgésie. Une fois un individu marqué, il pourra être détecté en continu à au moins deux points de passage. Le suivi RFID est un moyen de raffiner le suivi en capture-marquage-recapture, puisqu'il permet de suivre à distance le déplacement d'individus marqués (de recapter leur signalement) sans avoir à les manipuler à nouveau.

18894 L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) est une technique d'imagerie biomédicale qui n'utilise pas de radioactivité et qui permet d'obtenir de nombreuses informations tant anatomiques que

fonctionnelles. Cependant, elle possède certaines limites, comme, par exemple, l'impossibilité de voir les poumons, qui apparaissent en « noir » sur l'image. En effet, l'IRM classique « photographie » l'eau présente dans le corps tandis que les poumons sont remplis d'air.

Une alternative consisterait à utiliser une nouvelle technique d'IRM qui détecterait non pas l'eau mais un gaz préalablement inhalé par le sujet. Cette technique, très sensible, « illuminerait » les poumons remplis du gaz inhalé et serait complémentaire de l'IRM classique, en constituant un outil d'imagerie pour le diagnostic des maladies pulmonaires les plus fréquentes, parmi lesquelles l'asthme, la fibrose kystique (mucoviscidose), et la broncho-pneumopathie chronique obstructive.

Le but de notre projet est de montrer la faisabilité de cette technique sur des modèles rongeurs sains. Le gaz employé sera le xénon, déjà utilisé à l'hôpital en tant qu'anesthésiant. Pour augmenter la sensibilité de sa détection par IRM, il sera hyperpolarisé, ce qui ne changera en rien ses propriétés biologiques

De plus, il sera possible d'encapsuler le xénon hyperpolarisé par des molécules qui permettront d'associer le signal xénon hyperpolarisé à une cible biologique spécifique (par exemple, en ciblant des marqueurs du cancer).

Ce projet IRM à très haut champ (très sensible) à un montage permettant de délivrer du xénon hyperpolarisé. Il se divisera en deux grandes parties : 1) l'optimisation de la méthodologie pour pouvoir obtenir des images des poumons par IRM du xénon hyperpolarisé et 2) la détection d'une molécule encapsulante préalablement administrées dans les poumons. Pour la première partie, le xénon hyperpolarisé sera inhalé par l'animal via un masque, et des images de ses poumons seront ensuite immédiatement acquises par IRM. Pour la seconde partie, après anesthésie générale, les animaux recevront par instillation nasale une dose de la molécule, puis, une fois installés dans l'IRM, ils respireront le xénon hyperpolarisé pour permettre l'enregistrement du signal.

Le modèle animal choisi est le rat. Il est fondamental dans notre cas, puisque l'étude des poumons ne peut se faire que sur un organisme vivant entier. Ce projet sera réalisé en respectant les principes fondamentaux de l'expérimentation animale : le nombre d'animaux nécessaire sera réduit au minimum, et autant que faire se peut, plusieurs expériences seront effectuées sur chaque animal. Ainsi 100 animaux seront répartis sur 5 ans pour permettre des sessions de travail régulières. Enfin, le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de leur séjour au laboratoire en garantissant des conditions d'hébergements optimales que par la définition et le suivi de points limites adaptés pour éviter toute souffrance inutile.

18895 La reproduction chez les ovins et caprins est saisonnée. Chez les deux sexes, il existe au cours de l'année une période d'activité sexuelle maximale (saison sexuelle), généralement d'août à janvier, et une autre d'activité minimale ou de repos sexuel (contre-saison), de février à juillet. La durée de la saison sexuelle est très variable selon les races. La reproduction des brebis et des chèvres en contre-saison permet aux éleveurs d'étaler la production de lait ou de viande sur l'année, et ainsi de répondre à la demande des consommateurs.

Dans le cadre d'une mise à la reproduction en contre-saison (« désaisonnement »), l'insémination animale (IA) est pratiquée chez les petits ruminants quasi exclusivement après un traitement hormonal d'induction et de synchronisation des chaleurs et des ovulations (mimant les mécanismes endocriniens naturels). Cette méthode est aujourd'hui la plus efficace pour désaisonner la mise à la reproduction par une très bonne synchronisation des ovulations, sur une période de l'ordre de 12 à 24 h, permettant de pratiquer l'IA (par un technicien spécialisé) à un moment prédéterminé (sans nécessité pour l'éleveur de détecter les chaleurs des femelles). Le traitement utilisé en France (pour pratiquer l'IA chez les brebis et les chèvres) consiste à administrer à la femelle une éponge intra-vaginale imprégnée d'un progestagène de synthèse (acétate de flugestone) puis à faire une injection d'une hormone gonadotrope, appelée eCG (choriogonadotropine équine, sécrétée par le placenta de jument, PMSG en anglais).

L'utilisation répétée de l'eCG au cours de la vie de l'animal est cependant souvent suivie d'une diminution de la fertilité après IA, en raison de la mise en place d'une réaction immunitaire. En outre, le mode de production de cette hormone (extraite à partir du sang de jument gravide) pose de

graves problèmes en termes de bien-être animal. Dans ce contexte, la recherche et le développement de méthodes alternatives en remplacement de l'utilisation d'eCG sont nécessaires, d'autant qu'il existe un fort enjeu autour du maintien de la pratique de l'IA (limitant la consanguinité dans les troupeaux, permettant l'organisation des schémas de sélection génétique et présentant des garanties sanitaires). Des alternatives aux traitements hormonaux existent ou sont en développement. Cependant, les ovulations sont moins bien synchronisées, ce qui implique une détection préalable des chaleurs des femelles, et les IA doivent alors être réalisées sur plusieurs jours pour un même élevage, ce qui est actuellement impossible avec l'organisation logistique sur le terrain. A court-terme, il reste nécessaire de poursuivre le développement de traitements vétérinaires posant moins de problème en termes de bien-être animal et d'enjeux environnementaux.

L'objectif du projet est de tester chez des brebis en contre-saison (printemps) un nouveau protocole basé sur un traitement photopériodique (jours naturels puis implant sous-cutané de mélatonine) préalable à un traitement d'induction des ovulations : éponge intra-vaginale imprégnée d'un progestagène de synthèse et une injection de GnRH de synthèse (remplaçant l'injection de l'hormone eCG), toutes ces molécules étant des médicaments vétérinaires commerciaux.

Au total, 45 brebis seront utilisées pour ce projet. Elles seront réparties en 5 lots expérimentaux de 9 brebis, de façon à déterminer le protocole le plus efficace, avec un lot témoin traité avec le protocole utilisé classiquement en élevage (éponge + eCG), et 4 lots (éponge + GnRH) permettant de tester à la fois le moment d'injection de GnRH (24 h ou 36 h après retrait d'éponge) et l'intérêt d'associer (ou non) un traitement photopériodique au préalable.

Pour cela une première procédure concerne la réalisation de prises de sang sériées dans le temps sur les 45 brebis pour évaluer l'état de cyclicité de ces femelles (dosage de progestérone) avant la synchronisation des ovulations, puis après cette synchronisation pour établir les profils hormonaux de réponse à l'induction des ovulations (dosages de progestérone et de LH plasmatiques). La seconde procédure concerne l'induction et la synchronisation des ovulations à l'aide de traitements vétérinaires commerciaux : pose d'un implant de mélatonine pendant 40 jours (pour 2 lots de brebis), pose d'une éponge intra-vaginale de progestagène pendant 14 jours (pour les 5 lots). Une injection intramusculaire unique d'hormone gonadotrope eCG sera réalisée au retrait de l'éponge (pour le lot témoin), ou remplacée par une injection de GnRH soit 24h (pour 2 lots) soit 36h (pour 2 lots) après le retrait d'éponge. Une troisième procédure concerne la réalisation d'endoscopies par voie abdominale afin d'évaluer, 7 jours après le retrait d'éponge, le nombre d'ovulations et la taille des corps lutéaux issus de ces ovulations.

Lors de ce projet, la règle des 3R sera suivie ainsi :

- Remplacement : les tests d'efficacité de traitements hormonaux pour induire et synchroniser des ovulations ne peuvent être réalisés qu'avec l'utilisation d'animaux vivants. Aucune alternative n'existe.
- Réduction : Les données acquises sur l'utilisation de longue date de l'hormone commerciale eCG permettent de réduire le nombre de brebis à 9 par lot expérimental de façon à mettre en évidence une différence d'effet si elle existe.
- Raffinement : Les prises de sang aux veines jugulaires, poses d'implants sous-cutanés et d'éponges intra-vaginales et injections intramusculaires seront réalisées par du personnel animalier expérimenté pour ce type de gestes. L'endoscopie sera réalisée selon le protocole habituel déjà validé par le comité d'éthique, qui comprend notamment une tranquillisation et une anesthésie locale, et mis en oeuvre par des personnes qualifiées permettant de limiter au maximum le stress et la douleur. Ce projet sera réalisé en condition d'élevage classique respectant le comportement grégaire de cette espèce. Les brebis seront hébergées en lots sur litière paillée. Des interactions positives avec le personnel animalier en dehors des procédures (phases d'alimentation, de soins aux animaux) permettent de limiter le stress des brebis pendant les procédures expérimentales.

18896 Notre intérêt pour l'immunothérapie a explosé ces dernières années grâce à l'apparition de nouveaux types de traitement. Ces traitements sont capables de permettre la mise en place d'une

réponse de longue durée contre le cancer mais chez un nombre limité de patients. Un autre traitement appelé anti-VEGF empêche la création de nouveaux vaisseaux sanguins dans la tumeur, limitant ainsi la croissance tumorale en la privant des nutriments et de l'oxygène apportés par le sang. Plusieurs études ont montré que l'anti VEGF était également capable d'augmenter l'efficacité des traitements d'immunothérapies. Cependant, les mécanismes permettant d'expliquer cette amélioration restent encore à découvrir et plus particulièrement ceux impliquant les cellules du système immunitaire, nos fameux globules blancs. C'est pourquoi nous souhaiterions étudier l'efficacité de cette association de traitements dans des souris portant différents types de tumeurs afin de déterminer l'implication du système immunitaire dans la réponse anti-tumorale observée.

Après l'injection de cellule tumorales dans la patte, les tumeurs seront traitées par immunothérapie en association ou non avec l'anti VEGF, afin de pouvoir discriminer les effets de chacun des traitements. Dix jours après l'injection, lorsque la tumeur est mesurable, les souris seront traitées avec un contrôle, ou une immunothérapie en association ou non avec un anti-VEGF. Nous étudierons les populations immunitaires présentes dans la tumeur à différents temps après traitement afin de pouvoir établir une chronologie des événements s'y déroulant après traitement. La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R. De plus, nous avons fait appel à une méthodologiste afin de déterminer au mieux le nombre minimal de souris requis pour que nos tests statistiques soient suffisamment puissants, ce qui permet donc de réduire le nombre d'animaux contrôle et donc le nombre total d'animaux de l'étude. Des études préliminaires ont été réalisées sur les cultures de cellules in vitro limitant ainsi l'utilisation d'animaux (remplacement). Enfin, la totalité des procédures impliquant un inconfort potentiel des animaux (injections sous-cutanées des tumeurs) seront réalisées sous anesthésie, les souris bénéficieront de cages enrichies en jouet et elles seront habituées aux méthodes de contention et aux mesures par pied à coulisse avant le début de l'expérimentation permettant ainsi le raffinement de l'étude. Cette étude nécessitera 720 souris C57Bl6 et 720 souris Balb/C.

18897 La Covid19 est une maladie causée par le virus Sars-Cov2 identifié à la fin de l'année 2019. Bien qu'elle ait été d'abord décrite comme une pneumonie virale, cette pathologie peut présenter différentes formes avec un degré de sévérité variable. Quatre stades ont été décrits, le premier est défini par une infection des voies respiratoires supérieures, cette étape est ensuite suivie de dyspnée et d'une pneumonie. Le troisième stade se caractérise par une tempête cytokinique entraînant un état hyper-inflammatoire. Enfin la quatrième étape se solde par le décès du patient ou son rétablissement.

Il est maintenant admis que les facteurs intrinsèques des patients, incluant l'âge, le sexe, les comorbidités, sont des déterminants clés dans la progression et la sévérité de la maladie.

De nombreuses molécules ont été testées au cours des derniers mois sans pour autant enrayer le nombre croissant de morts. Très récemment des vaccins ont été mis sur le marché avec des efficacités variables et ne pouvant être administrés à tous les publics en attendant les résultats d'études complémentaires.

Cette pandémie est actuellement un problème de santé majeur ayant un très fort impact sur l'économie mondiale. Il est donc important de maintenir un effort conséquent dans la recherche de nouveaux traitements et vaccins.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'efficacité de vaccins et médicaments candidats sur la réponse anti-virale au Sars-Cov2. Pour cela des souris sensibles au Sars Cov2 seront vaccinées ou traitées à l'aide de candidats médicaments. Elles seront par la suite infectées avec le Sars Cov2 et leur réponse immunitaire sera analysée. Nous envisageons d'utiliser 1620 animaux sur la totalité du projet.

Dans le respect de la règle des 3R, et lorsque cela est possible ces candidats médicaments sont évalués sur culture cellulaire ou organe isolé préalablement aux tests animaux afin de remplacer et/ou de réduire le nombre d'animaux impliqués dans les protocoles. Dans le but également de réduire le nombre d'animaux, nous utiliserons le nombre minimum de souris nécessaire à une analyse statistique en prenant en compte la variabilité inter-individuelle. D'autre part, un raffinement

des protocoles sera effectué en fonction des avancées technologiques dans le domaine. Les souris sont hébergées selon les conditions de la nouvelle réglementation 2010/63 en unités individuelles ventilées de type III ou IV avec enrichissement de l'environnement (composants de nidification et igloo). Chaque animal entrant dans une étude disposera d'une fiche individuelle de suivi sur laquelle tous traitements et observations seront reportés. L'état de santé des animaux sera évalué quotidiennement selon des critères définis par l'association française des sciences et techniques de l'animal de laboratoire : apparence physique (perte de poids significative, gêne respiratoire. . .), comportements (souris prostrée, agressivité. . .) définis en accord avec le comité de suivi du bien-être animal de notre établissement. Une dégradation trop importante de l'état de santé pourra entraîner l'arrêt immédiat de l'expérimentation. Certains critères suffiront à eux seuls à l'arrêt de l'expérience tels qu'une perte de poids trop importante, la suffocation ou le coma de l'animal.

18898 La fibrose cardiaque représente un enjeu majeur de santé publique car c'est un des événements importants pouvant conduire à l'affaiblissement du cœur et à l'insuffisance cardiaque. Les mécanismes conduisant aux modifications de la paroi du cœur sont très complexes et insuffisamment compris, ce qui limite l'efficacité des traitements employés pour les combattre.

Notre objectif est d'étudier un régulateur de la modification des tissus qui est produit dans le cœur, mais dont le rôle reste à éclaircir. Ce projet nous permettra de déterminer si le régulateur étudié pourrait être une cible thérapeutique dans le traitement de la fibrose cardiaque. Les progrès réalisés actuellement en terme de thérapie génique permettent d'envisager le développement de nouveaux traitements prometteurs, nos résultats pourraient ainsi offrir de nouvelles perspectives dans la lutte contre cette pathologie.

Ce régulateur a en effet déjà montré avoir un rôle dans de nombreuses maladies liées à la fibrose (maladies vasculaires, cancer), et nous souhaitons mesurer son effet dans le développement de la fibrose cardiaque à l'aide d'un modèle reproduisant ce phénomène chez la souris. Ce modèle sera généré chez des souris qui produisent ce régulateur et chez des souris qui n'en produisent pas après modification génétique. L'absence de ce régulateur chez les souris n'a pas d'incidence sur leur qualité de vie en condition normale, mais elle pourrait avoir une conséquence sur le développement de la fibrose. Celle ci sera induite grâce à l'implantation sous la peau du dos de la souris adulte d'une pompe délivrant une molécule induisant une hypertension et qui est fibrosante pour le cœur. Cette procédure s'effectuera sous anesthésie et analgésie avec un suivi post-opératoire.

La pression artérielle des souris sera mesurée grâce à un brassard de queue. Cette procédure est totalement indolore et doit être réalisée chez l'animal vigile car l'anesthésie influence la pression artérielle. Afin de ne pas entraîner d'inconfort pour les animaux, ni d'incohérence dans les résultats, les souris bénéficieront d'une période d'acclimatation à la machine de mesure durant 5 jours afin de réduire leur stress. Les animaux passeront alors l'examen de leur pression artérielle une première fois avant l'implantation de la pompe, puis après 7 jours ainsi qu'à la fin de la procédure, qui est à 14 jours.

Le fonctionnement correct du cœur chez ces animaux sera quant à lui contrôlé sous anesthésie par échographie à 7 et 14 jours après l'implantation. En effet, la fibrose est silencieuse et ne donne lieu à aucun symptôme mesurable visible. L'échographie du cœur est le seul moyen dont nous disposons pour évaluer et de suivre le développement de la fibrose chez les animaux. Les cœurs seront ensuite étudiés après euthanasie des animaux à la fin de la procédure (à 14 jours), par des techniques d'histologie. Différents groupes seront constitués afin de mesurer l'effet de la molécule fibrosante par rapport à celui d'une molécule placebo contrôle. Ainsi au total ce projet utilisera 100 souris sur une durée de 5 ans: 50 mâles et 50 femelles, car la fibrose cardiaque touche aussi bien les hommes que les femmes. La règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner) sera respectée: Des expériences seront menées in vitro sur des cellules cardiaques en culture afin de remplacer autant que possible l'utilisation de ces animaux. Cependant, la complexité des mécanismes à l'origine de la fibrose cardiaque requiert l'utilisation d'un organisme complet. Nous réduirons au maximum le nombre de souris utilisées, tout en nous assurant que les études réalisées nous permettent d'effectuer les analyses statistiques nécessaires. Nous raffinerons l'environnement des animaux

par enrichissement de leur milieu de vie. Les animaux seront surveillés quotidiennement afin de suivre la bonne cicatrisation des sutures et le suivi clinique est effectué 2 fois par semaine afin d'anticiper les points limites à l'aide d'une grille d'évaluation de la souffrance. Les critères de traitement pour soulager l'animal (administration d'anti-douleur) et/ou les critères d'arrêt (euthanasie) définis seront appliqués selon le score observé. Tous les animaux seront euthanasiés en fin de procédure.

18899 L'apparition de métastases constitue un mauvais pronostic dans le traitement du cancer du sein par la plus grande difficulté à intervenir chirurgicalement et à éradiquer les cellules métastatiques par chimiothérapie, radiothérapie ou immunothérapie. La compréhension des mécanismes d'apparition de ces cellules demeure prépondérante pour développer des traitements aptes à réduire la mortalité par cancer. L'échappement des métastases du site tumoral primaire requiert de la part de la cellule cancéreuse des capacités fonctionnelles et métaboliques nouvelles pour disséminer dans l'organisme. Ces propriétés émergentes conduisent à des modifications de la composition lipidique et pourraient impliquer une nouvelle enzyme du métabolisme lipidique. Nous avons montré que l'expression de cette enzyme était un marqueur de risque de métastases chez des patientes atteintes d'un cancer du sein. De plus, nous avons montrés dans des modèles murins mimant les différentes formes humaines de cancers mammaires que cette enzyme contrôle la croissance tumorale et le développement de métastases. Nous avons identifié in vitro des voies de signalisation qui pourraient expliquer cette observation et qui pourraient par leur modulation améliorer le traitement par des agents anti-cancéreux. Notre projet vise donc à tirer avantage du modèle murin de cancer mammaire spontané avec métastases MMTV-PyMT-Elov15 établi dans notre laboratoire utilisé dans le projet (APAFIS #17461) et du modèle de transplantation de cellules cancéreuses avec une expression modulée de cette enzyme utilisés dans les projets (APAFIS #22358 et #14557) pour valider les voies de signalisation identifiées et évaluer l'effet de chimiothérapies et d'immunothérapies afin d'obtenir une meilleure réponse thérapeutique dans un cancer avec une expression du marqueur Elov15 modifiée.

Remplacement : L'utilisation de ces modèles murins de cancer sont nécessaires car la progression tumorale et le processus métastatique sont des mécanismes complexes ne pouvant être modélisés in vitro. En effet, la capacité de dissémination des cellules cancéreuses par la voie sanguine et de colonisation des tissus pulmonaires ne peut s'observer que dans un modèle animal. Ainsi, les similarités physiologiques et métaboliques entre la souris et l'Homme permettront de transposer les résultats obtenus à la situation des patients atteints de cancer. Réduction : Pour limiter le nombre d'animaux utilisés, nous avons déterminé l'effectif nécessaire par groupe en s'appuyant sur notre expérience antérieure en prenant en compte la variabilité interindividuelle et à l'aide d'un outil statistique prédictif permettant d'obtenir un résultat fiable et analysable. Raffinement : Les souris soumises à cette procédure expérimentale seront maintenues en groupe pour favoriser la socialisation et placées dans un environnement calme avec enrichissement structural du milieu permettant la construction de nid. Les souris seront maintenues sans traitement antalgique pour ne pas interférer avec la réponse inflammatoire et éviter des modifications de croissance tumorale. Elles seront surveillées quotidiennement et tout signe de douleur ou souffrance conduira à leur mise à mort. Au total, 440 souris femelles sur un fonds génétique C57/Bl6 ou Nude seront utilisées.

18900 L'espérance de vie des femmes est passée de 48 ans à plus de 80 ans en un siècle. L'arrêt de la production d'œstrogènes à la ménopause (51 ans en moyenne) entraîne souvent un cortège de troubles fonctionnels (impactant la qualité de vie) et une moindre protection artérielle, métabolique et osseuse. Le traitement de la ménopause est donc un défi relativement récent, qui a connu des aléas à la suite de l'étude américaine réalisée chez des patientes en période largement post-ménopausique. Notre équipe travaille depuis longtemps à comprendre les effets protecteurs des œstrogènes vis-à-vis du développement de l'athérosclérose et du diabète de type II dans des modèles animaux. Grâce à des modèles de souris transgéniques uniques, nous essayons de comprendre comment les œstrogènes protègent le système vasculaire.

Pour évaluer l'impact du vieillissement et de la privation oestrogénique sur le système cardiovasculaire, les souris femelles, sauvages ou transgéniques jeunes (3mois), en milieu de vie (12 mois) ou vieilles (22-24 mois) subissent ou non une ablation des ovaires pour supprimer la production endogène d'œstrogènes. Différents paramètres seront analysés pour évaluer le système vasculaire de ces animaux.

De la naissance à la mort, les souris sont hébergées selon les conditions de la directive européenne, régies par les principes de remplacement, de réduction et de raffinement (Règle des 3 R). Chaque lot de souris est composé de groupes sauvages et transgéniques ciblant le récepteur des œstrogènes. 1000 animaux seront utilisés dans ces 4 procédures permettant d'étudier les effets vasculaires. Le nombre de souris utilisées a été calculé pour donner des résultats statistiquement significatifs par un test ANOVA 2 facteurs (effet de la mutation génique et de l'âge).

Le bien-être de l'animal est bien pris en compte avec enrichissement du milieu, et les conditions d'anesthésie sont adaptées à chaque procédure chirurgicale. Pendant les chirurgies, les souris sont maintenues sur des tapis chauffant et des anti douleurs sont utilisées pour les procédures modérées. Les souris sont surveillées quotidiennement.

L'ensemble des effets étudiés étant des effets physiologiques ou physiopathologiques, il n'y a pas d'autre alternative d'étude que l'utilisation d'animaux vivants. L'analyse des fonctions vasculaires ne peut être modélisée en boîte de pétri. Il n'y a donc pas d'alternative de remplacement. Le choix de l'espèce s'est orienté vers la souris car c'est le seul modèle pour lequel a été générée l'invalidation génique du récepteur aux œstrogènes de façon tissu-spécifique.

18901 Notre processus de production assure la production d'anticorps polyclonaux (AcP) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun sa spécificité propre, c'est-à-dire portant des récepteurs qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par l'immunogène étranger. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une certaine structure. La réponse humorale polyclonale résulte de la production d'anticorps sécrétés par plusieurs populations clonales ayant diverses spécificités (pour des épitopes différents, y compris ceux situés sur une même molécule), affinités et classes, et représente donc une forme de défense efficace contre les pathogènes. Les AcP possèdent des affinités différentes pour divers épitopes et peuvent se lier à plusieurs sites différents d'un même immunogène ou antigène complexe, ce qui leur confère une excellente capacité globale de liaison. Les AcP ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western Blot, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunoelectromicroscopie.

Les antisérums (extrait du sang d'un animal ou d'un homme contenant des anticorps) sont généralement produits par injection à un animal de l'immunogène (antigène : Ag) cible, souvent combiné à un adjuvant qui accroît la réponse immunitaire. La réponse immunitaire peut par la suite être amplifiée par des injections de rappel d'antigène avec ou sans adjuvant. On prélève des échantillons de sang de l'animal pour évaluer le niveau de production d'anticorps (évaluer la réponse immunitaire); lorsque la concentration est suffisamment élevée, on prépare un antisérum en effectuant une prise de sang suivie de l'isolement du sérum puis, si nécessaire, de la purification des anticorps à partir du sérum.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps, Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

La méthode usuelle pour produire des AcP reste l'immunisation de l'animal avec des préparations antigéniques pures ou partiellement purifiées, souvent combinées à un adjuvant qui accroît la réponse immunitaire. Les AcP sont produits chez les animaux vivants, puisqu'il n'existe pas de méthode substitutive pour cette production.

L'espèce qui sera utilisée pour la production d'AcP est choisie avec soin. Nous prenons en compte les facteurs suivants : 1) la quantité nécessaire d'anticorps ou d'antisérum (choix d'animaux de plus grandes tailles uniquement lorsqu'on a besoin de grandes quantités d'anticorps); 2) la relation phylogénétique entre l'espèce d'où provient l'antigène protéique et l'espèce utilisée pour produire l'anticorps; 3) la fonction effectrice des AcP provenant de l'espèce productrice d'anticorps; et 4) l'utilisation prévue des anticorps.

La chèvre est particulièrement adaptée aux projets pour lesquels une quantité importante d'anticorps est requise. Elle permet ainsi de Réduire le nombre d'animaux engagés dans chaque protocole à 1 ou 2 individus.

En se basant sur le nombre moyen de protocole et d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 50 protocoles, représentant 100 chèvres.

Le temps minimum d'immunisation est de 301 jours.

Dans la production d'AcP, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque pour les utilisateurs ainsi que pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine et qu'il ait satisfait à cette période. Cette période permettra également à l'animal de s'habituer à son nouvel environnement. Le protocole d'immunisation est de degré de gravité légère à modérée en fonction de l'adjuvant utilisé. Nous utiliserons prioritairement les protocoles d'immunisation ayant le moins d'impact sur la santé des animaux.

Les animaux sont surveillés tous les jours ouvrés et plus particulièrement durant les premières heures juste après l'immunisation. Cette observation quotidienne permet une détection précoce de tout signe d'inconfort ou de douleur et permet ainsi une intervention adaptée au plus tôt en accord avec les points limites définis avec notre vétérinaire.

Les chèvres sont hébergées en groupe dans des enclos structurés afin de pallier à toute forme de détresse. Des objets d'enrichissement sont placés dans les box afin de stimuler l'activité des animaux.

18902 Le développement de nouveaux traitements visant à manipuler directement le système immunitaire de l'hôte afin de lui permettre d'éliminer une tumeur ou une infection aigüe ou chronique est en plein essor. Ce type de traitement ne cible pas un pathogène ou un type de tumeurs en particulier mais un ou des mécanismes immunitaires, métaboliques, cellulaires de l'hôte qui peuvent être communs à différentes infections ou différentes tumeurs, qu'ils soient inhibiteurs ou activateurs de la réponse immune. Ces nouvelles thérapies comprennent entre autres le développement de protéines recombinantes, de stimulateurs non spécifiques de l'immunité innée, des petites molécules visant à interférer avec le métabolisme cellulaire par exemple.

L'équipe s'intéresse actuellement à ces nouvelles thérapies, notamment dans le cadre du sepsis dont l'origine peut être bactérienne, virale et/ou fongique et dans le but de rétablir la fonctionnalité du système immunitaire dans la phase d'immunosuppression post-sepsis telle qu'elle est décrite chez les patients. Ce projet vise à démontrer l'intérêt de l'utilisation de vecteurs viraux comme porteurs de ces molécules. Les preuves de concept ont été atteintes lors d'études pré-cliniques précédentes chez la souris pour un des candidats. Il convient maintenant de réaliser des études visant à définir un schéma d'administration réalisable en application clinique et induisant la réponse ciblée optimale. Le but est de comparer après 1 ou 2 injections du candidat, la pharmacocinétique

de la molécule portée par le vecteur viral et d'évaluer les activités immunologiques induites au niveau de l'organisme.

Bien que le modèle murin ne reproduise pas complètement la complexité des mécanismes immunitaires chez l'homme, il reste néanmoins une bonne alternative. Il permet en effet d'évaluer in vivo la pharmacocinétique de la molécule d'intérêt et d'évaluer leur activité sur les cellules du système immunitaire à l'échelle d'un organisme complet à des temps précoces et plus tardifs. Pour cela, les animaux recevront 1 ou 2 injections du candidat par voie intraveineuse, des prélèvements sanguins seront effectués au cours de l'étude pour suivre le taux et l'expression de la molécule d'intérêt in vivo ainsi que son activité immunologique.

A l'heure actuelle, aucun modèle in vitro ne peut se substituer au modèle murin pour ce type d'étude. Les conditions d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées seront appliquées pour respecter le bien-être de l'animal et limiter au maximum la souffrance subie par l'animal.

Un suivi des animaux sera effectué quelques heures après toutes les injections et tout au long de la procédure afin de déceler d'éventuels symptômes de mal être. Un anesthésique local sera appliqué aux animaux avant tout prélèvements sanguins.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet sera réduit au minimum et optimisé, afin de réduire la fréquence de prélèvements sanguins sur le même animal sans compromettre les objectifs de ce dernier.

L'évaluation des effets du schéma d'injection à long terme ne sera faite que si un effet est observé initialement à court terme.

Ce projet inclura un maximum de 238 souris

18903 La dermatite atopique (DA) est une pathologie inflammatoire fréquente de la peau, touchant les adultes et les enfants. Les patients DA ont une colonisation cutanée exagérée à *Staphylococcus aureus*, une bactérie pathogène de la peau. De plus, la peau DA présente des quantités anormales de peptides antimicrobiens (PAM); les PAMs participent habituellement à l'équilibre microbien de la peau, et participent à la lutte anti pathogènes cutanée. Les PAMs sont produits par la peau, mais aussi par de nombreux micro-organismes commensaux. Notre objectif est d'évaluer l'efficacité de différents PAMs dans des modèles murins de DA. Les principales objectifs/questions sont : (1) identifier de nouveaux PAMs avant et après traitement par UV dans des modèles de DA; (2) ces PAMs sont-ils efficaces pour restaurer la flore cutanée normale et pour inhiber l'inflammation cutanée associée à *S. aureus*. Nous utiliserons pour cela des PAMs sélectionnés sur leurs capacités in vitro, et évaluerons leur capacité à réduire la colonisation à *S. aureus* et les symptômes de DA. Nous souhaitons mettre en lumière des PAMs encore peu connus, qui pourraient être utilisés pour réduire les symptômes de DA en association avec les thérapies comme la photothérapie.

Parmi les différentes espèces animales utilisées en expérimentation, la souris est l'animal le mieux adapté pour le développement de modèles immunologiques. Nous appliquerons de manière topique des souches bactériennes (*Staphylococcus aureus* et *epidermidis* en suspension) grâce à un écouvillon, comme précédemment décrit; des molécules comme les PAMs avec une pipette ou une injection sous cutanée en fonction des caractéristiques des PAMs; et un traitement par UV et/ou ses médiateurs comme le cis-UCA.

Les expériences ont été conçues en accord avec le principe de la règle des 3R (réduction, raffinement et remplacement). En effet, nous projetons de réduire le nombre de souris utilisé tout en préservant la robustesse des analyses statistiques, nous envisageons donc d'utiliser 1740 souris au maximum. Le protocole est planifié de telle sorte que plusieurs analyses sont réalisées sur le même animal, et en fonction des résultats obtenus, certaines expériences ne seront peut-être pas réalisées. Le bien-être des animaux (raffinement) est également pris en compte : les animaux seront endormis par anesthésie générale lors des procédures afin de diminuer au maximum le stress et la douleur de ces derniers. De plus, les procédures mises en place ne devraient pas donner lieu à des troubles des fonctions corporelles ou de l'état général des animaux, toutefois les animaux sont surveillés 3 jours par semaine et tout animal qui présenterait des signes physiologiques anormaux (souris prostrées, poils hérissés ou encore apparition de nécrose cutanée) suite à l'application

épicutanée des composés, serait mis à mort. De plus, les animaux seront hébergés par groupes d'individus compatibles, dans des conditions contrôlées avec la mise en place d'une diversification du milieu. L'étude conduite dans ce projet ne peut être conduite qu'in vivo: nous devons utiliser un modèle de DA pour le traitement par UV pour mimer ce qui est réalisé chez les patients. De plus, les PAMs sont produits par de nombreuses cellules cutanées/immunitaires différentes, et également par le microbiote cutané normal, qui interagit avec les cellules cutanées. Cela ne peut être exploré qu'in vivo.

Cette étude fait suite à un package d'études in vitro qui ont illustré l'activité anti-inflammatoire de ces composés (remplacement).

18904 L'objectif du projet est l'obtention d'anticorps polyclonaux de mouton, dirigés contre les antigènes spécifiques des bactéries pathogènes, recherchées dans les produits alimentaires : Listeria, Salmonelles, Escherichia Coli O157: H7, Staphylocoques (toxines A,B,C,D,E)

Ces anticorps polyclonaux sont utilisés pour la réalisation de tests de détection, ou d'enrichissement préalable à la détection, des bactéries ou de leurs entérotoxines, à l'aide d'automates par les services qualité de l'industrie alimentaire.

Les immunisations à réaliser dans le cadre de ce projet porteront, en fonction des besoins en tests à fournir sur une période de 5 ans, sur 4 moutons pour chaque par série d'immunisation.

Une série est nécessaire pour chaque antigène contre lequel on souhaite obtenir des anticorps polyclonaux.

Globalement, 10 séries de 4 moutons, soit 40 moutons maximum seront nécessaires :

- 1 série pour les antigènes 1/2C et 4A de Listeria,
- 6 séries pour les antigènes Z29, FGX, B, Z42Z32, I, ENX et D de Salmonelles
- 1 série pour l'antigène d'Escherichia Coli O157:H7
- 2 séries pour les toxines A, B, C, D, E de Staphylocoques

En l'absence de modèle in-vitro performant, l'espèce mouton a été choisie. Des résultats antérieurs ont montré l'efficacité de l'immunisation chez cette espèce. La qualité des anticorps ainsi obtenus s'est révélée satisfaisante (affinité et spécificité) et répond bien aux besoins en diagnostic. Cette espèce donne la possibilité d'effectuer des prélèvements conséquents de sang à différentes reprises, ce qui permet de produire des quantités importantes de sérum hyper-immun et ainsi de limiter le nombre d'animaux impliqués dans le projet pour couvrir les besoins pour les 5 prochaines années de production. Les anticorps de mouton ainsi produits sont poolés puis purifiés pour être utilisés dans des tests de dosage antigénique automatisés.

Les moutons, animaux grégaires, sont stabulés en petits groupes dans des conditions adaptées à l'espèce et conformes à la réglementation.

Il est probable que seules 2 ou 3 séries de nouveaux moutons soient démarrées sur la période de 5 ans compte-tenu du fait que la durée de vie productive des animaux est de l'ordre de 5 à 8 ans et que les volumes de sérum hyper-immuns récoltés sont importants, assurant ainsi une dizaine d'année de fabrication de kits.

Une surveillance quotidienne "approfondie" de ces animaux en protocole assure, en cas de signes cliniques, le déclenchement de soins spécifiques sur les conseils d'un vétérinaire.

18905 L'évolution récente du mode de vie dans les pays développés et l'augmentation de l'incidence des maladies chroniques ont fait de la défaillance d'organe vital la principale cause de décès prématuré dans le monde.

La meilleure option thérapeutique chez les patients au stade terminal d'une défaillance d'organe vital est la transplantation, qui consiste à substituer chirurgicalement l'organe défectueux par un greffon fonctionnel prélevé chez un donneur le plus compatible possible. La principale complication de la greffe d'organe est le phénomène de « rejet » qui demeure la cause majeure d'échec en transplantation. En effet le système immunitaire du receveur va reconnaître des antigènes présents

à la surface du greffon comme étrangers ou non « soi » au même titre qu'il reconnaît un agent bactérien infectant. Il va alors mettre en place un processus de défense en sécrétant des anticorps qui vont attaquer et endommager irrémédiablement l'organe greffé. C'est ce phénomène qui est nommée rejet humorale ou rejet médié par la production d'anticorps. Les cellules immunitaires supports de ce rejet sont les lymphocytes B mémoires et les cellules qui sécrètent les anticorps. Les lymphocytes B ont la capacité de reconnaître spécifiquement tout agent étranger n'appartenant pas au « soi » et de se différencier en cellules sécrétrices d'anticorps appelées plasmocytes.

C'est pourquoi les personnes transplantées sont contraintes de prendre à vie des traitements immunosuppresseurs afin d'éliminer ces populations immunitaires et de prévenir/limiter le rejet.

Cependant, les combinaisons immunosuppressives disponibles n'ont montré qu'une efficacité relative et ne parviennent au mieux qu'à réduire transitoirement le titre en anticorps dirigés contre le greffon. En effet, il a récemment été montré que l'échec des thérapies ayant pour action la destruction des plasmocytes serait dû à la prolifération rapide des lymphocytes B mémoires. Ces derniers se différencieraient alors en plasmocytes producteurs d'anticorps anti-donneur et remplaceraient alors les plasmocytes initialement détruits lors de la thérapie immunosuppressive.

C'est donc autour de la compréhension des mécanismes immunologiques supports du remplacement des plasmocytes par les lymphocytes B mémoires, que ce projet s'articule. Le modèle murin que nous prévoyons d'utiliser pour étudier les mécanismes décrit plus haut, repose sur la combinaison de souris génétiquement modifiées, de greffe de moelle osseuses et d'administration de produits pharmacologiques.

Les souris ainsi générées seront ensuite immunisées par une protéine bien définie afin de générer une réponse immunitaire et observer l'effet de la depletion de la population plasmocytaire et étudier le devenir des populations immunitaires d'intérêts.

Tout au long du projet, les conditions d'élevage, d'hébergement et de soins seront adaptées aux besoins des animaux. Lorsque la greffe réussit, les procédures utilisées dans ce projet n'occasionnent qu'une douleur et une angoisse minimales pour les animaux. Des points limites précis (perte de poids, comportement notamment) ont cependant été définis afin d'intervenir si besoin, en cas de non-prise de greffe notamment. Les prélèvements sanguins et injections seront réalisés sous anesthésie afin de limiter toute souffrance chez les animaux de même que tout stress induit par le geste.

Ce projet nécessite le recours à 154 souris au maximum. A visée de réduction, ce nombre a été calculé par des méthodes bio-statistiques et correspond au nombre de souris nécessaire pour répondre à la problématique posée. Une première procédure permettra de mettre en place la méthode de greffe de moelle en comparant 2 technologies, et seul le meilleur protocole sera ensuite utilisé par la suite. Par souci de réduction toujours, des outils préexistants pour le suivi du devenir des lymphocytes B et des plasmocytes, seront utilisés afin de limiter au maximum les expériences de mise au point et donc le nombre d'animaux nécessaires à la réalisation du projet.

18906 Malgré la disponibilité de vaccins efficaces, les données épidémiologiques estiment qu'environ 250 millions de personnes sont chroniquement infectées par le virus de l'hépatite B (VHB). L'infection chronique par le VHB est une cause majeure de maladie hépatique en phase terminale, notamment la cirrhose, l'insuffisance hépatique et le carcinome hépatocellulaire.

Les traitements standard pour le VHB éradiquent très rarement le virus, même si ils réduisent considérablement la réplication du VHB, l'hépatite et la progression de la fibrose. Pour certains, ils restent limités du fait de leurs effets secondaires, pour d'autres, un traitement à long terme est malheureusement nécessaire car la virémie augmentent souvent lors de l'élimination du médicament. Dans ce cas, le taux de mutation élevé du VHB peut facilement entraîner une résistance aux médicaments. Il est donc urgent de trouver des thérapies plus efficaces.

Ce projet consiste à mettre en place les études de pharmacocinétique et de tolérance d'une nouvelle molécule antivirale X contre le VHB dans un modèle de souris capable d'être infecté par ce virus. Ces études vont permettre d'estimer son exposition dans tout l'organisme, sa biodisponibilité et d'évaluer sa tolérance.

Les études de pharmacocinétique de molécules thérapeutiques prennent en compte différents paramètres, tels que l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination de celles-ci par l'organisme. L'étude de ces paramètres va permettre d'apporter les informations nécessaires au choix des voies d'administration des molécules et d'adapter les posologies pour leur utilisation future.

Ces souris génétiquement modifiées, combinent une immunodéficiences (dépourvu de système immunitaire) et une déficiences pour une enzyme du foie entraînant une pathologie hépatique qui permet de remplacer les cellules hépatiques murines par des cellules hépatiques humaines une fois injectées. Des prélèvements sanguins périodiques permettront de suivre l'humanisation en dosant l'albumine. Les souris bien humanisées (taux d'albumine >8-10 mg/mL), la molécule à évaluer pour les différents paramètres, sera injectée par voie intra veineuse. Ce modèle humanisé pour le foie est utilisé avec succès en recherche fondamentale sur le VHB mais aussi pour des tests de molécules thérapeutiques.

Ce projet nécessitera 65 souris au total et a été mis en place tout en respectant la règle des 3R :

- Réduire : Le nombre d'animaux par groupe a été réduit au minimum sans toutefois compromettre l'analyse statistique des résultats.
- Raffinement : Tout au long des expériences, nous veillerons au bien-être des animaux, à réduire au maximum la souffrance et l'angoisse des souris grâce à une définition précise des points limites, à l'administration de médicaments pour supprimer la douleur si nécessaire (comme par exemple une analgésie adaptée pour la chirurgie).
- Remplacer : Les études dans les modèles in vitro d'infection par ce virus sont limitées et ne permettent pas de valider les molécules antivirales candidates en termes de métabolisme et de pharmacologie dans un contexte plus élaboré faisant intervenir des paramètres indispensables tels que la structure de l'organe foie et le métabolisme.

18907 L'équipe s'intéresse au contrôle hormonal et/ou nutritionnel des sécrétions des cellules du tissu adipeux (adipokines) et leur implication dans les dérégulations métaboliques associées à l'obésité (résistance à l'insuline, diabète, certaines maladies rares, cancer). En plus du tissu adipeux, il est maintenant clairement établi que les tissus clefs impliqués dans le métabolisme énergétique comme les muscles squelettiques et le foie sécrètent aussi des molécules appelées respectivement myokines et hépatokines, capables d'agir de façon locale ou via la circulation sanguine. Nous avons par conséquent élargi nos études au rôle de ces différentes sécrétions ainsi qu'à leur mécanisme d'action dans différentes pathologies métaboliques (obésité, diabète de type 2, . . .). L'équipe a pu ainsi montrer qu'une adipokine essentiellement régulée par l'insuline, possède des propriétés anti-diabétiques dans un modèle de souris obèse et pré-diabétique. Un essai clinique récent chez l'Homme a pu également démontrer que l'administration aigue de cette molécule améliore la sensibilité à l'insuline. Cependant l'efficacité de cette molécule n'a pas été étudiée chez des souris présentant un état diabétique sévère, ni même la conservation des effets bénéfiques après l'arrêt du traitement. De plus, ces différentes sécrétions (adipokines, myokines. . .) sont peu caractérisées (expression tissulaire, concentrations sanguines, effets métaboliques. . .) en fonction du sexe.

Dans ce but, nous utiliserons un modèle génétique de diabète de type 2 : les souris db/db (déficiences pour le récepteur à la leptine) et un modèle de souris dont l'alimentation permet une surcharge énergétique (régimes riches en graisse et/ou en sucre) entraînant la mise en place d'une obésité et un état pré-diabétique. Pour chaque modèle des souris mâles et femelles seront étudiées. De manière à évaluer l'efficacité des différentes sécrétions, ces dernières peuvent être administrées par voie intra-péritonéale ou intra-veineuse. Divers paramètres physiologiques seront suivis de façon non invasive lors des expérimentations (prise de poids, mesure de la prise alimentaire/hydrique, pourcentage de masse grasse/maigre, comportement, activité physique...). Dans certains cas une prise de sang de petit volume permettra de suivre des index métaboliques (glycémie et taux d'insuline dans le sang lors de tests fonctionnels). Enfin au sacrifice une étude précise des paramètres sanguins mais également tissulaires sera effectuée.

Les différentes procédures proposées n'entraînant aucune douleur physique (y compris la mise en régime gras car les animaux sont mis à mort avant que les désordres métaboliques provoqués n'engendrent une quelconque invalidité), elles seront réalisées sur les mêmes groupes d'animaux dès lors que les animaux auront recouvré un bien-être général et dans la mesure où elles n'interfèrent pas entre elles (principe de réduction de la règle des 3Rs). Nous utiliserons les services d'une plateforme technologique spécialisée dans le phénotypage métabolique afin de bénéficier de l'expérience du personnel et d'appareils de pointe permettant l'acquisition de plusieurs types de données à la fois (limitation du nombre de manipulations des animaux et garantie d'une parfaite maîtrise de toutes les techniques = principe de raffinement de la règle des 3Rs). Compte tenu de la variabilité des paramètres biologiques généralement observée au sein d'un groupe et de la durée des protocoles, des groupes de 8 animaux seront constitués afin de pouvoir mettre en évidence des différences statistiques (principe de réduction de la règle des 3Rs). L'ensemble du projet nécessitera au maximum 1248 souris qui seront réparties sur différentes expérimentations : 5 molécules à tester au cours des cinq prochaines années.

Les procédures seront réalisées dans le respect du bien être animal pour limiter la souffrance, la douleur ou l'angoisse des animaux (les souris seront hébergées par cages de 4, des carrés de ouate et des igloos seront placés dans les cages pour leur permettre de faire un nid) et en respectant des points limites préalablement définis (une perte de poids atteignant 20%, un comportement anormal grave - arrêt d'alimentation -, un isolement vis à vis du groupe de plus de 24 h conduiront à un arrêt d'urgence de l'expérimentation). L'observation quotidienne des animaux sera réalisée par du personnel qualifié de la zootechnie et de l'équipe de recherche.

18908 La pollution atmosphérique est un facteur de risque important pour la santé humaine. Cependant le risque varie en fonction des individus, d'où l'importance d'identifier les sujets les plus vulnérables. Les données épidémiologiques associent l'exposition à la pollution au risque de développer une obésité, les mécanismes de cette association ne sont pas bien connus mais peuvent être expliqués en partie par des changements comportementaux, notamment moins d'activité physique, moins de marche pour aller au travail ou à l'école, moins de sommeil et plus de consommation de graisses. D'autre part le tissu adipeux est capable de capter et retenir les polluants puis de les relarguer en systémique en cas de régime ce qui pourrait avoir des effets bénéfiques ou délétères sur les autres organes naturellement impactés par la pollution.

Nous concentrerons notre analyse sur le cœur et le muscle squelettique, notre domaine d'expertise, notamment parce que les effets aigus de la pollution atmosphérique se traduisent par des événements cardiovasculaires, tandis que les effets à long terme se manifestent dans d'autres tissus, comme le muscle squelettique. Par ailleurs, des études épidémiologiques et toxicologiques ayant démontré que l'âge peut influencer sur la sensibilité à la pollution, nous conduirons notre analyse chez le sujet juvénile et chez le jeune adulte.

Afin d'étudier ces possibles effets opposés, nous utiliserons un modèle expérimental d'obésité induite qui sera également exposé à la dioxine, un polluant organique, et ce afin d'évaluer les effets protecteurs (capacité de rétention de ce polluant) (procédure 1) ou au contraire les effets néfastes (recirculation systémique du polluant suite à un régime)(procédure 2) de la masse grasse sur le cœur et le muscle. Ceci nous permettra dans un second temps d'identifier les voies de signalisation moléculaire en relation avec les effets observés afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Ce programme de recherche permettra de déterminer si l'obésité et l'âge peuvent exercer un rôle protecteur ou au contraire prédisposer à des anomalies induites par la pollution. Les données issues de cette recherche contribueront à développer des interventions préventives adaptées aux personnes vulnérables.

Cette étude utilisera un maximum de 600 souris réparties sur les 2 procédures expérimentales.

Tout au long de nos procédures, la règle des 3R sera respectée :

1) Remplacer : quand l'observation le permet, une approche préalable de remplacement par l'utilisation de cultures cellulaires est employée, ce qui permet par la suite de réduire le nombre

d'expériences incontournables réalisées sur l'animal. Bien que plusieurs équipes, dont la nôtre, développent des approches *in vitro* pour générer et étudier des cellules souches musculaires, l'efficacité est encore faible et les cellules présentent des différences significatives par rapport à leurs homologues *in vivo* notamment parce qu'il est impossible *in vitro* de reconstituer l'environnement cellulaire et matriciel complexe dans lequel se trouvent les cellules souches. Par conséquent, nous utilisons ici une approche génétique qui permet la manipulation des voies de signalisation directement dans l'environnement physiologique des cellules, c'est-à-dire dans les muscles.

2) Réduire : nous utiliserons le nombre minimum nécessaire d'animaux pour avoir une bonne puissance statistique de l'étude et des réponses aux questions posées. En effet, les protocoles expérimentaux chez la souris sont établis afin de pouvoir minimiser le nombre d'animaux soumis à expérimentation tout en conservant une masse suffisante pour assurer la reproductibilité et la cohérence statistique des observations, en s'efforçant d'utiliser tous les animaux issus des croisements, si possible. De plus, nous limiterons notre analyse aux modèles les plus couramment utilisés par la communauté scientifique, en excluant les autres modèles disponibles et nous collaborons avec une autre équipe de notre institut pour étudier différents tissus du même animal en évitant le double emploi des animaux. Enfin, nous ne lancerons la deuxième procédure de l'étude (voies de signalisation moléculaires) que si nous avons de bons résultats suite à la première procédure.

3) Raffiner : afin d'affiner les procédures, nous avons établi des points limites. Un examen clinique des animaux sera effectué quotidiennement ou toute les semaines selon le plan des procédures. Tout signe témoignant d'une mauvaise tolérance au traitement (par exemple perte de poids, souffrance, apathie, déshydratation des animaux) conduira à l'interruption de la procédure. Les animaux sont maintenus en groupes sociaux leur permettant d'exprimer leurs besoins avec leurs congénères et les cages sont enrichies avec une maison en plastique et du papier craft pour leur permettre de nicher.

18909 Il arrive que le système immunitaire réagisse contre l'organisme lui-même, entraînant des réactions inflammatoires chroniques pouvant mener à des dommages d'organes pouvant être mortels. On parle alors de maladie auto-immune. Le lupus érythémateux systémique et la connectivite mixte sont des maladies auto-immunes rares pouvant être mortelles qui affectent principalement des femmes jeunes. Dans ces deux maladies, des anticorps dirigés contre des cibles du soi (autoanticorps) forment des complexes qui vont initier les réactions inflammatoires chroniques dans les organes ciblés. Dans le cas du lupus, l'atteinte d'organe la plus grave cible le rein. Dans le cas de la connectivite mixte, l'atteinte pulmonaire peut mener les patients à suivre des traitements lourds. Dans ces deux maladies, aucun traitement spécifique n'existe et les poussées de ces maladies sont maîtrisées par des traitements immunosuppresseurs qui ont des effets secondaires importants. Il y a un réel besoin de développer de nouvelles approches thérapeutiques empêchant le développement des atteintes d'organes graves de ces maladies.

Le but du projet est de faciliter l'élimination des autoanticorps et d'évaluer l'effet bénéfique d'une telle approche sur le développement des atteintes d'organes (reins et poumons). Les molécules testées seront comparées à des traitements ciblant les cellules responsables de la production des auto-anticorps, les lymphocytes B.

Des modèles spontanés et induits de ces pathologies existent chez la souris, nous permettant de valider le bien-fondé de nos approches thérapeutiques, avant leur développement chez l'humain.

Concernant le lupus, un modèle spontané (souris ayant une mutation génétique entraînant le développement de la maladie lupique) et un modèle induit (par l'injection dans la cavité péritonéale d'une huile appelée pristane) seront utilisés afin de pouvoir généraliser nos résultats et ainsi augmenter les chances de transfert de l'approche à la pathologie humaine. Le modèle spontané entraîne le développement du lupus rénal chez les souris spontanément aux alentours de 15 semaines d'âge. Le modèle induit par injection de pristane consiste en l'injection dans la cavité

péritonéale de pristane une fois quand les souris ont 8 semaines d'âge. On laisse la maladie se développer pendant 8 semaines avant de l'analyser.

Concernant la connectivite mixte, seul un modèle induit existe (en vaccinant la souris contre une protéine qui va induire la maladie, la U1-snRNP) et sera donc utilisé. Ce modèle induit une atteinte pulmonaire légère mais quantifiable 6 semaines après la première immunisation.

Une fois la maladie rénale (ou pulmonaire) installée, les souris seront traitées avec les thérapeutiques candidates et l'amélioration des souris au bout de deux semaines sera évaluée.

Les interventions sur les animaux concernés se limiteront aux actes suivants :

- Injection de pristane (ou de solution saline en contrôle) dans la cavité péritonéale des souris vigiles concernées (modèle induit de lupus). Les animaux sont analysés pour la pathologie 8 semaines plus tard.

- Injection en sous-cutané sur souris anesthésiées d'un mélange d'antigène (ou protéine Contrôle, MBP) avec de l'adjuvant de Freund suivi d'un rappel en adjuvant incomplet deux semaines plus tard aux souris concernées (modèle de connectivite mixte). Les animaux sont analysés pour la pathologie pulmonaire 6 semaines après la première immunisation.

- prélèvements sanguins sur animaux anesthésiés par voie rétro-orbitale, et collecte d'urines avant le début du traitement (soit deux semaines avant la fin des procédures).

- administration des composés thérapeutiques par injection intrapéritonéale aux souris vigiles deux fois par semaine sur deux semaines (4 injections en tout).

Remplacement des modèles animaux : De par la complexité des maladies étudiées, il n'existe aucune alternative à l'utilisation de modèles animaux développant eux-mêmes la maladie. Ces modèles animaux permettront de valider les nouvelles approches thérapeutiques identifiées afin de transférer nos découvertes aux patients.

Réduction du nombre d'animaux : L'étude de cellules humaines ex vivo et l'analyse des échantillons de patients a permis de réduire les hypothèses de travail et ainsi de limiter le recours aux modèles animaux. Les souris contrôles des approches in vivo verront leurs organes utilisés pour des cultures cellulaires et des expériences in vitro et les organes des souris malades traitées ou non serviront de contrôles positifs ou négatifs pour des expériences ultérieures.

Notre projet aura une durée de 5 ans et utilisera un maximum de 220 animaux. Le but des études chez la souris est de pouvoir conclure sur la validité de nos approches thérapeutiques pour la pathologie humaine. Sur un plan statistique, afin de pouvoir conclure, 5 animaux par groupe expérimental/contrôle sont utilisés. Si, et seulement si, une tendance justifiant d'être confirmée sur un nombre plus important d'individus est constatée, alors le nombre d'animaux par groupe pourra être amené à 10 maximum. Si la significativité statistique est atteinte avec 5 animaux par groupe, nous ne serons pas amenés à augmenter ce nombre.

Raffinement: Tous les animaux seront observés quotidiennement par le personnel compétent de l'animalerie. L'état général des animaux sera suivi sur une grille de score permettant de déterminer l'atteinte ou non de points limites correspondant à une altération trop marquée des animaux. En cas d'atteinte de ces points limites, les animaux concernés seraient euthanasiés immédiatement.

Les animaux sont élevés en conditions standardisées en accord avec la réglementation en vigueur. L'enrichissement de l'environnement des souris dans les cages (cotons de nidification ou tunnels en plastiques...) permet d'optimiser le bien-être des animaux. Les procédures dureront 20 semaines maximum pour les modèles spontanés et 6 ou 8 semaines pour les modèles induits (souris âgées de 14 à 20 semaines au maximum en fin de procédure). Tous les animaux seront sacrifiés en fin de procédure pour analyse des paramètres des pathologies.

18910 NLRP3 est une protéine impliquée dans la réponse immunitaire. Nos données nous montrent que l'absence de NLRP3 dans certains globules blancs ralentit la croissance des tumeurs chez la souris et pourrait donc servir de cible thérapeutique.

Dans nos expériences, nous avons jusqu'à présent utilisé des souris déficientes pour NLRP3 de manière constitutive, c'est-à-dire que NLRP3 est absent avant même l'implantation de tumeurs. Ces

souris, sont très utiles pour étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires mais ne permettent de fournir une preuve incontestable de l'intérêt de cibler NLRP3 dans une tumeur déjà établie comme c'est le cas dans la prise en charge des patients humains.

C'est pourquoi nous avons développé des souris dont la déficience en NLRP3 dans les lymphocytes T CD4 serait inductible in vivo par un traitement au Tamoxifène.

Ce projet vise ainsi à valider ce modèle.

Pour cela, nous procéderons en 2 étapes.

Dans un premier temps, les souris seront traitées ou pas avec le Tamoxifène par gavage pendant 5 jours puis, les lymphocytes T CD4 des souris seront isolés à J2, J5 et J10 post-gavage. Les cellules seront étudiées in vitro pour valider que le Tamoxifène a bien permis la déficience en NLRP3. 12 souris subiront cette première expérience.

Dans un second temps, les souris seront traitées ou pas avec le Tamoxifène par gavage pendant 5 jours puis, à J2, J5 ou J10 post-gavage (en fonction des résultats obtenus précédemment), les souris recevront une injection sous-cutanée de cellules tumorales. La croissance des tumeurs sera suivie tous les 2 à 3 jours. 6 souris subiront cette expérience.

La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R. Nous avons réduit le nombre d'animaux au strict minimum pour conclure à l'efficacité de notre modèle. Nous avons le recul nécessaire pour valider in vitro que le modèle fonctionne (remplacement). Enfin, le traitement au Tamoxifène à cette dose n'est pas décrit pour induire des effets secondaires dans nos conditions expérimentales et les croissances tumorales seront suivies jusqu'à une taille maximale de 10mm de diamètre pour la plus grosse. Ces 2 éléments nous permettent d'affirmer qu'aucun n'impact sur la vie des animaux n'est prévu. Ainsi elles seront hébergées de manière « classique » (Raffinement). Les souris seront observées seront hébergées à raison de 10 souris par cage en présence des éléments nécessaires à la fabrication d'un nid. Cette étude nécessitera 18 souris.

18911 Chez les mammifères femelles, l'œstradiol est une hormone essentielle impliquée dans de nombreux processus biologiques. Elle est responsable de la maturation des organes sexuels et de l'apparition des caractères sexuels secondaires. Elle joue aussi un rôle essentiel dans le déclenchement de la puberté et dans le comportement sexuel et maternel au cours de la vie reproductive. La production d'œstradiol est essentiellement assurée par l'ovaire, grâce à l'action des hormones hypophysaires, LH (Luteinizing hormone) et FSH (Follicle-stimulating hormone). Les travaux menés dans plusieurs espèces dont l'Homme et les rongeurs montrent que la synthèse d'œstradiol débute bien avant la puberté. Chez la petite fille, on parle de "mini-puberté" dans les deux années qui suivent la naissance, car l'œstradiol et les hormones hypophysaires y sont produits en quantité importante, comme à la puberté. Des données de plus en plus nombreuses suggèrent que cette hormone est très précocement impliquée dans la mise en place de la fonctionnalité de l'axe gonadotrope. Notre hypothèse est que la mini-puberté est critique pour la différenciation des circuits neuronaux impliqués dans la mise en place de la puberté, l'ovulation et le comportement reproducteur.

Ce projet de recherche vise à analyser le rôle de l'œstradiol produit au moment de la minipuberté sur la mise en place de la puberté, la cyclicité la fertilité, et sur la différenciation des neurones hypothalamiques à GnRH qui sous-tendent cette fonction.

Pour traiter ces différents points nous réaliserons des études in vivo sur la souris car cette espèce présente des caractéristiques très proches de l'humain en ce qui concerne les paramètres hormonaux de la période prépubère. L'utilisation d'un modèle animal est incontournable pour cette étude pour plusieurs raisons: 1/La fonction ovarienne, que ce soit la croissance des follicules et leur capacité endocrine, est étroitement régulée par le complexe hypothalamo-hypophysaire dès la période prépubère. 2/ L'impact du fonctionnement ovarien sur les organes reproducteurs et la fertilité ne peut être entreprise qu'in vivo. Or il n'existe pas à ce jour de modèle in vitro permettant de restituer cette complexité. Le nombre d'animaux a été restreint tout en prenant en compte la nécessité d'en avoir un nombre suffisant pour la mise en évidence de différences statistiques entre les groupes traités ou mutants, et les groupes contrôles. Nous utiliserons des approches

méthodologiques non dommageables pour l'animal avec le souci d'éviter la douleur (anesthésie, administration d'anti-douleurs) et les conditions d'hébergement seront enrichies avec des nids végétaux et des maisonnettes cartonnées. Avec l'exigence d'appliquer les règles de remplacement, réduction et raffinement, un total de 666 souris sera nécessaire pour mener à bien ce projet.

18912 Le système nerveux central est constitué de deux types cellulaires, les neurones et les cellules gliales. Les fonctions du système nerveux central sont principalement expliquées par le rôle prépondérant que jouent les neurones. Pourtant depuis une vingtaine d'année de plus en plus d'études indiquent que les glies présentent en nombre égale avec les neurones dans le système nerveux central sont également impliquées dans les fonctions mnésiques et cognitives. La pharmacopée développée jusqu'alors est essentiellement orientée vers les fonctions neuronales. Les effets sur les cellules gliales des molécules les plus couramment utilisées pour le traitement des maladies neurologiques sont inconnus. Le but de ce projet est d'étudier les interactions entre la glie et les neurones et de mieux comprendre les voies de signalisation impactées par l'usage de psychotropes. Il s'agit d'un projet de recherche fondamental dont les résultats bénéficieront à la connaissance générale du système nerveux central et permettront de mieux comprendre le fonctionnement de certains psychotropes couramment utilisés. Nous étudierons l'effet de ces psychotropes sur un modèle de souris transgénique nous permettant de visualiser les glies. Les mouvements des prolongements de certaines glies seront étudiés par microscopie sur des animaux vigiles habitués à la contention. L'étude des mouvements des cellules gliales nous permettra de mieux comprendre les mécanismes cellulaires qui se produisent lors des traitements psychotropes et de mieux comprendre le rôle des cellules gliales dans les mécanismes de mémoire et de cognition et de troubles cérébraux d'ordre psychiatriques. Chaque animal recevra une chirurgie sous anesthésie générale permettant la pose d'un implant crânien, une analgésie est prodiguée aussi longtemps que nécessaire jusqu'à la récupération totale de la chirurgie en général 48 heures maximum. Les souris seront ensuite habituées à l'immobilité par renforcement positif (récompenses) afin d'être imagées au travers du crâne, notre approche est donc non invasive et à ce titre très bien tolérée par les animaux. Les différentes molécules seront injectées par voie intrapéritoneale. Les molécules sont issues de la pharmacopée utilisée chez l'homme et donc avec peu d'effets secondaires indésirables. La procédure est classée modérée. Cette étude sera réalisée en respectant la règle des 3R. Le nombre d'animaux utilisés a été établi sur la base de notre expérience du modèle et des statistiques afin d'utiliser un minimum de souris tout en pouvant conclure statistiquement. Chaque animal sera son propre témoin ce qui diminue le nombre d'animaux nécessaires, et pour chaque traitement le nombre d'animaux utilisés sera restreint dès la significativité des résultats (52 souris maximum). L'étude des glies impose des conditions physiologiques et une absence d'inflammation ce qui nous contraint à l'utilisation d'un modèle *in vivo*. Une fois les voies de signalisation identifiées, l'étude des mécanismes sera réalisée *in vitro* (Remplacer et Réduire). Il est à noter que ce modèle peu invasif ne semble pas induire de stress ou de souffrance des souris. Néanmoins, nous veillerons à limiter le mal-être des animaux par un enrichissement de leur conditions de vie, en raffinant notre procédé de contention et en réalisant des habituations de nos souris à la manipulation. En complément, le bien-être des animaux sera évalué de façon quotidienne (posture, poids, toilettage). Ce type d'étude se faisait jusqu'à présent essentiellement sur des modèles primate non-humains. Avec cette approche nous voulons tirer parti des avantages qu'apporte la souris (les modèles génétiques) pour améliorer notre compréhension des mécanismes cellulaires mis en jeu durant les sollicitations sensori-motrices. Les résultats obtenus dans cette étude permettront de mieux comprendre la pharmacopée actuelle et les effets qui leurs sont associés tout en comprenant le rôle des cellules gliales dans les mécanismes de mémoire et de cognition.

18913 Les maladies auto-immunes comme le lupus érythémateux disséminé (LED) se caractérisent par la présence d'auto-anticorps dirigés contre des éléments de nos propres cellules tels que l'ADN. Ces auto-anticorps sont produits par des cellules du système immunitaire de l'individu malade appelés plasmablastes, selon des régulations encore inconnues. Présents en grandes quantités dans le sang, les auto-anticorps attaquent de nombreux organes et finissent par altérer leur fonctionnement,

causant des symptômes graves chez les patients lupiques. Il a été montré que la production d'auto-anticorps est favorisée par un type cellulaire appelé cellule plasmacytoïde dendritique (pDC). En effet, les pDC sont capables de détecter l'ADN cellulaire lié aux auto-anticorps, ce qui les active et provoque leur sécrétion d'interféron de type I, une molécule qui contribue au développement de la maladie. De plus, il a été observé dans un modèle de LED chez la souris, que les pDC et les plasmablastes interagissent au moyen de contacts cellulaires. Ceci suppose que ces types cellulaires communiquent étroitement et que ce dialogue aggrave le LED. Nous allons investiguer cette question. Dans ce but, nous allons réaliser des immunisations pour induire des anticorps anti-ADN, comme observés dans la maladie du LED.

Afin de minimiser le nombre d'animaux utilisés, ce projet se divise en deux procédures :

La procédure 1 vise à optimiser le protocole expérimental pour induire une réponse anti-ADN chez la souris par injection sous cutanée d'ADN ou de chromatine, une forme compactée de l'ADN.

La procédure 2, déterminée par les résultats obtenus dans la procédure 1, vise à identifier les mécanismes de communication entre pDC et plasmablastes producteurs d'auto-anticorps anti-ADN.

Aucun dommage/souffrance n'est attendu suite à l'injection d'ADN d'après des travaux précédents. Cette procédure générera des plasmablastes auto-immuns que nous isolerons une semaine après l'injection et que nous mettrons en contact avec des pDC non activées. Les résultats obtenus permettront de comprendre comment l'activation mutuelle des pDC et plasmablastes auto-immuns contribue au développement d'auto-anticorps destructeurs chez les patients lupiques. Ces connaissances pourraient mener à de nouveaux traitements empêchant la production d'auto-anticorps anti-ADN, constituant une alternative thérapeutique avantageuse aux traitements immunosuppresseurs actuels à l'origine de nombreux effets secondaires.

Le plan expérimental de notre projet nécessitera l'utilisation de 105 souris et a été conçu pour respecter la règle des 3 R (Réduire, Raffiner, Remplacer). L'utilisation d'animaux est nécessaire car le développement d'une réponse auto-immune est un phénomène complexe et dynamique qu'il est impossible de reproduire *in vitro*. Par ailleurs, les plasmablastes et les pDC sont des cellules sensibles à leur environnement qui ne peuvent pas être remplacées par des lignées cellulaires générées en laboratoire. Ceci nous oblige à utiliser des cellules produites *in vivo*, et ce chez la souris, car sa physiologie est suffisamment proche de celle de l'être humain pour que notre étude améliore notre compréhension de l'interaction plasmablaste/pDC lors d'une réponse auto-immune de type lupus.

Nous utiliserons différentes techniques expérimentales qui permettent d'isoler efficacement ces cellules à partir de différents organes d'un nombre réduit d'animaux. Les conditions d'élevage (hébergement, soins), d'anesthésie ainsi que les procédures et points limites adaptés ont été définis afin de réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage que pourraient ressentir les animaux.

18914 La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD), maladie musculaire héréditaire et fatale la plus fréquente chez l'enfant, est causée par des mutations dans le gène codant la dystrophine menant à un manque d'expression de cette protéine indispensable au maintien de l'architecture de la fibre musculaire.

La recherche sur la dynamique d'expression et la restauration d'expression de cette protéine était entravée par le manque d'un modèle animal permettant l'imagerie directe *in vivo* de la dystrophine dans des conditions normales ou pathologiques. Car malgré les études menées *in vitro* ou *ex vivo*, certaines questions ne peuvent être adressées que par de l'imagerie *in vivo*.

Pour cela, nous avons créé plusieurs lignées murines transgéniques afin d'adresser plusieurs questions relatives à cette protéine et pour évaluer l'efficacité de traitements pour cette maladie. Nos lignées de souris contrôles permettent de visualiser directement la dystrophine fusionnée à une protéine fluorescente verte (dystrophine-EGFP) ainsi que de visualiser directement les cellules souches musculaires grâce à leur marquage par une protéine fluorescente rouge (tdTomato). Nous pouvons étudier la restauration de l'expression de la dystrophine-EGFP avec un modèle contenant une mutation stop, modèle de la maladie DMD très utilisé mais qui a un phénotype dommageable

très léger. C'est pourquoi ce modèle est surtout utilisé pour évaluer l'efficacité des thérapies moléculaires visant à une restauration de la protéine manquante.

D'une part, nous allons étudier in vivo l'efficacité et la pharmacodynamique de molécules thérapeutiques de la maladie qui ont été développées dans notre laboratoire et qui constituent une des approches thérapeutiques actuelles les plus prometteuses pour DMD (essai clinique en cours de préparation). Il est crucial aussi pour nous avant de passer chez l'homme, de déterminer au mieux la cinétique, dynamique et sites de la restauration de la dystrophine in vivo chez la souris.

Par ailleurs, ce projet vise à adresser certaines questions plus fondamentales sur l'expression et le rôle de la dystrophine. Tout d'abord pour savoir si les cellules souches musculaires expriment cette protéine in vivo. Si c'est le cas, les thérapies visant à rétablir l'expression de la dystrophine dans les muscles devraient aussi avoir pour objectif de rétablir l'expression dans les cellules souches.

Enfin, une autre question fondamentale que nous voulons adresser chez le mammifère in vivo, est la dynamique et la cinétique d'expression et d'adressage de la protéine dystrophine à la membrane de la fibre musculaire par des techniques d'imagerie à fluorescence. Ces résultats pourraient améliorer notre compréhension de la protéine qui manque aux patients DMD et permettraient d'améliorer ou prédire les effets des thérapies pour cette maladie.

Réduction : Nous estimons un total de 236 souris pour ces trois points adressés dans ce projet. Ce nombre est en accord avec les principes de raffinement et de réduction. Les études menées sur ces animaux n'ont pas fait l'objet d'études antérieures dans d'autres pays. Nous avons déjà effectué des études préalables pour réduire le nombre d'animaux utilisés et sélectionner les molécules/chimies d'intérêt que nous voulons étudier de plus près par imagerie intravitale pour la pharmacocinétique de la thérapie. Ce nombre est le minimum nécessaire pour pouvoir conclure.

Remplacement : Dans le respect de la règle des 3R, les études sont d'abord effectuées in vitro ou ex vivo sur des cultures de cellules souches ou de fibres isolées, avant de passer à l'animal pour confirmer que la même chose se produit dans l'organisme ou pour approfondir l'étude avec une cinétique de restauration de l'expression de la protéine qui ne peut se faire que sur un même animal dans le temps.

Raffinement : Les animaux sont anesthésiés pendant l'expérimentation et sont suivis régulièrement avec une grille de score déterminant les critères d'arrêt.

18915 Les infections hépatiques virales chroniques sont l'une des causes majeures de maladie du foie. L'hépatite C et l'hépatite B constituent les formes les plus graves d'hépatite virale, capable d'engendrer une atteinte chronique du foie à risque de complications graves. On estime que 325 millions de personnes vivent dans le monde avec une infection chronique par le virus de l'hépatite B (VHB) ou de l'hépatite C (VHC).

Malgré la disponibilité d'un vaccin efficace contre le VHB, le nombre de personnes infectées est considérable et les traitements actuels ne permettent pas de guérir de l'infection. Contrairement à l'hépatite B, il n'existe pas de vaccin efficace contre l'hépatite C mais de nouvelles molécules antivirales sont disponibles pour éliminer l'infection par le VHC. Cependant, beaucoup de personnes contaminées par le virus ignorent qu'elles sont infectées jusqu'à ce que la maladie se déclare et à ce stade, ces molécules sont moins efficaces. Il reste donc très important de mettre au point un traitement contre ces virus.

Les études dans les modèles in vitro d'infection par ces virus sont limitées et ne permettent pas d'étudier l'implication du système immunitaire dans la physiopathologie et la réponse de l'hôte. Ils ne permettent pas également d'étudier la validation de molécules antivirales en termes de métabolisme et de pharmacologie dans un contexte plus élaboré faisant intervenir des paramètres indispensables tels que la structure de l'organe foie et le métabolisme. Il est donc nécessaire de passer par une phase de caractérisation, d'efficacité et d'innocuité sur des modèles animaux.

Les VHB et VHC ne peuvent infecter que les humains et les primates, les souris humanisées avec un foie humain est l'un des meilleurs modèles d'étude. Cependant, il n'est pas possible d'étudier la

composante immunitaire dans les infections VHC et VHB dans ce modèle dépourvu de système immunitaire.

L'objectif de ce projet est donc la mise en place de souris double humanisées pour le foie et le système immunitaire afin d'étudier la physiopathologie et les réponses immunes dirigées contre ces 2 pathogènes mais également de faire des études immunologiques et métaboliques.

Ces souris génétiquement modifiées, combinent une immunodéficiences qui permet la prise de greffe après injection de cellules souches hématopoïétique humaines et une déficiences pour une enzyme du foie entraînant une pathologie hépatique qui permet de remplacer les cellules hépatiques murines par des cellules hépatiques humaines une fois injectées. Des prélèvements sanguins périodiques permettront de suivre l'humanisation, une fois le modèle établi, les souris seront infectées par les VHB et VHC pour valider l'infection.

Le nombre d'animaux par groupe a été réduit au minimum sans toutefois compromettre l'analyse statistique des résultats. Ce projet nécessitera 680 souris au total.

Tout au long des expériences, nous veillerons au bien-être des animaux, à réduire au maximum la souffrance et l'anxiété des souris grâce à :

- l'administration d'un traitement NTBC afin de prévenir la pathologie hépatique.
- l'administration d'un analgésique adapté pour la chirurgie.
- la manipulation des animaux par un personnel expérimenté et sensibilisé au bien-être animal.

18916 L'intégrité intestinale est associée à une altération du métabolisme et de la signalisation immunitaire et, de manière critique, est un signe avant-coureur très précoce de la mort. Ses découvertes suggèrent que le dysfonctionnement de la barrière intestinale peut être un facteur important dans la physiopathologie du vieillissement. Les stratégies classiques d'étude du vieillissement reposent sur une vision continue des processus impliqués. Un modèle de vieillissement en deux phases a été développé. Il repose sur la modification de la perméabilité intestinale qui augmente avec l'âge des individus. La phase 1 est caractérisée par une perméabilité intestinale normale et une grande espérance de vie. La phase 2 est caractérisée par une forte perméabilité intestinale et une faible espérance de vie. Découvert initialement chez la Drosophile, ce modèle a ensuite été étendu à d'autres organismes modèles : *C. elegans*, *D. rerio* et *N. furzeri*. Ce modèle permet d'établir de nouvelles approches afin d'étudier le vieillissement en le séparant en deux phases distinctes pouvant être analysées indépendamment et permettant ainsi d'identifier des caractéristiques du vieillissement précédemment masqué. Par exemple, des protéines détectées uniquement chez les individus en phase 2 ont été identifiées et leur inhibition en phase 1 ont entraîné une augmentation significative de la durée de vie. Ainsi, certains changements survenant au cours de la phase 2 de la vie peuvent être contrecarrés au cours de la phase 1 afin d'améliorer la longévité des individus. L'extension de ce modèle de vieillissement aux mammifères aura un impact considérable sur la perception du vieillissement dans la population humaine ainsi que sur la façon dont il est traité. En effet, une meilleure capacité de prédiction du risque de survenue de la mort chez un individu permettra de mieux suivre les individus les plus à risque pour en comprendre l'origine et éventuellement réduire ce risque. L'application du modèle d'étude développé chez de multiples organismes modèles aux mammifères permettra de développer une compréhension plus profonde des mécanismes à l'œuvre dans la mort liée au vieillissement. Le but du projet est donc de transférer le modèle de la Drosophile vers la Souris afin de (1) mettre en évidence les phase 1 et 2 du vieillissement chez un mammifère couramment utilisé en physiologie, (2) d'étendre les découvertes faites chez la drosophile pour permettre des interventions génétiques et pharmacologiques chez les mammifères, (3) de permettre une meilleure compréhension des changements métaboliques précoces associés au vieillissement chez l'humain pour mieux suivre les individus à risque et réduire ce risque. Le but est de prolonger la phase 1 chez l'humain avant l'apparition de maladies critiques liées au vieillissement qui apparaissent en phase 2. Afin de réaliser ce projet des souris (*Mus musculus*) seront utilisées. Sur ces animaux 2 tests expérimentaux seront effectués : (1) Test de perméabilité intestinale et (2) Mesures métaboliques. Cette étude ne peut être remplacé par d'autres moyen car le projet porte sur le vieillissement d'un organisme entier. Ce

modèle a déjà été caractérisé chez 4 espèces différentes, la souris est le modèle mammifère le plus approprié. En effet, les systèmes métaboliques et physiologiques de la souris sont suffisamment proches de l'homme pour servir de base à l'évaluation de futurs traitements. De plus le projet cherche à caractériser le vieillissement de l'organisme entier, ce projet ne peut donc pas être remplacé par des approches ex vivo. Le minimum de souris nécessaire à valider le modèle sera utilisé tout en respectant le bien-être animal et la règle des 3 R. Au cours de ce projet de 2 ans, 50 souris femelles seront utilisées (à l'aide du logiciel G*Power 3. 1. 9. 2 nous avons déterminé qu'il nous faut 50 animaux par expérience.). Les procédures seront raffinées pour réduire au minimum la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux. Toutes les conditions sont réunies pour prendre en compte la douleur de l'animal avec la mise en place de points limites. Les souris seront gardées jusqu'à leur mort naturelle dans un milieu enrichi avec des nids végétaux et des cylindres en cartons pour leur bien-être. 24 animaux seront nécessairement isolés pour les mesures de cages métaboliques qui ne se fait que sur animaux individualisés et le resteront pour ne pas induire un biais lié à des individualisations successives.

18917 Les animaleries d'hébergement suivent et contrôlent leur statut sanitaire de deux façons :

- En limitant l'accès aux animaux qui ont un statut sanitaire identique ou supérieur, sur accord d'un vétérinaire référent.
- En effectuant régulièrement des tests sanitaires sur les animaux hébergés.

Suivant le statut sanitaire d'une animalerie, il se peut que des animaux ne puissent pas être transférés d'un établissement utilisateur vers un autre ce qui peut être un frein à un projet et au bon déroulement de la recherche scientifique.

Pour pallier à ce problème de statut sanitaire, nous proposons à la communauté scientifique de réaliser la décontamination de leurs animaux. Ceci signifie : rendre des animaux dépourvus de pathogènes spécifiques pour pouvoir coïncider avec la plupart des statuts sanitaires.

Il existe 3 techniques en fonction du matériel dont dispose le chercheur :

- Technique réalisée via animaux vivants. Des ovules fécondés, chez des femelles au mauvais statut sanitaire, sont nettoyés et réimplantés dans des femelles au bon statut sanitaire.
- Technique réalisée via des paillettes de sperme congelé (FIV). Des ovules de femelles sauvages sont mis en contact avec du sperme d'intérêt et les embryons fécondés sont réimplantés dans des femelles au bon statut sanitaire.
- Technique réalisée via des embryons congelés. Des embryons déjà fécondés sont décongelés, lavés, puis réimplantés dans des femelles au bon statut sanitaire.

Avec ces techniques, la descendance sera dépourvue des pathogènes souhaités et pourront être transférés dans l'animalerie voulue.

Pour ce projet, un maximum de 6905 animaux sera utilisé.

Pendant toute la durée du projet nous respecterons la règle des 3R conformément à la réglementation :

- Remplacement : Si le chercheur ne souhaite pas obtenir une lignée tout de suite, nous proposons la cryoconservation de sperme ce qui permet de conserver une lignée non respirante.
- Réduction : Le nombre de mâles et de femelles utilisées par lignée pour les transferts d'embryons est le minimum requis pour obtenir les animaux d'intérêt suite à la redérivation. Les mêmes mâles vasectomisés sont utilisés pendant 2 ans.
- Raffinement : Les animaux ont tous une période d'acclimatation d'au moins une semaine et leur milieu de vie est contrôlé. Toutes les cages sont enrichies avec des carrés de papier compactés qui permettent de créer des nids. Les animaux sont surveillés quotidiennement. Lors des chirurgies, les animaux reçoivent une anesthésie et une analgésie adéquates pour éviter toute douleur. Le réveil se fait sur tapis chauffant. Les animaux sont manipulés par du personnel compétent pour éviter tout stress.

18918 La thérapie génique est une stratégie innovante de médecine moléculaire consistant à transférer un acide nucléique thérapeutique dans des cellules malades pour améliorer l'état clinique d'un patient. Pour véhiculer ce produit thérapeutique, les vecteurs viraux, et en particulier les vecteurs recombinants dérivés des virus adéno-associés (AAVr) constituent des outils de choix. Il a été montré qu'une seule injection avec un AAVr peut permettre une expression à long terme du gène thérapeutique transféré, aussi bien dans des modèles animaux que chez l'homme. Les vecteurs viraux dérivés de l'AAV sont en passe de devenir des produits thérapeutiques et plusieurs de ces vecteurs viennent d'obtenir récemment une autorisation de mise sur le marché. Néanmoins, malgré des succès récents, plusieurs facteurs majeurs limitant l'efficacité du transfert de gène *in vivo* à l'aide d'AAVr dans les essais cliniques proviennent de la large biodistribution des AAV après injection mais également de la réponse immunitaire dirigée contre la capsid du vecteur ou du transgène. Ces limites nécessitent d'injecter de fortes doses chez le patient, et concernant la réponse immunitaire cela peut engendrer la destruction des cellules transduites, annihilant de fait tout bénéfice de la thérapie génique. L'occurrence de cette réponse immune délétère s'explique par le fait que les hommes sont naturellement infectés au cours de leur vie par des virus AAV sauvages (virus qui ne sont par ailleurs à ce jour associés à aucune pathologie chez l'homme).

Ce projet consiste donc à modifier chimiquement la capsid du vecteur dérivé du Virus Adéno-Associé de sérotype 2 et 8 (AAV2 et AAV8). Il repose sur le couplage de molécules chimiques à la surface de la capsid d'AAV ayant théoriquement des propriétés de ciblage de cellules hépatiques. Ces modifications pourraient permettre d'augmenter « l'activité spécifique » ou encore « l'index thérapeutique » de la particule virale recombinante. Parmi les conséquences souhaitées, ces particules virales modifiées par voie chimique pourraient favoriser la transduction spécifique du foie. Cette dernière propriété, s'il elle était démontrée, ouvrirait notamment des possibilités de réduction des doses administrées.

Des premiers tests d'efficacité seront effectués *in vitro* sur différents types de cellules en culture pour évaluer l'effet de la modification chimique sur le vecteur. Cependant, les modèles *in vitro* ne peuvent s'approcher de la complexité des interactions entre le vecteur et l'environnement biologique *in vivo* et rendent donc difficile la reproductibilité de ces résultats *in vivo*. L'utilisation de la souris est donc justifiée à la fois pour évaluer ces différents paramètres. Grâce au premier test d'efficacité réalisé *in vitro*, le nombre d'animaux à utiliser en sera donc réduit.

En comptant les groupes contrôles, nous avons estimé que nous aurons besoin d'au plus de 252 souris mâles pour l'expérimentation. Les animaux recevront le vecteur par injection en Intra veineuse et des prélèvements sanguins seront réalisés. Ces procédures seront réalisées sous anesthésie gazeuse évitant tout stress et désagrément aux animaux. Les vecteurs AAVr ont déjà été administrés chez la souris à des doses supérieures ou égales à ce qui est envisagé dans ce projet, sans observation de signe clinique notable. Néanmoins, une courbe de poids hebdomadaire et une observation journalière des animaux seront réalisées. Des points limites ont été mis en place afin de pouvoir réagir au plus vite en cas de souffrances pour l'animal.

Application de la règle des 3R :

1- Réduction :

Grâce au premier test d'efficacité réalisé *in vitro*, le nombre d'animaux à utiliser en sera donc réduit. De plus, d'après une revue des publications d'études similaires, 6 animaux par groupe seront suffisants pour réaliser des analyses statistiques pertinentes (comparaison des groupes à l'aide d'un test ANOVA).

2- Raffinement :

Le souci du bien-être animal passera par : de bonnes conditions d'hébergement, un suivi régulier des animaux, l'instauration de points limites pertinents et précoces et par la mise en place de mesures adaptées (anesthésie, analgésie ou euthanasie par des méthodes reconnues).

3- Remplacement :

Les modèles *in vitro* ne peuvent s'approcher de la complexité des interactions entre le vecteur et l'environnement biologique *in vivo*. Il est également impossible de vérifier la biodistribution ou encore l'index thérapeutique de ces particules modifiées sur des cellules en culture. De plus, le foie

est un organe complexe formé par différents types cellulaires. Notre intérêt étant de cibler les hépatocytes sans transduire les autres cellules hépatiques. Cette complexité de ciblage hépatique ne peut pas être évalué in vitro. L'utilisation de la souris est donc ici justifiée pour évaluer ces différents paramètres.

18919 Les expérimentations animales prévues dans le cadre de ce projet de recherche concernent l'évaluation d'implants imprimés en 3D dans un modèle souris nude et rat Lewis en vue d'une régénération et/ou d'une réparation osseuse dans la zone maxillo-mandibulaire.

Plusieurs procédés permettent de régénérer/réparer le déficit osseux : les greffes osseuses autologues (issues du patient lui-même), allogéniques (issues d'un donneur) ou xénogéniques (d'origine animale), les substituts osseux : les biomatériaux phosphocalciques. Les greffons autologues et les substituts osseux peuvent être utilisés de manière isolée ou combinée.

Plusieurs études démontrent des avantages d'utiliser un biomatériau mais aucune d'entre elles ne montrent leur supériorité par rapport au gold standard.

L'optimisation des biomatériaux (micro et macro architecture) via la technologie d'impression 3D permettrait d'améliorer leurs propriétés régénératrices. Une porosité interconnectée favoriserait la diffusion de fluides au coeur de l'implant, la rétention de facteur de croissances circulant, et ainsi l'adhésion de cellules, la néoformation osseuse et la biorésorption du matériau.

L'objectif de cette étude est triple :

1) Objectif 1 :évaluer l'efficacité d'implants imprimés en 3D sur la régénération osseuse

2) Objectif 2 : évaluer l'ajout d'adjuvant : moelle osseuse totale ou autres molécules actives au biomatériau dans le

processus de régénération osseuse.

3)étude de l'inflammation chez les souris C57BL/6

Remplacement : L'utilisation de rongeurs reste nécessaire afin de valider les propriétés des matériaux avant d'envisager des expériences sur de plus gros animaux et l'ultime but : l'utilisation chez l'homme.

La biocompatibilité, l'ostéoinduction, l'ostéointégration, l'ostéoconduction doivent être évaluées en conditions les plus proches possible de l'organisme humain.

objectif 1) Des souris nudes seront utilisées pour évaluer l'effet des matériaux sur la formation osseuse en condition ectopique (site non osseux) : en sous cutané, pour étudier l'effet ostéoinducteur des matériaux et plus particulièrement l'effet du traitement des matériaux avec un adjuvant bioactif qui sera dans un premier temps de la moelle osseuse totale (MOT).

Réduction : Pour limiter le nombre d'animaux utilisés, 4 implants peuvent être insérés dans le dos de la souris. Afin de limiter l'effet des variations inter-souris dans la comparaison de l'ajout de moelle osseuse. Nous insérerons un même type d'implant pré-traité ou non avec l'adjuvant dans une même souris.

Des rats consanguins Lewis nous serviront à récolter le premier adjuvant testé, la moelle osseuse totale. Nous implanterons la MOT de rats chez la souris nude sans risque accru de déclenchement des réactions immunitaires car la souris nude est immunodéprimée. De plus, le fait d'utiliser des rats plutôt que des souris nous permettra de récolter de plus importante quantité de MOT. La quantité d'animaux à utiliser sera ainsi limitée Nous réaliserons 5 lots d'expériences (5 matériaux testés). 8 conditions et 6 implants par conditions pour être suffisamment puissant statistiquement $48/4 = 12$ Souris *5 (60 souris au total).

Nous prévoyons de réalisé un point de cinétique plus long dans la mesure où à 8 jours, aucune repousse osseuse n'est observé.

Cela double le nombre de souris à utiliser. (120 souris)

Différentes conditions nous servirons de contrôle et de référence.

- 1) Implants imprimés en 3D avec une architecture contrôlée : porosité interconnectée (2 designs seront testés : porosités cubiques et cylindriques) - avec ou sans adjuvant
- 2) Implants sans architecture contrôlée (implant dense sans porosité). Avec ou sans adjuvant
- 3) Implants de référence (BCP 20/80) avec ou sans adjuvant

Après 8 semaines, les souris seront euthanasiées et les implants récupérés pour analyse.

Un prélèvement sanguin sera réalisé post-euthanasie afin d'étudier l'inflammation (vitesse de sédimentation, protéine C réactive, nombre de leucocytes).

objectif 2) défaut osseux de calvaria chez le rat. Un des modèles les plus pertinents utilisés pour étudier la régénération osseuse dans de nombreuses équipes est le défaut critique (5mm) de calvaria chez le rongeur. Par conséquent, ce modèle d'étude sur le rat consanguin Lewis a été étudié depuis plusieurs années, publié et validé.

Des rats Lewis serviront de modèle pour réaliser des défauts dans la calvaria pour y implanter les implants imprimés en 3D.

Réduction : Deux défauts peuvent être réalisés chez un rat

Différentes conditions nous serviront de contrôle et de référence.

- 1) Implants imprimés en 3D avec une architecture interconnectée avec ou sans adjuvant
- 2) Implants poreux déposé par apposition osseuse traité ou non
- 3) Implants sans architecture (implant dense sans porosité) avec ou sans adjuvant
- 4) Implant de référence (BCP 20/80) avec ou sans adjuvant
- 5) BCP + greffe osseuse
- 6) Défaut vide

Nous testerons 5 matériaux (5 lots d'expériences), nous avons 10 conditions et mettons 2 implants par rat : nous utiliserons donc $5 \times 2 = 10$ conditions \times 2 implants par rat = 20 implants par condition = 100 implants au total

Les rats seront euthanasiés 7 semaines après l'opération et les implants récupérés pour analyses.

3) Pour étudier l'inflammation, nous utiliserons des souris femelle BL57/6.

Nous implanterons en sous cutané nos matériaux d'intérêt, le contrôle ciment et un contrôle positif de l'inflammation (LPS).

Nous prévoyons de réaliser 5 lots d'expérience pour tester 5 matériaux d'intérêt. Et pour chaque condition 6 matériaux pour valider la puissance statistique.

Réduction: nous implantons 4 implant par souris (de chaque côté des membres)

Nous prévoyons d'utiliser un total de 25 souris

Raffinement : Les animaux seront maintenus dans un cycle jour/nuit de 12h/12h avec un accès à l'eau et à la nourriture à volonté. Le nombre d'animaux par cage est de 5 pour les souris et 2 pour les rats pour limiter le stress de la surpopulation ou de l'isolement. Des brindilles de papier pour les souris et des tunnels pour les rats sont placées dans la cage pour permettre aux animaux de s'enfourer et se cacher.

Nous utiliserons un total de 295 animaux.

-procédure 1 (étude de la repousse osseuse : 60 souris 8 semaines+60 souris 12 semaines (dépendra de la réponse à 8 semaines) =120 souris pour la procédure 1

$$120+150+25=295$$

Nous utilisons plus de rats que de souris car nous ne pourrions implanter que 2 matériaux dans la calvaria d'un rat contrairement à 4 matériaux chez une souris (voir annexe1)

Les analyses statistiques seront réalisées par le test non paramétrique anova one way suivi de post oc test :

Kruskall-Wallis pour plus de 2 groupes), puisque le nombre de sujets est inférieur à 30 pour chaque analyse.

La douleur sera prise en charge avant et pendant l'opération par une infiltration sous-cutanée avec 1% d'adrénaline lidocaïne pour une anesthésie locale.

En post opératoire une injection sous cutanée de buprénorphine (0,05 mg / kg) sera effectuée pour soulager la douleur pendant au moins deux jours puis plus si besoin.

18920 Des prélèvements, biopsies ou relevés de paramètres physiologiques sont ponctuellement nécessaires pour la mise au point de tests/calibrage d'appareils/choix de paramètres à inclure dans une étude avant sa planification et réalisation chez le primate non humain (PNH). Dans ce contexte, nous serons amenés à réaliser, chez un nombre restreint d'animaux, ces prélèvements/relevés nécessaires à l'évaluation de la pertinence des tests/études à réaliser. Ceci contribuera au raffinement des méthodes utilisées pour mener à bien les études et à réduire le nombre d'animaux utilisés dans les études si ces mises au point ne sont pas concluantes (renforcement de la règle des 3Rs).

Ce projet prévoit d'utiliser un maximum de 120 PNH sur 5 ans, qui proviendront d'un élevage agréé. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions (grille d'évaluation du bien être animal, entraînements aux procédures avec récompense, limitation des prélèvements et volumes). Le personnel est entièrement formé. Les animaux seront sous la responsabilité du vétérinaire de l'installation.

Les animaux seront suivis individuellement et quotidiennement tout au long des procédures expérimentales (suivi clinique, poids, température) afin de détecter tout signe de douleur et/ou de détresse. Un examen préliminaire par le vétérinaire sera réalisé pour juger de l'état de santé de l'animal avant toute procédure expérimentale. Des mesures préventives et correctives seront également définies en fonction de l'apparition de tout signe clinique de stress ou de douleur, qu'il soit lié au protocole ou non. Des points limites sont définis pour décider de sortir l'animal de la procédure si des effets inattendus apparaissent. Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés.

Les animaux seront hébergés par groupes sociaux dans des volières conformes aux recommandations et bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la structure du bien-être animal de l'installation, notamment la mise à disposition de jouets dans les hébergements (kong, ballon, tube PVC...). Une rotation du matériel d'enrichissement, incluant une désinfection, sera organisée une fois par semaine pour éviter la lassitude et renouveler l'intérêt des animaux. Des friandises seront également distribuées systématiquement en fin de journée aux animaux. De même, le personnel veillera à garder une interaction quotidienne avec chaque animal afin de diminuer le stress qui pourrait être engendré par les manipulations.

Si les animaux sont réutilisés de projets précédents, il sera veillé à ce que la gravité des procédures expérimentales ne dépasse pas le stade modéré.

18921 Ce projet vise à évaluer l'effet thérapeutique d'anticorps dirigés contre certaines cellules du système immunitaire, des lymphocytes B, dans un modèle de sclérose en plaques (SEP) dans le but de proposer une nouvelle thérapie. La SEP est une maladie inflammatoire du système nerveux central (SNC). Elle est la première cause de déficit neurologique chez le jeune adulte (20-40 ans). Les femmes sont atteintes deux fois plus que les hommes, et le coût socio-économique de la SEP est second après les traumatismes dans ce groupe d'âge. Il n'y a pas actuellement de traitement curatif pour la SEP qui est donc une maladie chronique durant la vie du patient. Certains traitements permettent d'en ralentir la progression chez certains patients, en particulier les traitements ciblant le système immunitaire.

Le système immunitaire joue un rôle pathogène dans la SEP du fait de lymphocytes qui attaquent le SNC. En particulier, un type particulier de lymphocytes, les lymphocytes B, jouent un rôle délétère dans cette pathologie car des traitements déplaçant l'ensemble des lymphocytes B permettent une amélioration de cette pathologie chez certains patients. Une limitation de ces traitements est néanmoins qu'ils éliminent l'ensemble des cellules B alors que nous savons aujourd'hui qu'il existe aussi des sous-populations de cellules B qui sont protectrices au cours des maladies auto-immunes,

en plus de celles qui provoquent la maladie. Il y a donc un grand espoir qu'il soit possible d'améliorer le traitement de la SEP en développant des traitements qui ciblent de manière différentielle les cellules B pathogéniques et les cellules B protectrices afin d'éliminer les premières tout en préservant l'effet bénéfique des secondes. La mise au point de nouvelles approches permettant d'atteindre ce but devrait améliorer l'efficacité et la sûreté des traitements ciblant les lymphocytes B. En effet, l'élimination de l'ensemble des lymphocytes B, comme réalisé par les traitements actuels, peut augmenter la susceptibilité des individus aux maladies infectieuses, et empêche ces individus de répondre efficacement aux vaccins injectés après l'élimination de leurs lymphocytes B. Les traitements que nous utiliserons ici sont des anticorps ciblant de manière différentielle les sous-populations de lymphocytes B.

La SEP peut être modélisée chez la souris, et il a été montré dans un tel modèle que certains lymphocytes B avaient un rôle pathogène alors que d'autres lymphocytes B avaient un rôle protecteur, comme chez les patients atteints de SEP. Le but de ce projet est d'améliorer les thérapies ciblant les cellules B en utilisant des anticorps permettant de moduler de manière bénéfique les fonctions des lymphocytes B, plutôt que de les éliminer dans leur totalité. Pour cela, nous étudierons comment ces anticorps influencent le développement de la maladie dans un modèle pré-clinique de SEP, quand ils sont administrés dès l'immunisation induisant la maladie. Nous étudierons également si ces anticorps peuvent améliorer la progression de la maladie lorsqu'ils sont administrés à des souris montrant déjà des signes cliniques de cette maladie. Nous caractériserons leur mode d'action et définirons quelles cellules sont ciblées par ces anticorps au cours de la maladie. Enfin, nous analyserons si ces anticorps préservent la capacité des cellules B à répondre contre des vaccins modèles.

Ce travail sera effectué en utilisant un modèle pré-clinique de SEP chez la souris, qui a été validé pour sa valeur translationnelle, ayant permis le développement de nouveaux traitements aujourd'hui utilisés pour la SEP. L'induction de cette maladie modèle se fait par immunisation sous-cutanée avec de la myéline d'oligodendrocyte (MOG) et administration de toxine de pertussis par voie intrapéritonéale. Pour prendre en compte les 3R (réduction, remplacement, raffinement), les protocoles expérimentaux nécessaires pour ce projet ont été optimisés par des expériences in vitro en vue de remplacement de manière à réduire le nombre de souris nécessaires. En outre, les anticorps utilisés dans ce projet ont été sélectionnés parmi un plus large panel d'anticorps sur la base de leur action sur les cellules B dans des systèmes de remplacement in vitro pour réduire le nombre de souris à utiliser. L'effet de ces anticorps a été étudié in vitro afin de remplacer le recours à l'expérimentation animale. Le protocole d'induction de cette maladie modèle par immunisation a été l'objet de raffinement de manière à ce que les souris entrent en rémission rapidement après un court épisode clinique de manière à réduire la souffrance des souris. Le protocole d'induction de cette maladie modèle a de plus été raffiné de manière à ce que la maladie se développe de manière homogène chez des souris identiques génétiquement, ce qui permet une réduction du nombre de souris utilisées tout en permettant d'obtenir des résultats statistiquement valides. Les symptômes de cette maladie modèle apparaissent environ à jour 11 après immunisation, et s'accompagnent d'une paralysie ascendante pendant quelques jours, puis les souris entrent en rémission. Les souris sont examinées quotidiennement tout au cours de la maladie, et sacrifiées en cas de point limite atteint selon une échelle de score internationalement reconnue. Dans ce projet, nous évaluerons également l'effet de ces nouveaux traitements candidats sur l'immunité vaccinale en vaccinant des souris avec des antigènes modèles inertes. Cette étude est prévue sur 5 ans et nécessitera un maximum de 591 souris. Le bénéfice attendu de ce projet est l'optimisation des thérapies utilisant des anticorps pour cibler les cellules B pour améliorer le traitement de la SEP qui est actuellement prise en charge par des agents immunosuppresseurs non spécifiques.

18922 La dégénérescence des cellules ganglionnaires de la rétine est l'une des principales causes de cécité dans le monde occidental. Cette dégénérescence peut conduire à une cécité complète et est souvent observée au cours de diverses pathologies telles que le glaucome, la rétinopathie diabétique ou des neuropathies optiques. Suite à ces pathologies, la communication entre la rétine

et le cerveau est rompu et il n'existe à ce jour aucun traitement à ces atteintes des cellules ganglionnaires de la rétine.

Les approches thérapeutiques testées ici se basent sur l'optogénétique et la sonogénétique. Ces techniques permettent de rendre des neurones sensibles soit à la lumière pour l'optogénétique soit aux ondes ultrasonores pour la sonogénétique. Ces deux approches permettent en particulier de stimuler spécifiquement un type cellulaire en laissant les cellules voisines intactes.

Ce projet vise à montrer qu'il est possible de restaurer la perception visuelle en réintroduisant de l'information visuelle directement dans les zones des centres visuels supérieurs ; le thalamus et le cortex visuel primaire. Dans ce projet, nous voulons étudier sur un modèle animal la possibilité d'utiliser l'optogénétique et la sonogénétique dans la rétine et des aires visuelles cérébrales comme outil pour une restauration visuelle. Cette approche se fait en deux étapes. La première consiste en une modification de neurones par transfection de vecteurs permettant la synthèse d'une protéine soit sensible à la lumière soit sensible aux ultrasons. L'activation de ces protéines permet de créer un courant électrique au travers de la membrane cellulaire et d'activer ainsi la cellule. Nous pourrions donc contrôler l'activité des cellules visuelles grâce à des émissions de lumière à longueur d'ondes spécifiques (optogénétique) ou d'ultrasons (sonogénétique). Ces techniques ont déjà donné des résultats encourageants chez le rongeur et le primate au niveau de différentes structures cérébrales pour l'optogénétique. Très peu d'études se sont intéressées à la sonogénétique. Les vecteurs seront injectés soit dans la rétine soit dans une aire cérébrale, relais de l'information visuelle (le cortex visuel primaire ou le noyau géniculé latéral dans le thalamus, LGN). Cette étape permet de rendre photosensibles (ou mécanosensibles) les cellules ganglionnaires de la rétine ou les neurones corticaux ou du LGN. La seconde étape consiste en l'enregistrement des activités neuronales induites par les stimulations optiques ou ultrasoniques par différentes méthodes (l'imagerie optique ou ultrasonore fonctionnelle et les enregistrements électrophysiologiques unitaires).

Dans une première phase du projet, nous apporterons une meilleure compréhension de l'organisation de la chaîne visuelle et définirons avec précision les projections des neurones de l'œil aux centres visuels supérieurs en injectant dans l'œil des combinaisons de protéines Brainbow, qui permettent de repérer chaque neurone par une couleur unique.

Dans une seconde phase, nous appliquerons l'optogénétique (ou la sonogénétique) pour réintroduire de l'information visuelle directement dans les zones des centres visuels supérieurs (le thalamus et le cortex visuel primaire).

Pour ce projet, le modèle retenu est celui des primates non-humains, qui est le seul à présenter des propriétés anatomiques similaires à l'humain au niveau des fonctions cérébrales et de l'anatomie de l'œil (notamment de la rétine), et qui est capable d'apprendre des tâches comportementales complexes. Pour cette étude, il est impossible de remplacer le modèle animal par tout autre modèle qui ne représenterait que partiellement un organisme, un système biologique intègre, de l'œil jusqu'au cerveau, étant indispensable. Ce projet s'appuie sur des études préalables *in vitro* et chez le rongeur, ainsi que des méthodes de restauration visuelle déjà testées chez le primate. De plus, nous croiserons nos protocoles dans la mesure du possible en réalisant des acquisitions (électrophysiologie / imagerie par ultrasons) sur des animaux anesthésiés issus d'autres protocoles et destinés à être euthanasiés. Ce nombre total de 24 correspond au minimum nécessaire pour obtenir des données statistiquement significatives. Les animaux, nés en captivité, proviendront d'élevages agréés à des fins scientifiques.

Les primates sont hébergés par paire ou en groupe dans des cages conformes aux lignes directrices de l'annexe A révisée de la STE 123, les cages contiguës comportent des dispositifs de contact tactile et visuel, le groupe est maintenu en communauté visuelle, sonore et tactile.

Nous prendrons soin de considérer la règle des 3R pour le bien-être des animaux :

- Remplacer : il nous est malheureusement impossible de remplacer l'animal car nous avons besoin d'un système biologique intègre : de l'œil jusqu'au cerveau. Cependant, des premiers essais *in-vitro* et *ex-vivo* ont déjà été réalisés pour les méthodes de restauration visuelles qui seront testées sur le primate de façon *in-vivo*.

- Réduire : Nous allons utiliser au maximum le principe des fenêtres chroniques afin de pouvoir réutiliser un même animal sur de multiples sessions d'expérimentation. Enfin, sur les animaux destinés à être euthanasiés, nous pourrons réaliser sous anesthésie diverses acquisitions (électrophysiologie/imagerie par ultrasons) avant la mise à mort. Globalement, l'étude longitudinale des animaux minimise le nombre d'animaux utilisés.

- Raffiner : Nous effectuerons des scans IRM préalablement afin de localiser les zones d'injections particulièrement pour le LGN. Lors des chirurgies préalables aux expériences nous prendrons grand soin des anesthésies et des analgésies réalisées avec des tests réguliers à la douleur. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions et des critères de points limites sont prévus pour prendre en compte des effets inattendus qui engendreraient une souffrance de l'animal pour laquelle les traitements classiques (antalgiques, analgésiques) n'auraient pas d'effet. De plus, une surveillance régulière sera effectuée auprès des animaux afin de s'assurer de leur bien-être constant. Nous respecterons des conditions stériles nécessaires lors des chirurgies afin d'éviter toute infection. En cas besoin, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie. Une volière sera également mise à leur disposition régulièrement. Les techniques permettant de déterminer une activité cérébrale (ultrasons fonctionnels et mesures d'électrophysiologie) seront réalisées avec un minimum de chirurgies requises afin de réduire les opérations ainsi que le nombre nécessaire d'animaux.

18923 CONTEXTE

Les immunothérapies ont permis de grandes avancées dans le traitement des cancers. Malheureusement, les taux de réponse aux immunothérapies restent encore limités. Un défi urgent est donc de développer de nouvelles molécules permettant d'améliorer l'efficacité des immunothérapies actuelles. Grâce à leur capacité à activer le système immunitaire, les immunostimulants ont le potentiel d'améliorer l'efficacité de ces immunothérapies, tout en minimisant leur toxicité.

Un candidat médicament a ainsi été développé. Des études préliminaires ont démontré qu'il s'agit d'un puissant stimulateur des cellules immunitaires avec un meilleur profil de sécurité que les autres molécules existantes.

Afin de poursuivre le développement de ce produit, il est à présent nécessaire d'évaluer son efficacité dans un modèle tumoral chez le lapin (Modèle VX2) qui est un modèle plus proche de l'Homme en terme de sensibilité à ce type d'immunostimulant et plus pertinent au niveau immunitaire.

OBJECTIF

L'objectif de ce projet est donc de valider l'activité et l'efficacité du candidat médicament dans un modèle animal non rongeur pertinent, le lapin. Ceci permettra d'apporter la preuve de concept de l'efficacité de cette nouvelle thérapie innovante dans le cadre du traitement du cancer avant son passage chez l'Homme.

Ce projet de recherche translationnelle mettra en œuvre 14 lapins au cours de deux procédures de gravité modérée.

14 lapins recevront une greffe de VX2 en sous-cutané au niveau du dos (incision de 5 mm). Dès l'apparition de la tumeur, le groupe traité recevra la molécule à tester par voie intra-veineuse deux fois par semaine. Un suivi quotidien sera réalisé jusqu'à 35 jours maximum.

CONFORMITE AVEC LES 3R

Remplacement : Des études préliminaires in vitro ont permis de valider l'effet antitumoral de la molécule à tester. Cependant, le lapin est le seul modèle animal non rongeur pour lequel un modèle tumoral est disponible et parfaitement maîtrisé : le VX2. Il s'agit donc d'un modèle majeur pour la recherche translationnelle. De plus, à l'inverse des rongeurs, le lapin présente des similitudes importantes avec l'Homme au niveau du système immunitaire et de sa sensibilité aux immunostimulants testés, ce qui en fait le modèle idéal pour cette étude.

Raffinement : Des études chez le rongeur ont également permis de valider l'innocuité du traitement et une étude de pharmacocinétique a été menée chez le lapin au préalable pour déterminer la dose à utiliser. La procédure d'implantation du modèle VX2 est parfaitement maîtrisée par l'équipe. Un scoring simple permet d'évaluer l'état de l'animal. La connaissance du modèle permet de mettre en place des points limites précoces minimisant ainsi la souffrance potentielle. Enfin, un programme de sociabilisation des lapins est mis en place permettant aux animaux d'évoluer dans des espaces plus grands avec davantage d'enrichissement de façon périodique.

Réduction : L'effectif de chaque groupe a été calculé afin de permettre une analyse statistique pertinente des résultats tout en réduisant au maximum le nombre d'animaux.

18924 Rechercher un stimulus pertinent dans un environnement complexe (tel un ami dans un foule ou un prédateur camouflé) est une tâche complexe mais indispensable à notre survie. Cela nécessite de comparer ce que l'on regarde à ce que l'on recherche (prérequis contextuel). Cette comparaison repose sur l'interaction d'un grand nombre de processus neuronaux incluant l'extraction d'information sensoriels ainsi que des processus cognitifs tels l'attention visuelle sélective ou la prise de décision. Chez les primates, les caractéristiques visuelles (traits) sont extraites dans les aires corticales occipitales. Par exemple, les neurones de l'aire V4 sont sélectifs à l'orientation et la couleur. Toutefois, la quantité d'information présente dans une scène visuelle est trop importante pour que le cerveau la traite rapidement et effectivement. Le rôle de l'attention est de sélectionner les informations en fonction de leur pertinence comportementale en renforçant le traitement des traits pertinents. Ainsi, si nous savons que notre amie porte une chemise rouge et un chapeau melon, le cerveau traitera en priorité les stimuli rouges et de forme arrondie. Ces modulations attentionnelles ont pour origine des signaux en provenance du cortex préfrontal. Toutefois, la nature exacte de ces signaux et leur mode d'interaction avec les neurones du système visuel restent inconnus.

De plus, chacun des traits visuels basiques (direction du mouvement, couleur...) est encodé par des populations de neurones différentes. Hors, il est rare que nous recherchions un seul trait visuel particulier. Il est donc nécessaire de regrouper toutes les représentations pertinentes de manière à encoder une représentation unitaire des stimuli visuels. Décider de la pertinence d'un stimulus (cette personne est-elle l'amie que j'attends ?) nécessite donc de comparer ces représentations de ce que l'on regarde à une représentation interne du stimulus recherché (ce que l'on recherche). Cela implique que les signaux sensoriels ascendants, filtrés au préalable par l'attention visuelle, et les signaux cognitifs soient intégrés et comparés. Le cortex pariétal est un candidat parfait pour effectuer cette comparaison. Ses neurones intègrent en effet ces 2 types de signaux : 1) les signaux sensoriels représentant uniquement l'identité des stimuli observés. 2) un signal descendant représentant l'identité du stimulus recherché. De plus, une sous population différente de neurone du cortex pariétal répond uniquement lors de la détection des stimuli visuels, participant ainsi à la prise de décision. Ces processus sensoriels et cognitifs (extraction des traits visuels, attention sélective), encodés et contrôlés par au moins 3 aires corticales différentes (cortex visuel occipital, cortex préfrontal et cortex pariétal) interagissent dans le but de faciliter la prise de décision. Ce projet cherche à répondre aux questions soulevées par ce cadre théorique: 1)Comment différents stimuli recherchés sont encodés par les neurones du cortex frontal. 2)Comment ces représentations internes sont transformées en signaux attentionnels descendants capables de filtrer les signaux ascendants représentant les informations visuelles pertinentes. 3)Comment les informations sensorielles (ce que l'on regarde) et cognitives (ce que l'on recherche) sont intégrées, combinées et transformées en une décision par les neurones pariétaux. Je propose d'entraîner deux macaques Rhésus (*Macaca mulatta*) à effectuer une tâche comportementale nécessitant la manipulation de l'attention visuelle et la prise de décision. J'enregistrerai simultanément l'activité de larges populations de neurones des cortex pariétal, frontal et occipital. Cette approche permettra de caractériser et modéliser les flux d'informations entre chaque aire corticale. Ce projet pionnier, focalisé sur les interactions cortico-corticales et sur les liens causaux entre l'activité neuronal et les performances comportementales, permettra de définir un nouveau cadre théorique du contrôle

neuronal des capacités cognitives. Cela devrait être du plus grand intérêt pour les scientifiques et cliniciens impliqués dans l'étude des fonctions cognitives de haut niveau.

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

18925 L'audition est la fonction qui permet de percevoir les sons grâce à l'oreille et aux voies nerveuses de l'audition. La surdité correspond à une diminution de cette capacité.

Elle peut être totale ou partielle, uni ou bilatérale.

Le but de ce projet est d'évaluer la tolérance locale et systémique après l'administration d'une solution nettoyante dans l'oreille de chats suivant deux protocoles d'administration différents : l'un en l'appliquant trois fois par semaine pendant trois semaines et l'autre en l'appliquant une fois par jour pendant deux semaines.

Dans ce projet, 16 chats seront inclus, 8 males et 8 femelles. Les animaux seront répartis aléatoirement en deux groupes. Dans le premier groupe, une lotion nettoyante sera appliquée trois fois par semaine pendant 3 semaines soit 9 applications au total. Dans le second groupe, une lotion sera appliquée 1 fois par jour pendant 2 semaines soit 14 applications au total.

Dans chaque groupe les animaux recevront une solution de contrôle dans une oreille et une solution test dans l'autre suivant l'un ou l'autre des protocoles. Les animaux seront observés quotidiennement. Des examens neurologiques seront réalisés 1 fois par semaine par un vétérinaire. Tout animal présentant une atteinte neurologique sera immédiatement retiré de l'étude.

Un test de BAR (Brain auditory response test) qui servira à mesurer la perte ou le changement du taux d'audition des animaux sera réalisé par un vétérinaire avant la première et suivant la dernière administration sous anesthésie générale.

Un examen vidéo-otoscopique (observations, photos...) et des prélèvements de cérumen sous anesthésie générale seront également effectués sur tous les chats par un vétérinaire une fois par semaine.

Des prélèvements sanguins seront aussi réalisés pour contrôler les paramètres hématobiologiques et biochimiques afin de s'assurer du bon état de santé général des animaux.

Les prélèvements sanguins et les différents tests seront toujours réalisés conformément à la réglementation en vigueur et aux bonnes pratiques vétérinaires.

Dans ce projet, 17 chats seront inclus, 16 animaux administrés et 1 animal réserve si besoin. Ce nombre d'animaux et le nombre minimal pour avoir des résultats interprétables en tenant compte de la variabilité des résultats attendus.

Aucune méthode alternative ne permet actuellement de reproduire les signes de surdité ou tolérance, il est donc indispensable de recourir à l'animal dans son ensemble.

Les animaux seront hébergés par groupe. Les animaux seront isolés jusqu'à leur réveil après les périodes de sédation. Une attention particulière sera apportée à l'enrichissement du milieu avec apport de jouet, arbre à chats, griffoir...

Un suivi quotidien (voire plusieurs fois par jour) sera mis en place pour l'observation générale des animaux et la détection précoce de signe clinique pour une prise en charge rapide d'éventuels effets secondaires.

Toute intervention sur l'animal sera effectuée par une personne habilitée et expérimentée afin de réduire au minimum le stress.

Au total, 17 animaux pourront être utilisés en 1 an dans ce projet.

18926 Notre laboratoire a pour but d'identifier les mécanismes indispensables à la survie tumorale. Nous focalisons nos recherches sur l'étude des protéines de la réparation de l'ADN. En effet la grande majorité des cancers du sein et de l'ovaire (mais aussi certaines tumeurs du pancréas et de la prostate) présente des défauts intrinsèques de la réparation de l'ADN. Ces tumeurs appelées 'BRCA' sont très agressives et souvent associées à une résistance aux chimiothérapies conventionnelles. En effet, les données issues des essais cliniques en cours soulignent la fréquence élevée de résistance aux inhibiteurs des PARP (=traitement anticancéreux) et son association à un échec thérapeutique chez ces patientes. Le développement de nouvelles molécules pour contrer ou limiter la chimiorésistance de ces tumeurs est urgent. Notre but est de développer de nouvelles thérapies ciblées pour le traitement de ces cancers.

Notre laboratoire étudie les mécanismes par lesquels les cellules tumorales BRCA réparent l'ADN. Nous avons identifié plusieurs protéines dont l'inhibition tue les cellules cancéreuses sans affecter la survie des cellules non tumorale. Ces protéines constituent de nouvelles cibles médicamenteuses. Le but de ce projet est de permettre la validation in vivo de nos données obtenues in vitro sur le potentiel de nouvelles cibles thérapeutiques médicamenteuses à induire la mort des cellules cancéreuses. Pour cela, nous implanterons chez la souris des tumeurs du sein ou de l'ovaire BRCA et testerons l'effet de l'inhibition des cibles médicamenteuses à induire la mort des cellules tumorales et bloquer la croissance tumorale.

Cette validation in vivo chez la souris est une étape indispensable à l'affirmation du potentiel thérapeutique d'une nouvelle cible médicamenteuse. Cette validation est également essentielle et préalable au développement futur de nouveaux inhibiteurs chimiques qui pourraient être utilisés chez les patients pour le traitement des tumeurs BRCA.

Remplacement : Avant de débiter toute expérience chez la souris, des études préliminaires permettant d'affirmer le potentiel de nouvelles cibles thérapeutiques seront d'abord menées avec des méthodes alternatives, y compris des cellules in vitro ou une analyse de base de données. Plus précisément, l'identification d'une nouvelle cible thérapeutique est rare. Nous étudierons sur souris uniquement les cibles dont l'inhibition induit la mort spécifiquement des cellules cancéreuses sans affecter la survie des cellules normales.

Réduction : Le nombre de souris sera réduit pour limiter le nombre d'animaux utilisés mais suffisamment grand pour maintenir la significativité statistique pour chaque expérience de xénogreffes. La procédure P1 définira les lignées cellulaires humaines à utiliser en P2 et P3 permettant ainsi de réduire le nombre d'animaux utilisés. Enfin, un suivi par imagerie sera privilégié car il permet d'évaluer la croissance tumorale à différents points sans avoir à sacrifier la souris. Cette imagerie nous permet donc, in fine, de réduire le nombre d'animaux utilisés par expérience.

Pour l'ensemble du projet, le nombre de souris nécessaire est de 3264 souris sur 5 ans.

Raffinement : Toutes les précautions seront prises pour réduire le nombre d'animaux utilisés, tout en assurant une valeur significative des résultats obtenus. En accord avec les recommandations internationales dans le domaine de la cancérologie, les animaux sont suivis quotidiennement afin d'assurer leur bien-être et les expérimentations sont arrêtées avant la souffrance des animaux.

18927 Dans un contexte d'essor mondial de l'aquaculture et de la nécessité de trouver des alternatives à l'utilisation de la farine et de l'huile de poisson dans les aliments aquacoles, un des enjeux majeurs est de faire progresser notre compréhension des mécanismes d'utilisation des nutriments chez les poissons. En ce sens, les travaux que nous avons menés ces toutes dernières années nous ont permis de caractériser pour la première fois chez ces espèces une fonction majeure de contrôle du métabolisme glucidique et lipidique appelée Autophagie Médinée par les protéines Chaperonnes (plus communément connue sous le nom de CMA pour Chaperone-Mediated Autophagy) jusque-là ignorée voire récusée.

Nous proposons à présent, d'approfondir nos connaissances sur le rôle de la CMA chez une espèce phare de l'industrie aquacole française, la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), pour laquelle aucune information n'est actuellement disponible sur cette fonction cellulaire. Nous chercherons en particulier à déterminer l'effet d'une modulation de l'activité de la CMA (par injection d'un activateur pharmacologique spécifique de la CMA (AR7 pour Atypical retinoid 7) au niveau de la cavité abdominale) sur l'utilisation des glucides digestibles. Dans le cadre du remplacement des huiles et farines de poissons dans les aliments aquacoles, les glucides digestibles sont de bons candidats à considérer d'un point de vue économique (facilité de production et coût réduit) mais aussi écologique (limitation des rejets azotés et épargne protéique pour la croissance). Toutefois, pour des raisons encore non élucidées, les truites utilisent mal cette source d'énergie. L'activation de la CMA, par administration de l'AR7, nous permettra ainsi de déterminer précisément son rôle dans l'utilisation métabolique des glucides chez la truite. Plus précisément, il s'agira de déterminer si une activation de la CMA module l'utilisation métabolique des glucides chez cette espèce, et donc l'importance de considérer cette voie de contrôle du métabolisme (ainsi que les marqueurs associés) dans la définition de nouvelles stratégies nutritionnelles basées sur l'emploi de cette source énergétique, et donc garantes du développement durable de la filière aquacole.

Afin de mener à bien cette étude, 44 poissons seront nécessaires. Les animaux (truites de 30g) seront maintenus dans nos installations expérimentales dans des conditions d'élevage optimales garantissant leur bien-être. L'expérimentation comprendra 2 traitements (incluant l'AR7 et un groupe témoin), avec 1 bassin (80L) par traitement et 22 truites par bassin. Une injection (au niveau de la cavité abdominale) de l'AR7 à la concentration de 30 mg/kg de poids vif ou du solvant utilisé pour solubiliser l'AR7 (DMSO, groupe témoin) sera effectuée quotidiennement durant 3 jours. Le groupe témoin permettra de déterminer si les effets observés sont bien spécifiques de l'AR7 et indépendant du DMSO. Les injections seront effectuées après anesthésie des animaux dans un bain de benzocaïne à 30 mg/L pour minimiser au maximum le stress induit par la manipulation des animaux. La dose d'AR7 et de DMSO (0.3 ml/100g de poids vif) ainsi que la durée du traitement ont été déterminées sur la base d'études in vivo publiées précédemment. En outre, les animaliers en charge de l'expérimentation contrôleront quotidiennement le comportement des poissons. Si un comportement atypique était détecté tel que la nage sur le dos ou en vrille, une léthargie, une hyperactivité locomotrice ou encore une perte d'intégrité physique (suite à un cannibalisme ou à des comportements agressifs), les animaux concernés seront immédiatement euthanasiés. Une heure après chaque injection, les animaux seront nourris avec un aliment riche en glucides digestibles (régime HC, pour High Carbohydrates). Ce régime, qui par ailleurs répond parfaitement aux besoins nutritionnels des animaux, a déjà fait l'objet de nombreuses études par le passé et n'induit pas de stress particulier. Après 3 jours de traitement, 11 poissons seront prélevés dans chaque bac 6 h après le dernier repas, et 11 autres 24 h après le dernier repas (temps correspondant respectivement au pic de la glycémie et à son retour à l'état basal). Pour cela, les poissons seront pêchés avec une épuisette et anesthésiés immédiatement dans un bain de benzocaïne à 30 mg/L. Puis les poissons seront euthanasiés dans un bain de benzocaïne à 90 mg/L, et nous effectuerons un prélèvement sanguin sur les animaux morts afin de pouvoir mesurer

différents paramètres plasmatiques (glycémie, triglycéridémie, . . .). Les tissus (foie, muscle, cerveau, reins) seront ensuite prélevés pour des analyses ultérieures en laboratoire. Il s'agira notamment d'analyser l'expression et/ou l'activité des principaux facteurs du métabolisme glucidique ainsi que de la CMA.

Ce projet se conforme entièrement à la règle des « 3R » : Remplacement : les effets physiologiques escomptés (modification du métabolisme intermédiaire) ne peuvent être observés qu'in vivo. Raffinement : Les conditions d'élevage (faible densité des poissons, surveillance quotidienne du comportement et de l'état général des poissons par les animaliers en charge de l'expérimentation) et de manipulation des animaux (aucun prélèvement ne se fera sur animaux vivants et aucune injection ne sera effectuée sans anesthésie) ont été définies de façon à réduire au maximum l'inconfort, la douleur ou l'angoisse subie par les animaux et garantir ainsi leur bien-être. Réduction : le nombre de poissons prélevés est calculé ad minima compte tenu de la variabilité individuelle observée dans les analyses antérieures.

18928 L'homéostasie énergétique est un état d'équilibre entre les apports et les dépenses d'énergie de l'organisme. Le maintien de cet équilibre est assuré par le système nerveux central (SNC), qui a la capacité d'intégrer différents signaux : des hormones (insuline, leptine, ghréline...), des métabolites (acides gras, glucose, acides aminés) ainsi que des signaux nerveux qui le renseignent en permanence sur le statut énergétique de l'organisme. Toute dérégulation de ces signaux affecte la prise alimentaire et le contrôle du métabolisme, entraînant le développement de maladies métaboliques telles que l'obésité ou le diabète de type 2 (DT2) (2), deux pathologies en pleine expansion, pour lesquelles trouver des stratégies thérapeutiques est nécessaire, car elles sont associées à de nombreuses co-morbidités (maladies cardiovasculaires, cancer entre autres).

Le projet global a pour objectif d'étudier l'action de protéines spécifiques présentes dans l'une des aires cérébrales responsables de l'homéostasie énergétique sur la prise alimentaire. Nous caractériserons dans le cas présent le type de neurones exprimant ces protéines.

Ce projet appliquera la règle des 3Rs :

Remplacement : l'étude de la prise alimentaire et du métabolisme énergétique impose que nous utilisions des animaux vivants. Nous testerons cependant l'efficacité de molécules sur des cultures cellulaires.

Réduction : Le nombre d'animaux sera réduit grâce à l'utilisation de tests statistiques. Raffinement : Toutes les mesures seront prises afin réduire le stress, la douleur : notamment l'utilisation d'anesthésiques, d'antalgiques, le bien-être des animaux est primordial et l'enrichissement des cages, l'habituation. 16 souris POMC-cre-mcherry, 16 souris AgRP-cre-mcherry, soit un total de 32 animaux. Ce projet sera réalisé en 2 ans

18929 L'homéostasie énergétique est un état d'équilibre entre les apports et les dépenses d'énergie de l'organisme. Le maintien de cet équilibre est assuré par le système nerveux central (SNC), qui a la capacité d'intégrer différents signaux : des hormones (insuline, leptine, ghréline...), des métabolites (acides gras, glucose, acides aminés) ainsi que des signaux nerveux qui le renseignent en permanence sur le statut énergétique de l'organisme. Toute dérégulation de ces signaux affecte la prise alimentaire et le contrôle du métabolisme, entraînant le développement de maladies métaboliques telles que l'obésité ou le diabète de type 2 (DT2) (2), deux pathologies en pleine expansion, pour lesquelles trouver des stratégies thérapeutiques est nécessaire, car elles sont associées à de nombreuses co-morbidités (maladies cardiovasculaires, cancer entre autres).

Ce projet a pour objectif d'étudier l'effet de la réduction de la synthèse de protéines spécifiques présentes dans l'une des aires cérébrales responsables de l'équilibre énergétique sur la prise alimentaire.

Des chirurgies seront pratiquées suivies d'études de la prise alimentaire et du métabolisme énergétique. Ces expérimentations nous permettront de mettre en évidence l'implication de protéines spécifiques dans le métabolisme énergétique ainsi que de mieux comprendre les

mécanismes impliqués dans la prise alimentaire lorsque la synthèse de ces protéines spécifiques est réduite dans le cerveau.

Ce projet appliquera la règle des 3Rs :

Remplacement : l'étude de la prise alimentaire et du métabolisme énergétique impose que nous utilisions des animaux vivants. Nous testerons cependant l'efficacité de molécules sur des cultures cellulaires.

Réduction : Le nombre d'animaux sera réduit grâce à l'utilisation de tests statistiques. Raffinement : Toutes les mesures seront prises afin réduire le stress, la douleur : notamment l'utilisation d'anesthésiques, d'antalgiques, le bien-être des animaux est primordial et l'enrichissement des cages, l'habituation. Enfin les points limites ont été définis pour l'ensemble des expérimentations et transmis à tout le personnel impliqué dans ce projet. Un total de 202 souris C57BL/6J sera utilisé. Ce projet sera réalisé en 5 ans.

18930 L'homéostasie énergétique est un état d'équilibre entre les apports et les dépenses d'énergie de l'organisme. Le maintien de cet équilibre est assuré par le système nerveux central (SNC), qui a la capacité d'intégrer différents signaux : des hormones (insuline, leptine, ghréline...), des métabolites (acides gras, glucose, acides aminés) ainsi que des signaux nerveux qui le renseignent en permanence sur le statut énergétique de l'organisme. Toute dérégulation de ces signaux affecte la prise alimentaire et le contrôle du métabolisme, entraînant le développement de maladies métaboliques telles que l'obésité ou le diabète de type 2 (DT2) (2), deux pathologies en pleine expansion, pour lesquelles trouver des stratégies thérapeutiques est nécessaire, car elles sont associées à de nombreuses co-morbidités (maladies cardiovasculaires, cancer entre autres).

Ce projet a pour objectif d'étudier l'expression de protéines spécifiques présentes dans l'une des aires cérébrales responsables de l'homéostasie énergétique sur la prise alimentaire.

La synthèse de ces protéines est modulée par différents facteurs, c'est pourquoi protéines seront étudiées en fonction du régime alimentaire, de la glycémie, de la température extérieure. Certains animaux subiront des tests métaboliques afin d'évaluer si ces protéines interviennent dans l'équilibre énergétique. Nous montrerons quelles sont les conditions qui induisent ou réduisent l'expression de ces protéines. Ce projet nous permettra de mieux comprendre l'implication de ces différentes protéines dans l'équilibre du métabolisme et la prise alimentaire.

Ce projet appliquera la règle des 3Rs :

Remplacement : l'étude de la prise alimentaire et du métabolisme énergétique impose que nous utilisions des animaux vivants.

Réduction : Le nombre d'animaux sera réduit grâce à l'utilisation de tests statistiques. Raffinement : Toutes les mesures seront prises afin réduire le stress, la douleur : notamment l'utilisation d'anesthésiques, d'antalgiques, le bien-être des animaux est primordial et l'enrichissement des cages, l'habituation. Enfin les points limites ont été définis pour l'ensemble des expérimentations et transmis à tout le personnel impliqué dans ce projet. Un total de 60 souris C57BL/6J sera utilisé. Ce projet sera réalisé en 2 ans.

18931 Dans son rapport présenté en Février 2017, l'Organisation Mondiale de la Santé lance l'alerte sur le nombre insuffisant de nouveaux antibiotiques en développement et la menace croissante de la résistance aux antimicrobiens. Elle publie également sa première liste « d'agents pathogènes prioritaires », hautement résistants aux antibiotiques, énumérant les familles de bactéries les plus menaçantes pour la santé humaine. En tête de liste de la catégorie « critique » se trouvent les bactéries du genre *Acinetobacter* spp, et en particulier l'espèce *Acinetobacter baumannii*. C'est un pathogène fréquemment associé aux infections nosocomiales (acquises en milieu hospitalier), telles que les pneumonies sévères acquises sous ventilation chez les patients de réanimation ou immunodéprimés. *Acinetobacter baumannii* est le plus souvent résistant à un grand nombre d'antibiotiques, y compris les carbapénèmes, qui constituent l'une des dernières lignes de traitement actuellement disponible (51% de résistance aux carbapénèmes en 2010 et jusqu'à 80% de résistance dans certains pays européens). De ce fait, les infections à *Acinetobacter baumannii*

sont grevées d'une mortalité hautement significative, à hauteur de 40%. C'est dans cette optique qu'une équipe de recherche à développer une classe de composés présentant une activité antibactérienne spécifiques contre de nombreuses souches d'*Acinetobacter baumannii*

L'objectif de ce présent projet est d'évaluer la toxicité et la pharmacocinétique (distribution sanguine) de trois composés HEI administrés par voie intra-péritonéale chez la souris immunocompétente. Pour la pharmacocinétique, du sang sera prélevé sur animal anesthésié à différents temps.

Dans le cadre de cette étude, une attention particulière sera portée au respect de la règle des 3R. Le nombre d'animaux nécessaire pour répondre aux hypothèses et permettre une analyse statistique robuste a été réduit à 5 (pour l'étude de toxicité) ou 4 (pour l'étude pharmacologique) par groupe grâce à l'expérience acquise lors d'études précédentes. Des analyses in vitro ont déjà été réalisées sur l'efficacité de ces composés sur certaines souches d'*Acinetobacter baumannii*. Toutefois l'efficacité de tels composés ne peut être confirmée que dans des modèles pré-cliniques (notamment pour des aspects de diffusion tissulaire), c'est pourquoi aucune stratégie de remplacement ne peut être envisagée. Enfin, un enrichissement du milieu (jouets en plastique, igloos en carton) sera utilisé et une surveillance accrue sera également réalisée pour cette étude (raffinement).

141 souris sont nécessaires pour la mise en œuvre de ce projet.

18932 L'objectif de ce projet est de fournir aux acteurs de la recherche préclinique (recherche médicale, mise au point de médicaments, etc...) un outil d'investigation de la fonction cardio-respiratoire totalement non-invasif, utilisable chez le petit animal. Ce dispositif permet le recueil des données sur un animal éveillé et libre de ses mouvements ou soumis à un exercice physique, avec la seule contrainte du port d'un vêtement (gilet élastique non contraignant recouvrant le thorax avec des capteurs intégrés et connectés à un dispositif d'enregistrement). Ce dispositif pourra donc également être utilisé en remplacement des techniques invasives habituelles nécessitant des actes de chirurgie tout en permettant de recueillir des données physiologiques pertinentes.

La phase de développement technologique est achevée et le gilet est breveté depuis 2015.

La preuve de concept a été apportée : mesure des variables caractéristiques de la fonction cardio-respiratoire sur un rongeur de laboratoire par une technique totalement non invasive ; et d'autre part, la pertinence scientifique de ces variables a été validée par comparaison avec les techniques invasives reconnues comme standard dans le secteur de la recherche préclinique.

Le recours à l'expérimentation chez l'animal dans ce projet est nécessaire pour finaliser la calibration du dispositif dans un contexte de variations importantes du rythme cardio-respiratoire afin de répondre à un nombre élargi d'études pré-cliniques.

Ce projet permettra de poursuivre l'amélioration des qualités éthiques de l'utilisation du gilet. Cela permettra ainsi de réduire le nombre d'animaux utilisés en permettant le suivi dans le temps de chaque individu mais également de raffiner le modèle en limitant les contraintes expérimentales invasives pour l'animal. .

La procédure expérimentale consiste à entraîner les rats équipés du gilet à courir sur un tapis roulant. Les séances d'une durée maximale de 30 minutes d'exercice seront quotidiennes pendant 5 semaines maximum. La vitesse maximale atteinte représente une activité modérée soutenable pendant environ 1h pour un rat adulte. L'ensemble des expérimentations sera réalisé dans le respect de la règle des 3 R : remplacer, réduire et raffiner. Les objectifs seront atteints en perfectionnant un dispositif d'investigation physiologique non-invasif (acquisition des données en conservant une qualité de mesure au moins comparable à celle des dispositifs invasifs existants) destiné à remplacer des technologies invasives actuelles et le nombre d'animaux (mesure simultanée des fonctions cardiaque et respiratoire sur les mêmes animaux et de façon répétée dans le temps et sur le même animal) inclus dans les protocoles de recherche préclinique. Enfin ce dispositif permettra le raffinement des procédures expérimentales notamment en permettant de réduire la souffrance animale (absence totale de douleur lors de la mise en place du dispositif et de l'acquisition des données).

Le nombre d'animaux utilisés (30 rats maximum) a été réduit au maximum afin de garantir des résultats interprétables sur le plan statistique en couvrant l'ensemble des objectifs. Les animaux seront hébergés dans des cages avec enrichissement du milieu de vie pendant la période d'acclimatation. A l'issue de la procédure expérimentale, les animaux seront maintenus en vie pour une réutilisation éventuelle.

18933 Dans le cadre des changements globaux attendus, il est urgent d'appréhender le devenir des écosystèmes et de la biodiversité qu'ils hébergent. L'étude des conséquences des fluctuations environnementales sur les traits phénotypiques des organismes, ainsi que celle des stratégies adaptatives et de la dynamique des populations qui en découle, sont fondamentales. Les écosystèmes polaires montrent une vulnérabilité aux changements globaux bien plus intense que les autres écosystèmes. Or l'océan Austral héberge l'un des écosystèmes les plus productifs de notre planète. Avec une production primaire marine qui représente plus de 10% de la production marine mondiale, il héberge les plus importantes communautés d'oiseaux marins. Ces communautés diminuent cependant de manière très inquiétante et ce parallèlement à une diminution de la production marine secondaire dans les eaux antarctiques. Dans ce contexte, et grâce à un suivi de plusieurs espèces et populations des manchots et de pétrels, notre projet d'Observatoires du Vivant des Pôles a pour principal objectif la compréhension des processus écologiques et évolutifs qui façonnent les populations, et notamment les capacités d'adaptation des organismes face aux contraintes de leur environnement. A l'interface entre l'écologie évolutive, la génétique et la dynamique des populations, notre projet favorise le développement de modèles mathématiques globaux. Ces derniers permettront à terme de comprendre les liens existants entre les modifications survenant dans l'environnement et les trajectoires spatio-temporelles de ces populations. Les modèles prédictifs obtenus nous informeront sur l'évolution de la composante biologique de l'océan Austral et nous permettront de mettre en place des stratégies de conservation et de gestion durables de la biodiversité et des ressources naturelles.

Sont principalement étudiées trois espèces de manchots (le manchot royal *Aptenodytes patagonicus*, le manchot Adélie *Pygoscelis adeliae*, et le manchot empereur *Aptenodytes forsteri*) et une espèce de pétrels (l'Océanite de Wilson *Oceanites oceanicus*) figurant parmi les principaux prédateurs supérieurs des écosystèmes marins de l'océan Austral. Par leur distribution géographique, leur mode de reproduction et leur phénologie, elles permettront en effet d'aborder de manière très complémentaire les différentes contraintes par lesquelles la variabilité climatique et son impact sur les ressources marines s'expriment dans l'océan Austral.

Les effectifs prévisionnels d'animaux utilisés dans notre projet d'Observatoires du Vivant des Pôles (différentes espèces et populations/colonies, sur différents sites antarctiques et subantarctiques) sont de 3230 animaux vivants par année (1520 manchots royaux, 600 manchots Adélie, 660 manchots empereurs, 450 océanites de Wilson) pour des opérations de marquage individuel (puces électroniques sans batterie de moins d'un gramme pour les manchots et bagues au niveau du tarse pour les pétrels) complétées par des mesures morphométriques et des prises de sang et de phanères (pour des analyses génomiques, protéomiques ou de génétique des populations dont la construction de pédigrée, le sexage moléculaire, l'identification de polluants, ou bien encore la détermination du régime alimentaire des oiseaux via des analyses isotopiques). De plus, tous les 5 ans, 50 manchots papous *Pygoscelis papua*, 50 gorfous sauteurs *Eudyptes filholi* et 50 gorfous macaronis *Eudyptes chrysolophus* sont également échantillonnés pour le suivi sur le long terme de la diversité, des flux et des potentialités génétiques des populations de manchots. Ainsi, sur les 5 prochaines années, 16300 oiseaux maximum, toutes espèces et tous sites confondus, seront manipulés dans le cadre de ce programme à long terme qui a débuté en 2000 (c'est-à-dire de ces suivis au-delà de plusieurs générations et de l'espérance de vie des espèces, donc bien au-delà de 50 ans).

Comme indiqué précédemment, l'originalité de notre approche est, entre autres, de s'appuyer sur des méthodologies innovantes développées grâce à l'essor de nouvelles technologies afin d'éviter ou de limiter les perturbations, liées à l'homme, des animaux dans leur milieu naturel dans le respect de la règle des 3R. Ces innovations technologiques permettent, par exemple, d'identifier les

manchots marqués électroniquement dans leur milieu naturel sans le biais de l'impact du baguage, en particulier en utilisant des antennes RFID mobiles déployées sur les chemins d'accès aux colonies de reproduction ou bien montées sur des engins radiocommandés (rover), ou encore des systèmes de caméras automatisés qui peuvent être synchronisés aux systèmes de détections automatiques. Ces approches ouvrent, entre autres, de nouvelles perspectives de recherche : celles de l'étude de la structure des colonies d'oiseaux marins en fonction des caractéristiques des individus (i. e. âge, expérience, relations sociales, lieu de naissance, etc.) et en fonction des conditions environnementales à terre et en mer (i. e. en fonction des ressources marines dont nous savons maintenant qu'elles sont très sensibles à une faible variation de température).

REMPACER : il n'est pas possible de remplacer l'utilisation de ces espèces animales protégées, le projet ayant pour objectif d'acquérir des données aidant à leur préservation dans leur milieu naturel. Néanmoins, tout est mis en œuvre pour réduire l'impact des procédures sur le bien-être des animaux et réduire le nombre d'animaux utilisés pour ces espèces d'oiseaux marins.

REDUIRE : une partie des animaux utilisés dans ce projet repose sur l'obtention de données répétées sur les mêmes animaux, ce qui permet de réduire considérablement le nombre d'animaux utilisés tout en augmentant la puissance statistique. De plus, une grande majorité des animaux est utilisée pour répondre à différentes questions qui entrent dans le cadre de collaboration/mutualisation avec d'autres programmes polaires nationaux et internationaux (italiens, allemands, américains, chiliens, brésiliens, norvégiens, anglais, ...).

RAFFINER : tout est mis en œuvre pour réduire l'impact des procédures sur le bien-être des animaux. Tout manipulateur est formé par l'opérateur pour limiter le stress de contention lors des captures. Les procédures réalisées sont peu invasives. Elles se limitent à la capture, mesures biométriques, pesées, prises de sang et de phanères voire d'huile/régurgitas ou de fèces selon les opportunités, pour les manchots l'injection (en sous-cutané) d'une puce électronique de moins d'un gramme entre la patte et la queue et pour les pétrels la pose d'une bague métal au niveau du tarse, et pour une petite fraction de ces animaux la pose de capteurs externes (e. g. températures, positions, acoustiques). Durant les manipulations des oiseaux, leur tête est recouverte d'un tissu sombre afin de limiter leur stress. Le temps de manipulation est réduit au maximum. Ces oiseaux étant des espèces protégées, si une procédure venait à impacter le comportement et le bien-être de l'animal, elle serait immédiatement abandonnée.

18934 La dissection sous muqueuse est une technique développée il y a plus de 10 ans au Japon pour la prise en charge des lésions gastriques superficielles. Elle permet la résection de lésions digestives superficielles de façon monobloc quelque soit la taille de la lésion. Les progrès matériels et techniques ont permis d'étendre ses indications aux lésions œsophagiennes, gastriques et colorectales.

Elle consiste en une résection uniquement de la muqueuse en réalisant une incision dans l'épaisseur de la paroi digestive (sous muqueuse) et préservant la musculature qui correspond à la partie externe de cette paroi.

Cette technique devient une modalité de traitement indispensable dans la prise en charge des lésions pré cancéreuses ou des cancers débutants du tube digestif.

Il s'agit d'une technique difficile d'apprentissage dont le taux de complications est corrélé à l'expérience de l'opérateur. Il est donc indispensable d'avoir une formation adaptée pour débiter cette technique.

Du fait des difficultés de formation, actuellement cette technique est réservée à quelques centres experts en France.

La société européenne d'endoscopie digestive (ESGE) a publié un curriculum sur la formation en dissection sous muqueuse précis en 2019.

Après une formation théorique il est préconisé la réalisation d'au moins 20 cas sur modèle animal. Il faut obtenir 80% de résection complète (R0) sans perforation sur 10 cas consécutifs avant de débiter son expérience chez l'homme sous la supervision d'un expert.

Il est nécessaire de faire au moins 25 cas par an et indispensable d'évaluer ses résultats avec pour objectif au moins 90% de résection monobloc avec moins de 3% de perforation et moins de 1% de chirurgie pour complication chez l'homme.

Il apparaît donc indispensable que les centres experts organisent des formations en accord avec ces recommandations.

Pour augmenter la diffusion de cette technique en France, la société française d'endoscopie digestive (SFED) a la volonté de mettre en place une formation dédiée selon les recommandations du curriculum de l'ESGE. Il est prévu de faire une formation initiale sur modèle animal ex vivo et vivant avant de s'assurer d'un compagnonnage chez l'homme sous la supervision d'un expert français.

Il est prévu de former 16 gastroentérologues par an.

Le modèle ayant l'anatomie la plus proche de l'homme est le porc large white de 25 à 30 kg (2 à 3 mois).

Sur le modèle de porc vivant on peut réaliser 4 résections dans l'estomac et 1 résection dans l'œsophage.

On considère qu'il faut 15 procédures par gastroentérologue pour réaliser ce programme de formation: 5 procédures de formation et 10 procédures d'évaluation (80% de R0 sans perforation). Il faut donc compter au minimum 3 modèles de porc vivant par personne pour l'ensemble de sa formation avant de passer chez l'homme.

Il est donc prévu 144 modèles de porc sur 3 ans (3 modèles par gastroentérologue, 16 gastroentérologues par an).

18935 Les cellules dendritiques (DCs) sont présentes dans tous les tissus. Leur principal rôle est de réguler positivement ou négativement l'activité des lymphocytes T. Cette décision doit être finement contrôlée pour permettre au système immunitaire de combattre efficacement les infections et le cancer par l'action des lymphocytes T, sans provoquer de dégâts dans les organes normaux (auto-immunité). Or, la peau est un organe particulièrement exposé à des infections, aux rayons UV, à des réactions inflammatoires et peut développer des cancers.

La peau comporte des poils ou cheveux qui sont continuellement renouvelés. Nous cherchons à comprendre, en l'étudiant chez la souris, l'influence des cellules associées au poil sur le cycle de vie des cellules de Langerhans (LCs), une population de DCs qui se trouve à proximité immédiate du poil.

Nous avons récemment observé que les LCs se divisent lorsque le poil entre en phase de croissance. Nos expériences préliminaires nous ont permis d'identifier le rôle putatif d'un récepteur de facteur de croissance impliqué dans le renouvellement des LCs, le Colony Stimulating Factor 1 Receptor (CSF-1R). Ses ligands sont le CSF-1 (ou macrophage-colony stimulating factor, M-CSF) et l'Interleukine-34 (IL-34), dont l'expression est augmentée dans les cellules du follicule pileux lorsque celui-ci est en croissance. Nous souhaitons confirmer cette hypothèse en utilisant des souris transgéniques permettant une ablation inductible et spécifique des gènes codant pour l'IL-34 ou le CSF-1 dans les cellules souches du follicule pileux, qui donnent naissance à différentes sous-populations cellulaires le composant. Résoudre cette question est d'autant plus important que le follicule pileux représente une niche privilégiée pour les microorganismes bactériens, qui doivent rester sous la surveillance d'un nombre suffisant de LCs pour prévenir les infections cutanées. Notre stratégie expérimentale respecte les 3 principes de :

REMPLACEMENT : il n'est pas possible de remplacer les animaux car la peau comprend de multiples types de cellules, immunitaires ou autres, dont les fonctions sont régulées par les interactions permanentes qu'elles entretiennent entre elles. Ce système très complexe ne peut pas, à l'heure actuelle, être reproduit de manière fiable par des expériences de culture cellulaire.

REDUCTION : les connaissances rapportées dans la littérature et les tests in vitro montrant l'efficacité du ciblage d'un gène donné nous permettent de n'utiliser que 10 animaux par groupe

expérimental, ce qui est le minimum nécessaire à une étude statistique fiable. Le nombre total de souris est de 134 animaux.

RAFFINEMENT : les expérimentations prévues sont de courte durée, et nous nous efforçons de prévenir toute souffrance éventuelle des animaux. Les injections sous-cutanées seront pratiquées sous anesthésie générale par des personnels compétents. Nous portons une attention particulière aux conditions d'hébergement : les animaux seront hébergés en groupes sociaux dans un environnement enrichi permettant l'expression de leur comportement naturel (tubes en polycarbonate translucide rouge pour se cacher, frisures de carton et tubes de coton pour nidification, barre de bois à ronger). Nous aurons recours à l'anesthésie pour tout geste pouvant entraîner un stress ou une douleur chez l'animal (rasage, épilation, injection sous-cutanée). Les animaux seront observés quotidiennement afin de déceler tout signe de souffrance. Ces signes seront quantifiés en fonction de points limites préalablement définis, et l'atteinte d'un score maximal conduira à l'interruption des procédures.

18936 L'hydradénite suppurative (HS ; maladie de Verneuil, acné inversa), est une pathologie inflammatoire de la peau, initiée au niveau des follicules pileux. De nombreux patients atteints de HS souffrent en outre de symptômes intestinaux inflammatoires, semblables à la maladie de Crohn. L'HS est donc une maladie intéressante pour mieux comprendre les causes communes entre des inflammations cutanées et intestinales fréquemment associées. Aucun modèle *in vivo* de HS n'existe à l'heure actuelle pour évaluer des solutions thérapeutiques éventuelles.

Ce projet propose de générer et d'étudier deux lignées de souris permettant deux délétions génétiques restreintes aux épithéliums. Il en résultera l'inhibition ciblée de deux voies de régulation cellulaire (autophagie et gamma-sécrétase), particulièrement importantes dans la peau et les intestins, ce qui devrait conduire à une inflammation reproduisant les symptômes des patients atteints de la maladie de Crohn et/ou de HS. Ces symptômes, s'ils ne surviennent pas spontanément, seront induits par des traitements provoquant une inflammation épithéliale, normalement limitée, mais probablement amplifiée ici par l'existence des délétions génétiques ciblées. Enfin, nous testerons si l'inflammation observée sur ces modèles *in vivo* peut être contrôlée par une stratégie thérapeutique de modulation de l'autophagie. Ce projet de recherche respectera les 3 principes de :

Remplacement : Il n'est pas possible de remplacer les animaux par des expériences en culture cellulaire car actuellement il n'existe pas de méthodologie permettant de reproduire des tissus aussi complexes que la peau ou l'épithélium intestinal, ou de modéliser leurs interactions potentielles.

Réduction : Le nombre total de souris nécessaire est de 340 animaux. Nous avons utilisé les connaissances rapportées dans la littérature afin de réduire au minimum le nombre de souris nécessaire pour tirer des conclusions significatives de nos expériences.

Raffinement : Nous nous efforcerons de réduire, le cas échéant, toute souffrance éventuelle des animaux. Les traitements potentiellement douloureux seront effectués en anesthésie générale par des personnels compétents et les prélèvements de tissus seront réalisés uniquement après mise à mort. Nous portons une attention particulière au raffinement des conditions d'hébergement : les animaux seront hébergés en groupes sociaux dans un environnement enrichi et observés quotidiennement.

18937 Au sein des myopathies inflammatoires, les myopathies nécrosantes auto-immunes (MNAI) sont définies histologiquement par la présence d'une importante nécrose des fibres musculaires sans infiltrat inflammatoire. La nature auto-immune des myopathies nécrosantes a été suggérée par leur association fréquente à la présence d'autoanticorps (aAc) anti-Signal Recognition Particle (SRP) ou, plus récemment, d'aAc anti-3-hydroxy-3-méthylglutaryl-Coenzyme A réductase (HMGCR) et la corrélation de leur concentration avec l'intensité de la myolyse.

Afin de mieux comprendre les phénomènes immuno-pathologiques de ces maladies nous mettons en place deux modèles murins de myopathie induit par des anticorps. Nous avons immortalisé plusieurs lymphocytes B de souris immunisées par SRP et HMGCR afin d'obtenir des lignées

monoclonales stables sécrétant des anticorps spécifiques de ces deux cibles. L'induction de la maladie nécessite de grandes quantités d'anticorps injectables sans « polluant » tel que le sérum de veau foetal. Pour cette raison nous souhaitons produire ces anticorps par le biais d'ascites induites chez la souris nude qui est dénuée d'anticorps endogènes. De plus une production in-vitro d'anticorps nécessite une étape de purification en milieu acide ou basique qui dans notre cas modifie l'affinité de l'anticorps pour sa cible et donc la pathogénicité. La production d'ascite est aujourd'hui très cadrée et suivra les recommandations de l'INSERM et les Lignes directrices du Conseil Canadien de Protection des Animaux.

Pour chaque protéine nous possédons 5 lignées d'hybridomes sécrétant des anticorps dirigés contre différents épitopes immuno-dominants.

Le volume d'ascite récupéré pour chaque souris est de 5ml avec une concentration en anticorps variant de 10 à 15 mg/ml ce qui permet d'obtenir un minimum de 50 mg par souris. Pour chaque anticorps nous souhaitons obtenir 500mg d'anticorps soit 10 souris par lignée cellulaire pour un total de 100 souris.

L'induction de MNAI à anti-HMGC ou anti-SRP se fera par injections répétées des 5 anticorps respectifs en mélange à raison de 1mg par anticorps par jour. La durée totale de l'expérimentation est de 28 jours. Les animaux sont acclimatés à leur environnement pendant 7 jours et sont injectés à partir du 8ème jour pendant 20 jours. La force musculaire sera évaluée tous les deux jours à l'aide du « nimpeha », une méthode non invasive d'électrostimulation sous anesthésie générale. A l'issue de ces 20 jours les animaux seront mis à mort et les muscles seront prélevés pour une étude histologique. 2 groupes de 10 souris seront nécessaires pour caractériser la pathologie.

Cette première demande permet d'établir deux modèles de MNAI reproductibles et calibrés et utilisera un nombre total de 120 souris

Respect de la règle des 3Rs

Remplacer : La production d'anticorps à partir d'hybridome peut être effectuée en culture cellulaire cependant les protéines contaminantes comme l'albumine bovine nous interdit l'utilisation in vivo des anticorps produits. Le choix de l'ascite présente la meilleure alternative en produisant de fortes concentrations d'anticorps dans un liquide physiologique injectable. La sélection et la dose de chaque groupe d'anticorps fait suite à des études in-vitro montrant la myolyse de fibre musculaires en culture et donc du pouvoir pathogène des anticorps.

Réduire : Le suivi longitudinal de la force musculaire par une méthode non invasive « le nimpeha » permet de réduire considérablement le nombre d'animaux qu'il aurait fallu utiliser avec des techniques de force musculaire in situ. De plus aucun groupe témoin n'est nécessaire puisque chaque animal est son propre témoin.

Raffiner : la production d'ascite sera initiée par de l'adjuvant de freund incomplet. Les hybridomes ont été modifiés par ajout du gène de la luciférase qui permettra de suivre l'évolution de la tumeur par imagerie in vivo en plus de la pesée quotidienne du premier jour au dernier jour et donc la ponction de l'ascite ainsi que la mise à mort précoce des animaux. Pendant toute la procédure de développement de l'ascite, l'analgésie sera maintenue à l'aide de patch de fentanyl diffusant de façon appropriée et continue ce puissant antidouleur. Cette procédure suivra les recommandations de l'INSERM et les Lignes directrices du Conseil Canadien de Protection des Animaux.

L'induction des MNAI sera suivie de façon quotidienne dès le premier jour d'injection des anticorps par une méthode non invasive « le nimpeha ». De plus la souffrance sera évaluée en se basant sur le mouse grimace scale ainsi que sur la motricité de l'animal dans sa cage. Le poids de chaque animal sera contrôlé quotidiennement. L'analgésie sera maintenue durant l'intégralité de la procédure à l'aide de patch de fentanyl diffusant de façon appropriée et continue ce puissant antidouleur.

Pour chacun de ces critères un score clinique sera alloué :

Force musculaire méthode non invasive :

Pas de perte de force : 0

De 10 à 25 % de diminution : 1

De 26 à 50% de diminution : 2

De 51% à 75% de diminution : 3

Au-delà de 76% : 6

Grimace scale :

Pour chacun des points d'observation (œil, oreille, nez et moustache) un score de 0 à 2 sera alloué :

Aucun signe visible : 0

Signes modérés : 1

Signes sévères : 2

Pour la perte de poids sur deux jours consécutif s :

Pas de perte : 0

1 à 5 % : 1

6 à 10% : 2

11 à 15% : 3

Au-delà de 16 % : 6

Le score de 7 correspond au seuil maximum de la perte de poids ou de force musculaire additionné de signes modérés sur le grimace scale. De plus la perte de force musculaire et de poids sont liés et par expérience une perte de poids de 15% est associé avec une perte de force musculaire de minimum 10% et donc un arrêt du protocole. Les animaux présentant un score clinique supérieur à 7 seront mis à mort sans délai et leurs muscles seront prélevés pour analyse histologique. L'hébergement se fera en groupes sociaux de 5 femelles dans un milieu enrichi de nids carton et blocs de cellulose. Les animaux recevront une alimentation sous forme de bouillie afin de pallier aux potentielles atteintes des muscles masticatoires.

18938 La présence de naissances d'automne dans les élevages ovins au Néolithique (-7000 AV JC) peut être la conséquence de deux situations : (1) il existe des ovulations spontanées au printemps et des fécondations ont lieu alors que les béliers sont présents toute l'année dans le troupeau, ou bien (2) l'éleveur sépare les deux sexes puis ré-introduit volontairement les béliers pour une lutte de printemps. La deuxième situation signerait un état assez avancé des connaissances et la mise en œuvre d'innovations associées à l'élevage ovin à cette période par les éleveurs du Néolithique.

Le protocole intitulé "Gestion de l'élevage au néolithique : effet mâle et manipulation de la période de reproduction" et réalisé en 2020 a permis de savoir d'une part qu'environ 40% des brebis Lacaune ovulaient spontanément au printemps en présence permanente de béliers, et d'autre part que l'efficacité d'un effet bélier au printemps, en termes d'ovulations est de 100% (L'effet bélier consiste à déclencher les chaleurs chez les brebis, par contact avec des béliers, sans saillie).

Cependant, il est probable que 40% soit une estimation biaisée à la hausse car nos brebis expérimentales n'étaient pas en lactation au printemps. Sur des lactantes, ce pourcentage est très probablement beaucoup plus faible, sans doute de l'ordre de 10-15% (voir Mauléon et Dauzier 1965). Ce serait justement l'objectif de le mesurer à l'UE INRAE de La Fage au printemps 2021. A cette fin, 100 brebis Lacaune lactantes seront utilisées.

En ce qui concerne les principes de remplacement, réduction et raffinement, les précautions suivantes seront prises :

- remplacement : aucune méthode ne permet à l'heure actuelle d'étudier une situation physiologique intégrée comme le taux de brebis spontanément cyclées au printemps, par des méthodes substitutives in vitro ou de modélisation.

- réduction : le nombre d'animaux a été réduit au maximum compte tenu des techniques utilisées et du résultat attendu.

- raffinement : les animaux seront hébergés dans leur lieu d'élevage en groupes sociaux sur paille et conduits avec l'ensemble du troupeau. Les interventions sont réalisées par des agents habilités,

expérimentés qui manipulent dans le cadre de l'élevage au quotidien les animaux. La préoccupation du bien-être animal par les soigneurs/expérimentateurs est formalisée, des échanges réguliers ont lieu, permettant une remise en question des pratiques et une amélioration continue.

18939 L'objectif de ce projet est de fournir aux acteurs de la recherche préclinique (recherche médicale, mise au point de médicaments, etc...) un dispositif de suivi de la contractilité cardiaque par une méthode totalement non-invasive, utilisable chez le rongeur de laboratoire. Ce dispositif permettra à terme le monitoring cardiaque complet d'un animal vigile, totalement libre de ses mouvements, avec la seule contrainte de la présence d'un vêtement télémétrique, tout en donnant accès à des variables physiologiques de première importance et actuellement accessibles uniquement par des techniques lourdes, comme le cathétérisme intracardiaque.

Cette expérimentation nous permettra d'une part d'apporter la démonstration de faisabilité de l'acquisition de variables caractéristiques de la contractilité cardiaque sur un rat de laboratoire par une technique totalement non invasive, et d'autre part de valider la pertinence scientifique de ces nouvelles variables par leur comparaison avec celles fournies par la technique invasive reconnue actuellement comme « gold standard » (monitoring invasif de la pression intracardiaque) dans le secteur préclinique comme dans celui de la recherche d'amont.

L'ensemble des expérimentations sera réalisé dans le respect de la règle des 3 R : remplacer, réduire et raffiner. Avec comme objectif la mise au point d'un dispositif d'investigation physiologique destiné à remplacer des technologies invasives actuelles et de permettre de réduire la souffrance animale et le nombre d'animaux inclus dans les protocoles de recherche préclinique. Le nombre d'animaux (48 rats Wistar) a été réduit au maximum afin d'obtenir des résultats statistiquement interprétables en couvrant l'ensemble des objectifs. Les animaux inclus dans le protocole seront hébergés dans des cages avec enrichissement du milieu de vie pendant la période d'acclimatation. L'ensemble des procédures mises en œuvre sera réalisé sous anesthésie générale, et se terminera par la mise à mort de l'animal (procédure sans réveil).

18940 Cette étude pilote vise à déterminer le meilleur protocole d'anesthésie qui sera employé dans un projet ultérieur de recherche fondamentale visant à comprendre l'impact du rythme circadien sur le connectome de souris saines ou comportant une lésion cérébrale du thalamus ventromedian. Apporter de nouvelles connaissances sur les réseaux neuronaux permettra à plus long-terme de mieux appréhender les pathologies qui les affectent chez l'Homme, comme la maladie d'Alzheimer ou bien les troubles cognitifs associés au vieillissement. Ce projet nécessitera de réaliser, sous anesthésie générale chez la souris, une lésion du noyau réunien thalamique dont le rôle dans les dynamiques cérébrales globales semble crucial. Ce modèle de lésion du réunien utilise une injection intracérébrale de N-méthyl-D-aspartate (NMDA) au niveau de ce noyau sous anesthésie générale. Cependant, les données de la littérature utilisant ce modèle sont basées sur des protocoles d'anesthésie qui n'ont plus cours désormais. Le choix d'un autre agent anesthésique n'est hélas pas trivial. Pour des anesthésies profondes de courte durée, il est possible d'utiliser une anesthésie à base d'isoflurane ou de kétamine+xylazine. Cependant, les données de la littérature indiquent que ces deux protocoles d'anesthésie semblent impacter l'étendue de la lésion cérébrale, qui doit être strictement contrôlée au volume du noyau réunien. En effet, la kétamine et l'isoflurane agissant sur les mêmes cibles que le NMDA, un effet compétitif pourrait considérablement réduire le volume de la lésion et empêcher de léser complètement le noyau réunien. De plus, l'ensemble des données disponibles proviennent d'expériences réalisées chez des rats, alors que le connectome cérébral, que nous allons étudier dans le projet final, est très bien décrit chez la souris mais pas chez le rat. Par conséquent, il est nécessaire de développer un protocole d'anesthésie adapté à la lésion NMDA du thalamus ventromedian chez la souris. Ce projet pilote permettra donc de raffiner le protocole d'anesthésie que nous utiliserons dans le projet principal final. Nous utilisons des souris C57Bl6 mâles et femelles.

Ce projet est conforme avec les exigences de la règle des 3R.

Remplacement : le caractère méconnu du fonctionnement cérébral implique que ce projet ne peut pas se passer de l'utilisation d'animaux afin d'en déterminer les mécanismes. De nombreuses

études montrent que les dynamiques cérébrales globales sont analogues chez les mammifères, et la souris est un modèle très bien connu pour ces approches. Apporter de nouvelles connaissances sur les réseaux neuronaux permettra à plus long-terme de mieux appréhender les pathologies qui les affectent les fonctions cognitives chez l'Homme.

Réduction : il s'agit d'une étude pilote et il n'y a pas de bases statistiques pour définir le nombre d'animaux. Le nombre d'agents anesthésiques a été réduit aux deux meilleurs candidats (isoflurane ou kétamine/xylazine) et le nombre d'animaux utilisés a aussi été optimisé pour obtenir des résultats exploitables avec un minimum de souris. Dans le respect du principe de réduction, et sur la base de notre expérience dans le développement de nouvelles procédures, nous estimons que 12 animaux représentent un nombre nécessaire et suffisant.

Raffinement ; Le projet prévoit des procédures réalisées sous anesthésie générale conventionnelle avec contrôle de la douleur peropératoire, comprenant une évaluation clinique quotidienne, une analgésie adaptée, un traitement antiinflammatoire et des conditions d'hébergement optimisées (animaux hébergés en groupes sociaux dans de grandes cages, eau et nourriture ad libitum, enrichissement avec nid végétal, tubes en cartons et divers objets). Des points limites adaptés et précoces ont été mis en place pour la procédure. Des critères d'arrêt anticipé de l'expérimentation en cas de survenue d'une complication ont été identifiés. Toutes ces conditions sont conformes à la législation en vigueur et permettent d'être au plus près du comportement naturel de l'espèce animale. A la fin du protocole, les animaux seront euthanasiés (par overdose d'Euthasol 150 mg/kg + analgésie kétamine 100 mg/kg) et le prélèvement du cerveau sera effectué afin d'évaluer le volume et la localisation de la lésion.

18941 L'obésité et ses complications représentent un problème de santé publique croissant dans notre société. Une meilleure compréhension des mécanismes biologiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire, et plus largement du métabolisme énergétique, devrait nous permettre de mieux appréhender cette pathologie. Des études récentes ont montré que la prise d'un repas riche en graisses provoquait l'activation du système immunitaire à l'origine de l'apparition d'une inflammation transitoire dans les intestins mais aussi dans le cerveau que ce soit chez un sujet sain ou chez un sujet obèse. Cette inflammation est transitoire dans les conditions physiologiques et semble avoir des effets bénéfiques sur la régulation de la prise alimentaire. En effet, elle semble exercer un rôle positif sur le contrôle de la glycémie en stimulant la sécrétion d'insuline et l'utilisation du glucose. Cependant, dans un contexte de suralimentation, d'apports trop riches en graisses, cette inflammation devient chronique et n'a plus les effets bénéfiques sur la prise alimentaire.

Ce projet consistera à étudier la réponse inflammatoire, à la caractériser, dans le cerveau après un repas standard ou un repas enrichi en graisses. Nous tenterons de comprendre quelles sont les actions des facteurs inflammatoires sur la prise alimentaire.

Cette étude nécessite l'utilisation de modèles expérimentaux vivants, et respecte le principe des 3Rs appliqué en recherche animale. En effet, il n'existe pas actuellement de méthodes ou de modèles de substitution permettant d'étudier l'équilibre énergétique et le dialogue inter-organes d'un point de vue intégré. De plus, les réponses comportementales autonomes et les sensations de faim et de satiété que nous souhaitons étudier représentent des paramètres complexes qui ne sont pas modélisables in vitro ou in silico. Ainsi ce projet sera réalisé chez la souris, qui constitue un modèle de référence pour les études métaboliques et neurophysiologiques. Cet animal nous permet d'obtenir des analyses fines du comportement alimentaire. Sa taille est compatible pour étudier le fonctionnement cérébral. De plus, la réalisation de différents tests fonctionnels permettant l'analyse des performances métaboliques (test de tolérance au glucose) est aussi possible chez cet animal du fait des nombreuses similarités physiologiques qui existent avec le métabolisme de l'Homme. Ce projet s'inscrit dans les perspectives de 2 précédents projets, les procédures décrites dans ce nouveau projet, ainsi que la stratégie expérimentale ont été optimisées, standardisées et validées précédemment, ce qui évite des études pilotes supplémentaires et réduit les effectifs nécessaires au projet. Un suivi quotidien sera fait pour s'assurer du bien-être des animaux. Les animaux seront élevés dans un environnement enrichi permettant l'expression de comportements innés et favorisant la protection des animaux. Ce raffinement contribue au bien-être animal, ce qui réduit la

variabilité inter-individuelle engendrée par le stress, et par conséquent limite le nombre d'individus nécessaires pour les études statistiques. Nous utiliserons des approches pharmacologiques mais aussi génétiques. 4760 souris seront utilisés sur 5 ans

18942 En France, plus de 60 000 décès par an sont dus à une insuffisance cardiaque (IC). Lorsqu'une personne est atteinte d'IC, on observe une incapacité du cœur à assurer la circulation du sang dans le corps.

Le muscle cardiaque n'est donc plus capable de pomper de façon efficace ou suffisante le sang pour répondre aux besoins énergétiques de l'organisme. Par conséquent, les personnes atteintes d'IC ont très souvent un manque d'énergie chronique, des difficultés respiratoires, notamment sont essouffées et font également de la rétention d'eau.

L'insuffisance cardiaque est généralement caractérisée par ce que l'on appelle une fraction d'éjection du sang réduite (ICFER) c'est-à-dire que le volume d'éjection du sang par le cœur est diminué. Mais il a été observé que l'IC peut aussi se produire avec une fonction contractile du muscle et d'éjection du sang maintenus, ce qui définit ce type d'insuffisance comme une insuffisance cardiaque avec une fraction d'éjection préservée (ICFEP). Ce dernier type d'insuffisance (ICFEP) est plus fréquemment détectée chez la femme, et peut passer inaperçue car plus difficile à diagnostiquer.

Les pathologies cardiaques avec une fraction d'éjection préservée (ICFEP) sont peu étudiées, et le développement de solutions thérapeutiques sont nécessaires pour la prise en charge de la pathologie détectée chez des patients. La forte incidence d'ICFEP chez la femme est actuellement peu comprise et, il s'avère nécessaire pour l'identification précoce (avant l'apparition des symptômes) des femmes à risque d'ICFEP, pour une meilleure prise en charge et une mise en place précoce d'un éventuel traitement.

L'objectif de ce projet est de valider une preuve de concept sur un modèle animal d'ICFEP, afin de mieux comprendre les mécanismes de développement de ce type d'ICFEP chez la femme qui est prédisposée à une période diastolique (période de récupération électrique) plus raccourcie par rapport à l'homme.

Pour cela, on utiliserait un modèle animal porcin d'ICFEP en modulant l'intervalle diastolique grâce à l'utilisation de médicaments spécifiques. On pourra ainsi évaluer et mesurer les paramètres de la fonction cardiaque diastolique afin de détecter les signes de dysfonction diastolique et identifier les régions du cœur présentant des altérations diastoliques globales et régionales.

Simultanément, l'imagerie électrocardiographique (nouvelle technique d'évaluation précise et précoce des altérations électriques) sera utilisée pour imager et évaluer en détail les altérations observées lors d'ICFEP associée à la présence/absence d'une ischémie régionale. Ce type d'imagerie nous permettant d'obtenir la représentation tridimensionnelle de l'activité électrique cardiaque à des nombreux de sites de l'intérieur à l'extérieur des parois cardiaques.

L'espèce porcine, par ses caractéristiques anatomiques et électrophysiologies cardiaques, proche de celles de l'homme, a été identifiée comme le meilleur modèle pour reproduire la pathologie qu'on souhaite étudier. Ce modèle animal permettra ainsi une application à l'homme à court terme des résultats obtenus.

Pour répondre aux questions d'ordre clinique, des modèles animaux de pathologies humaines et des tissus animaux sont nécessaires. Le REMPLACEMENT des animaux n'est actuellement pas possible pour cette étude. En effet, les mécanismes physiologiques sont complexes dans leur globalité et nécessitent d'avoir recours à un modèle animal. S'y ajoute, qu'il n'existe pas à ce jour de modèle de modélisation pour répondre aux objectifs.

Nous avons fixé une limite maximale 26 animaux au total sur 1 an. Il s'agit du nombre minimal d'animaux nécessaire en se basant sur notre expérience antérieure dans l'utilisation d'autres modèles similaires au cours de divers projets menés jusqu'à présent. Une attention sera portée à la REDUCTION du nombre de ces animaux utilisés dans les projets de réaffectation. Dans cet

objectif de réduction, nous ferons également en sorte que chaque animal soit son propre contrôle dès que cela sera possible.

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

- les animaux sont hébergés dans des locaux agréés et bénéficient de soins quotidiens dispensés par du personnel compétent et soucieux du bien-être animal.
- les animaux sont habitués au personnel animalier afin de limiter tout stress.
- les animaux sont hébergés en groupes sociaux ce qui leur permet d'exprimer des comportements naturels et ils disposent d'enrichissements adaptés (i. e. foin, pierre à sel).
- toutes les procédures sont réalisées sous anesthésie générale (mise en œuvre et surveillée par du personnel dédié) et une analgésie adaptée est mise en place en cas de nécessité.
- des critères d'alerte précis et effets adverses seront évalués et surveillés. Dans le cas où l'animal présente un signe d'appel ou atteint un point limite (le point limite ou point d'arrêt anticipé est défini comme le seuil de douleur où de détresse à éviter par exemple en interrompant l'expérimentation, en apportant des soins à l'animal ou bien en pratiquant une euthanasie où mise à mort anticipée). Quand les point limites sont atteint des mesures adaptées seront mises en place dans le plus court délai (i. e. Administration d'une thérapie analgésique où augmentation des doses si déjà en cours).

18943 Le cancer du pancréas est un cancer très meurtrier. Asymptomatique et métastatique, il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement efficace, l'espérance de vie du patient excède rarement 6 mois. Le glioblastome (GBM) est le cancer du cerveau le plus courant et le plus agressif chez les adultes, pour lequel la thérapie actuelle (résection chirurgicale + radiothérapie + chimiothérapie à base de témozolomide) n'est pas efficace et la plupart des tumeurs réapparaissent en quelques mois. L'urgence à laquelle la recherche est confrontée nous a amené à développer de nouveaux agents pour imager, dépister et traiter les cancers du pancréas et du cerveau.

La nanomédecine est une stratégie prometteuse qui peut apporter de nouvelles thérapies pour le traitement du cancer. Une piste particulièrement intéressante réside dans la conception de nanosystèmes permettant d'intégrer des plates-formes thérapeutiques et diagnostiques. Cette approche dite «théranostique» permet le diagnostic, la stratification et le traitement du cancer, ainsi que la surveillance par imagerie de la réponse au traitement pour évaluer l'efficacité thérapeutique de la médecine personnalisée. Dans cette perspective, nous avons développé des agents nanothéranostiques pour la détection et le traitement des cancers du pancréas et de cerveau.

Quatre agents théranostiques basés sur des dendrimères amphiphiles ont été sélectionnés. Les dendrimères sont des molécules synthétiques présentant des ramifications ressemblant à des branches d'arbres d'où leur nom. Les dendrimères amphiphiles ont la capacité de s'assembler et de former des structures sphériques appelées micelles dont la cavité peut servir à véhiculer l'agent thérapeutique. Ces agents théranostiques améliorent la détection des tumeurs par imagerie par résonance magnétique (IRM), une modalité d'imagerie biomédicale non-invasive permettant le suivi longitudinal d'un même sujet, et contiennent soit du paclitaxel soit de la doxorubicine, deux agents anti-cancéreux.

Il est primordial de tester in vivo l'efficacité et la sensibilité de ces agents théranostiques. Nous avons choisi les souris nude xenogreffées avec des tumeurs humaines comme modèle préclinique. Deux modèles de cancer issus d'une lignée cellulaire du pancréas (L-IPC) et d'une lignée cellulaire cérébrale (glioblastome U87) seront induits chez les souris.

Le projet sera conduit dans le respect de la règle des 3R. Nous avons tenté d'utiliser toutes les méthodes substitutives possibles notamment les approches cellulaires, mais nous ne pouvons pas nous passer du recours à l'animal. Nous réduirons le nombre d'animaux grâce à l'utilisation de tests statistiques permettant d'optimiser la taille des effectifs, et nous raffinerons les procédures en diminuant autant que possible le stress et la douleur des animaux. Le nombre total d'animaux pour ce projet est estimé à 280 souris. L'implantation des tumeurs comme la procédure d'imagerie seront réalisées sous anesthésie générale afin de réduire le stress et la douleur des animaux.

Un délai d'acclimatation et une habitude à l'expérimentateur seront assurés. Le raffinement portera également sur les conditions d'hébergement (groupes sociaux, cycle jour/nuit, nourriture et boisson ad libitum) et l'enrichissement environnemental. Les souris seront hébergées dans des cages contenant des rondins de bois à ronger et un refuge afin de diminuer les comportements agressifs et réduire l'ennui, et favoriser l'expression d'un maximum de comportements naturels (interactions sociales, locomotion, élimination, marquage, repos, recherche de cachette...). L'ensemble de ces mesures conduira à favoriser au maximum le bien-être des souris. Les animaux seront surveillés au quotidien pour détecter le moindre signe de souffrance. Des points limites et des grilles de score sont prévus et seront suivis afin de garantir le bien-être animal. Une échelle clinique adaptée au modèle tumoral d'implantation sous-cutanée permettra de suivre chaque animal et de détecter des signes de souffrance. Une analgésie pourra être mise en place selon le score clinique afin de réduire la douleur. Les animaux seraient euthanasiés s'ils atteignaient un score clinique limite.

18944 Le statut énergétique apparaît comme un critère essentiel pour le développement harmonieux, la qualité des produits, la santé et la robustesse des oiseaux depuis leur éclosion jusqu'à l'âge d'abattage. Il existe donc des enjeux forts, de connaissance et d'application pour l'élevage, à comprendre sa mise en place précoce, en interaction avec la génétique et l'alimentation. Des lignées divergentes sur le pH ultime du filet de poulet ont été sélectionnées pour répondre à ces interrogations car ces lignées présentent des statuts énergétiques différents. Ces lignées ont été caractérisées sur plusieurs générations pendant leur croissance et à l'âge d'abattage (6 semaines). L'étude très précoce de ce modèle original de deux lignées de poulets divergentes pour le pH ultime (pHu) de la viande permettra de caractériser les facteurs orientant le métabolisme des animaux in ovo. L'analyse d'une cinétique d'expression au cours de l'embryogenèse et jusqu'à une semaine d'âge permettra en effet d'étudier la régulation des principales voies métaboliques impliquées dans le contrôle des métabolismes protéique et énergétique au niveau de tissus majeurs présentant un intérêt métabolique.

Réduire

Pour ce faire, 2 lots d'œufs de 300 œufs (1 lot pHu+ et 1 lot pHu-) seront collectés et mis en stockage. Le taux de fertilité étant de 80%, cela laisse 240 œufs fertilisés par lignées. Vingt œufs de chaque lignée seront caractérisés à E0 (avant la mise en incubation) pour établir la qualité et composition initiales des œufs des deux lignées avant incubation. A 12, 14 et 18 jours de développement embryonnaire (E12, E14 et E18), trente œufs de chaque lignée seront ouverts de manière à échantillonner d'un côté les différents liquides de l'œuf à ces différents stades et de l'autre côté les embryons pour les caractériser. Du sang ainsi que différents tissus présentant un intérêt métabolique (muscle, foie, tissu adipeux, sac vitellin/tube digestif) seront prélevés pour une caractérisation métabolique. Trente œufs de chaque stade sont prévus pour être sûrs d'avoir au moins 24 œufs avec des embryons vivants. Ces 24 prélèvements seront poolés par 3 pour avoir un minimum de N=8 répliques par lignée avec suffisamment de matériel biologique pour toutes les analyses envisagées. L'expérience du laboratoire fait que dans le cadre des mesures qui seront réalisées et des variations interindividuelles, N=8 est un minimum nécessaire et suffisant pour en tirer des conclusions significatives avec un risque alpha de 5%. Cent trente œufs par lignée seront mis en éclosoir. Le pourcentage d'éclosabilité étant de 60%, cela laisse espérer 78 poussins éclos. Cent cinquante six poussins maximum seront donc utilisés: seize poussins de chaque lignée seront étudiés à J0 (avant toute consommation d'aliment), tandis que les 62 autres animaux seront mis en élevage jusqu'à J8. Pour chaque lignée, 3 lots de douze animaux seront prélevés à J8 à l'état nourri, à l'état à jeun (AJ) ou renourri 1h après avoir été mis à jeun. Les animaux surnuméraires seront remis en élevage. Ces nombres d'animaux sont nécessaires et suffisants pour pouvoir tirer des conclusions significatives en tenant compte de nos expériences précédentes et de la variabilité interindividuelle attendue pour ces analyses.

Remplacer

Ce type d'étude du métabolisme et de ses régulations en fonction d'un génotype ou de la nutrition ne peut se faire que dans une démarche intégrative sur un animal dans son ensemble et exclut la possibilité de réaliser ces expériences sur lignées cellulaires.

Raffiner

Au cours de la période d'élevage, les animaux seront élevés en groupe au sol sur un lit de copeaux avec une alimentation et un abreuvement ad libitum. Au sein du parquet, la densité sera inférieure au maximum autorisé. Les conditions d'élevage (température, ventilation, hygrométrie...) seront adaptées et surveillées quotidiennement. Un enrichissement de type Perch'up leur sera proposé et les animaux auront la possibilité d'explorer leur environnement. Le comportement des animaux sera également suivi quotidiennement afin de détecter tout risque de souffrance ou de mal-être. L'observation de signes cliniques tels que polypnée, prostration, yeux clos, plumage ébouriffé, diarrhée conduira à l'euthanasie de l'animal si les symptômes persistent. polypnée, prostration, yeux clos, plumage ébouriffé, diarrhée conduira à l'euthanasie de l'animal si les symptômes

18945 Le test de transmission social de préférence alimentaire (TSPA) est basé sur un modèle éthologique. Les rongeurs, rats et souris, sont des animaux sociaux vivant en groupes hiérarchisés. Un rongeur dominant ne goûtera une nouvelle nourriture que quand un dominé en aura consommé et qu'il lui aura communiqué l'information par l'intermédiaire de son haleine. La nourriture sera alors considérée comme saine et sans danger. Le test de TSPA qui a été élaboré sur cette base est donc globalement non stressant pour les animaux, et il ne nécessite pas d'apprentissage puisqu'il s'agit d'un comportement inné. Il consiste à nourrir un rongeur démonstrateur (RD) avec de la nourriture neutre ou aromatisée au cumin, et à le mettre ensuite en interaction avec un rongeur observateur (RO) dans sa cage. Lors du test, après un délai variable (typiquement entre 1 et 30 jours), les RO qui ont eu une interaction avec un RD ayant mangé de la nourriture neutre exprimeront une préférence innée pour le thym. Par contre, les RO qui ont eu une interaction avec un RD ayant mangé de la nourriture au cumin, exprimeront le souvenir de cette nourriture familière en inversant leur préférence alimentaire et en la consommant préférentiellement. En plus de sa nature non aversive, ce test présente plusieurs avantages :

- Il nécessite un matériel limité et peut donc être facilement délocalisé dans un autre laboratoire.
- L'encodage de l'information est rapide puisqu'il se fait au cours d'une seule interaction de 30 min.
- On connaît le moment exact de l'encodage, ce qui n'est pas le cas de tests nécessitant un apprentissage sur plusieurs séances.
- La mémoire de cet événement unique est robuste et subsiste plus d'un mois.
- Ce test permet de simuler la mémoire épisodique (rappel d'un souvenir dans un contexte différent de celui de l'encodage), difficile à modéliser chez l'animal.

Si nous utilisons ce test de TSPA chez le rat de façon routinière - nous avons publié un article de référence sur ce sujet dans la revue « Nature Protocols » - nous ne l'avons pas encore validé chez la souris. Le recours à cette espèce s'avère nécessaire en raison des nombreux modèles transgéniques existants et du fait que certains de nos collaborateurs ne travaillent que sur des modèles murins. Cette mise au point du test chez la souris nous permettra de poursuivre nos recherches qui ont montré le rôle crucial de la plasticité vasculaire cérébrale par angiogenèse qui accompagne l'activité neuronale lors de la consolidation des souvenirs. Nous pourrions ainsi poursuivre nos travaux dans cette nouvelle voie qui pourrait permettre de ralentir, voire de réduire les déficits mnésiques observés dans les démences et au cours du vieillissement par la stimulation de l'angiogenèse. La souris présente cependant deux challenges principaux. Elle mange très peu (environ 1 g), et elle tend à répandre beaucoup de nourriture en raison de son hyperactivité. Cela rend la « mesure de la mémorisation » (pourcentage de « cumin » mangé/ quantité totale de nourriture consommée) délicate. De plus, seule la mémoire récente a jusqu'ici été testée chez cette espèce. Des articles ont été publiés par plusieurs équipes utilisant avec succès diverses variantes du test décrit ci-dessus sur la mémoire récente. Nous souhaitons tester plusieurs protocoles pour les adapter à l'étude de la mémoire ancienne et de l'oubli. L'étude nécessitera un total de 360 souris.

Nos études portant sur la mémoire et sur l'activité des réseaux neuronaux et vasculaires au cours des processus mnésiques, les modèles animaux sont incontournables et ne peuvent être remplacés. Nous pourrions cependant RAFFINER nos études comportementales chez les souris en maximisant leur bien-être et en utilisant un test non aversif (l'alternative couramment mise en place est un modèle basé sur l'administration de faibles chocs électriques, appelé « conditionnement de la peur associée au contexte »). Ces essais nous permettront également de déterminer combien d'animaux seront nécessaires pour obtenir des résultats fiables et pour REDUIRE au maximum le nombre de souris dans nos expériences.

18946 Les médicaments, les produits biologiques ainsi que les dispositifs médicaux permettent d'améliorer l'état de santé des patients. Or, par nature, ils sont destinés à être mis en contact avec le corps humain. Ce contact avec l'organisme pouvant être prolongé dans le temps (par exemple, lors de l'implantation d'un dispositif médical), des réactions cliniques indésirables liées à une toxicité systémique ou locale sont susceptibles de se manifester.

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

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

Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. Quelles que soient les études, la douleur est rigoureusement contrôlée et proscrite grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (ex : anesthésie/analgésie). Les rongeurs sont hébergés en groupes sociaux harmonieux sauf lorsque les contraintes de l'étude l'empêchent. Dans tous les cas, pour toutes les espèces sociales, l'hébergement individuel devra être justifié et validé par la structure du bien-être animal. Concernant les lagomorphes, des contacts visuels, olfactifs, auditifs voire tactiles entre congénères sont maintenus grâce à la structure des compartiments. Des enrichissements standards spécifiques à chaque espèce (produits de nidification pour les rongeurs et chainette + bâton à ronger pour les lagomorphes) sont présents dans les hébergements. Enfin, de la musique est diffusée en salle d'hébergement.

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

18947 Les plaquettes sanguines jouent un rôle essentiel pour arrêter les hémorragies. A l'inverse, une activation inappropriée des plaquettes est responsable de maladies cardiovasculaires, en particulier les thromboses artérielles menant à l'infarctus du myocarde et les accidents vasculaires cérébraux, notamment suite au développement de plaques d'athérosclérose. Comprendre quels sont les mécanismes d'activation des plaquettes lors des thromboses est un préalable incontournable pour trouver de nouvelles cibles afin de diminuer le risque thrombotique chez les patients à risque. Ce projet fait appel à l'utilisation de souris transgéniques qui seront étudiées dans des modèles de thromboses bien caractérisés et ayant fait leurs preuves lors de tests de médicaments antithrombotiques. En parallèle, des prélèvements sanguins seront effectués pour réaliser des mesures ex vivo. Ces souris présentent des plaquettes dépourvues de récepteurs mécanosensibles permettant de ressentir la rigidité et les contraintes de cisaillement sanguin. Or la rigidité des vaisseaux et les cisaillements du flux sanguin sont 2 paramètres fortement altérés chez les personnes présentant de l'athérosclérose. Actuellement, on ne connaît pas le rôle de ces récepteurs dans les plaquettes sanguines, bien que ces récepteurs soient suspectés de pouvoir jouer un rôle

dans ces maladies artérielles. Nous disposons de souris génétiquement modifiées pour pouvoir étudier 5 acteurs moléculaires potentiellement impliqués dans la thrombose.

Avantages escomptés: Ce projet permettra de comprendre comment les plaquettes ressentent les forces mécaniques dans la circulation sanguine, et comment ces récepteurs sont impliqués dans la formation des thromboses. L'idée finale est de déterminer si ces récepteurs pourraient être une cible pour empêcher les récurrences de thrombose artérielle chez l'homme, voire pour prévenir une première thrombose lorsque l'athérosclérose est avérée.

Remplacer: Pour cette approche de la question scientifique, certaines expériences utilisant la souris ne peuvent être remplacées par des études in vitro, d'une part car ces essais doivent être menés soit in vivo dans un organisme entier afin d'accéder à la complexité des mécanismes de la thrombose artérielle, soit ex vivo en utilisant des plaquettes isolées à partir du sang total, ces dernières étant dépourvues de noyau, il est impossible de réaliser ces expériences in vitro à partir de culture cellulaire. D'autre part la souris est la seule espèce pour laquelle on dispose de modèles dépourvus des protéines dont on cherche à étudier le rôle. **Dommages prévus pour les animaux:** Nos souris d'intérêt se développent et survivent normalement, et n'ont aucun phénotype dommageable. Les manipulations se font systématiquement sur souris en anesthésie profonde. Une fois les fonctions de ces acteurs moléculaires mises en évidence in vivo dans l'organisme entier, les expériences ultérieures pourront être réalisées in vitro sur sang humain en présence d'agents activateurs ou inhibiteurs.

Réduire: Le nombre d'animaux utilisés pour chaque condition de thrombose in vivo ou in vitro est prévu pour obtenir un résultat statistiquement fiable. Les résultats obtenus de l'analyse statistique permettront de ne pas répéter l'expérimentation, par conséquent réduire le nombre d'animaux utilisés. Pour les prélèvements sanguins, nous avons miniaturisé certains tests afin de pouvoir obtenir une mesure, voire plusieurs selon le test, avec le sang obtenu par prélèvement d'une seule souris. Au total, nous prévoyons un maximum de 2640 souris pour chacun des 3 génotypes comparé à leurs 3 contrôles respectifs.

Raffiner: Le modèle animal est choisi dans le but de reproduire, le plus fidèlement possible, la thrombose artérielle ou disséminée et d'en tirer le maximum d'informations. Toutes les procédures expérimentales se feront sur des souris anesthésiées, en s'assurant que l'anesthésie reste profonde pendant la durée de la procédure. Dans tous les cas, les cages sont enrichies en jouets et coton à déchiqueter pour qu'elles y fassent leur nid, et sont manipulées avec calme et par des manipulateurs avertis pour limiter le stress de contention dans l'intérêt du bien-être animal.

18948 L'obésité est un problème majeur de santé publique à l'échelle mondiale, qui affecte actuellement plus de 300 millions de personnes. À ce jour, nous manquons d'options pharmacologiques qui permettraient une prise en charge efficace de la majorité des patients obèses tout en limitant les contraintes et effets secondaires. Afin d'envisager de nouvelles thérapies, il est nécessaire de mieux connaître les phénomènes biologiques qui régulent la prise alimentaire et le poids corporel.

Dans ce contexte, le cerveau est un organe d'une extrême importance car c'est lui qui détermine ce que l'on nomme la « balance énergétique », à savoir l'équilibre entre le stockage et la dépense de calories et par extension le gain ou la perte de poids. Plus précisément, cette régulation cérébrale s'effectue dans une structure située à la base du cerveau : l'hypothalamus. De nos jours, de plus en plus d'études démontrent que notre comportement alimentaire n'est pas simplement régulé par des signaux purement métaboliques, mais que les régions cérébrales impliquées dans le plaisir et la motivation sont également mises en cause. Ainsi, lorsque nous mangeons, les signaux relatifs à la fois au statut énergétique de notre organisme et l'état émotionnel et motivationnel doivent interagir afin de contrôler la prise alimentaire.

Notre projet vise à étudier les interactions anatomiques et fonctionnelles entre l'hypothalamus et les aires cérébrales du plaisir et de la motivation, et à comprendre comment ces circuits cérébraux sont affectés par un régime riche en calories.

Pour ce faire, nous utiliserons différents modèles de souris génétiquement modifiées nous permettant de manipuler spécifiquement l'activité de populations neuronales restreintes dans ces

différentes régions cérébrales d'intérêt, et nous caractériserons l'activité neuronale de ces différentes populations grâce à des techniques d'enregistrements électrophysiologiques et le comportement alimentaire. Les données seront obtenues chez des souris soumises, ou non, à un régime riche en calories. Les informations apportées par ce projet nous permettront d'accroître nos connaissances sur la régulation de la prise alimentaire par ces différentes aires cérébrales.

Nous prévoyons d'utiliser un maximum de 412 souris mâles adultes, car ce projet sera réalisé pendant 3 ans. Nous avons optimisé les protocoles afin de réduire au maximum le nombre de souris utilisées : des tests de puissance statistique ont été employés pour calculer le plus petit nombre d'animaux par groupe nécessaire à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. En plus, ce chiffre comprend le nombre d'animaux utilisés pour des études préliminaires (pilotes), afin de déterminer les doses optimales des composés qui seront testés dans nos expériences et mettre en place de nouvelles techniques, ce qui permettra de diminuer la quantité d'animaux utilisés à long terme. La souris représente un modèle de choix pour notre projet par la possibilité d'étudier des individus génétiquement modifiés et dont la physiologie générale est suffisamment proche de celle de l'être humain pour que les informations obtenues soient pertinentes sur un plan médical. De plus, les mécanismes biologiques que nous étudions impliquent une communication bidirectionnelle entre le cerveau et le reste de l'organisme, que ce soit pour la régulation de l'appétit, de la glycémie (taux de sucre dans le sang) ou encore le stockage de graisse. Ainsi, il est absolument nécessaire d'étudier un organisme entier et aucune méthode *in vitro* ou *in silico* ne peut le remplacer. Enfin, en vue du raffinement des procédures, un soin particulier est apporté aux questions relatives au bien-être animal. Ainsi, les souris sont hébergées en cages collectives présentant un environnement enrichi, dans une pièce dédiée, avec régulation de la température, de l'humidité et de la luminosité. En outre, les cages, transparentes, sont rapprochées les unes des autres afin que chaque animal puisse avoir un contact visuel avec ses congénères. Avant les expériences, les animaux sont manipulés fréquemment afin de les habituer aux expérimentateurs et réduire ainsi leur stress. Enfin, pour les procédures impliquant une neurochirurgie, un protocole d'anesthésie et d'analgésie péri-opératoire est en place afin de garantir la bonne prise en charge de nos animaux

18949 La finalité de ce projet est d'améliorer le bien-être des poissons marins en conditions d'élevage en mettant à disposition des pisciculteurs des éléments sur les conditions et techniques d'abattage dans le respect du bien-être animal. Pour cela les objectifs poursuivis sont de tester différents procédés d'abattage de pratique courante (mélange glace et eau) et émergente (électricité, mélanges gazeux) afin de mesurer des indicateurs spécifiques en lien avec la protection de l'animal. Afin de déterminer les conditions optimales d'utilisation de deux méthodes d'évaluation de la rapidité de la mise à mort, ce projet comprendra deux phases. La première concernera une expérimentation au laboratoire utilisant 1) la mesure des signaux d'électroencéphalogrammes (EEG) pour déterminer la perte de conscience et 2) la mesure du rythme cardiaque (ECG) signant à la fois la perte de conscience et la mort. Des observations comportementales et des mesures physiologiques du stress seront acquises en simultané. Cette phase 1 sera réalisée avec le bar, *Dicentrarchus labrax*, qui occupe une place prépondérante pour la filière piscicole française et européenne. La seconde phase sera le déploiement de la méthode ECG seule et des mesures comportementales et physiologiques du stress enduré pendant la pêche et la mise à mort dans deux sites de production (un à terre et un en mer) et deux espèces, le bar et la dorade (*Sparus aurata*). La règle des 3R a été prise en compte dans ce projet de la façon suivante : 1) Réduire, en utilisant le minimum de poissons pour répondre à nos objectifs. Ainsi sur la phase 1, 36 poissons seront étudiés (12 par procédé d'abattage). Pour la phase 2, 48 bars et 48 dorades seront utilisés pour établir les niveaux de base des marqueurs sanguins physiologiques et 36 bars et 36 dorades seront équipés pour enregistrer les ECG. Ces effectifs (204 animaux au total) ont été calculés à partir de données d'expérimentations précédentes et de la littérature pour assurer une puissance de détection suffisante des effets escomptés. 2) le raffinement comprendra l'optimisation des conditions d'élevage pour cette espèce et la mise en oeuvre de procédures spécifiques et standardisées (comme l'anesthésie). 3) Le Remplacement n'est pas possible dans le cas présent car nous étudions une espèce dans son milieu d'élevage.

18950 Le canard mulard, destiné à la production de foie gras, est classiquement élevé avec un accès extérieur. Ce mode d'élevage est toutefois fortement remis en question lors des flux migratoires (novembre à mars), en lien avec le risque sanitaire induit par les contacts possibles des canards avec des oiseaux sauvages véhiculant potentiellement des maladies transmissibles entre oiseaux, parmi lesquels le virus de la grippe aviaire qui a fortement touché la filière canard ces 5 dernières années et conduit à des abattages massifs. Pour limiter ce risque, des mesures de confinement des animaux sont prises afin de les protéger. L'élevage de ces canards en bâtiment fermé, pose toutefois un certain nombre de problèmes, parmi lesquels une réactivité émotionnelle accrue. Celle-ci se manifeste en particulier par des animaux réagissant de façon excessive au moindre événement, créant des mouvements de panique et pouvant conduire à des dommages importants (griffures, voir mortalité par étouffement). Le présent projet se propose de tester la combinaison de leviers, dans le cadre d'un dispositif croisé 2x2, qui pourraient contribuer à limiter les effets délétères du confinement sur le comportement des animaux et ainsi à améliorer leur bien-être.

Le premier levier proposé concerne l'éclairage auquel les animaux sont soumis, en particulier la nuit. Si les canards mulards bénéficient le jour d'un éclairage combinant lumière naturelle et artificielle, des veilleuses restent classiquement utilisées la nuit, avec des pratiques assez variables et non normalisées. Celles-ci apparaissent aux yeux d'un certain nombre d'éleveurs comme indispensables en confinement pour limiter d'éventuels mouvements de panique la nuit. Ce choix semble toutefois contre-intuitif dans la mesure où au contraire une exposition continue à la lumière est connue pour favoriser l'apparition de comportements aberrants. Nous comparerons ainsi dans notre dispositif les effets d'un éclairage abaissé vs. l'absence d'éclairage la nuit sur l'activité des animaux et leur susceptibilité à réagir à un stress.

Le second levier proposé concerne les modalités d'hébergement des animaux en confinement et en particulier la plus-value potentielle pour les animaux de pouvoir accéder à un espace extérieur protégé. Nous comparerons ainsi deux types de systèmes d'élevage : un système confiné et un système permettant aux animaux d'accéder à un espace ouvert vers l'extérieur (cet espace est délimité au sol et couvert d'un toit). De tels systèmes pourraient en effet constituer une bonne alternative aux parcours lors de ces périodes de confinement.

Ce projet est en adéquation avec les exigences de :

Remplacement : Ce projet ne peut s'entreprendre que chez l'animal vivant et ne peut en aucun cas être remplacé par un modèle cellulaire ou de simulation informatique.

Réduction : 960 canards mulards mâles seront requis ce qui constitue un nombre minimal compte tenu des aléas expérimentaux pour tester statistiquement l'hypothèse.

Raffinement : Les animaux seront hébergés dans des conditions optimales d'alimentation et de soins durant 2 phases successives : une Phase 1 (1 à 83j d'âge) d'élevage des canards selon différentes modalités puis une Phase 2 (84 à 95j d'âge) d'engraissement afin de mesurer les effets potentiels des leviers testés sur le comportement des animaux jusqu'à la fin du cycle de production. En Phase 1, les animaux seront élevés au sol en loges collectives de 30 animaux. En Phase 2, ils seront engraisés par gavage en parcs collectifs de 4 animaux. Seront suivis à 5 âges clés un ensemble de paramètres liés et leur comportement, leur état corporel et paramètres de croissance.

18951 Le syndrome de l'X fragile (FXS) est la forme héréditaire la plus commune de retard mental (RM) et la première cause de troubles du spectre de l'autisme (TSA). Il est causé par la perte d'expression du gène FMR1 qui code la protéine Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP). FMRP est une protéine capable de se lier aux molécules qui transportent l'information contenue dans le patrimoine génétique, et elle est impliquée dans différentes étapes de leur métabolisme. La protéine FMRP est présente dans les synapses, zone de communication entre les neurones dans le cerveau. Notre projet scientifique vise à explorer de nouveaux aspects de la physiopathologie du FXS en se concentrant sur deux cibles de FMRP, qui modulent deux voies critiques pour FXS.

Le présent projet se base sur des données moléculaires qui montrent que la protéine FMRP est présente du côté présynaptique (côté émetteur du neurotransmetteur) de la synapse. Nous postulons qu'en contrôlant le niveau des 2 cibles de FMRP, celle-ci régule la transmission

synaptique en agissant sur les mécanismes de libération des neurotransmetteurs, et sur la morphologie des synapses.

Nous chercherons quel rôle peut jouer FMRP dans la neurotransmission en agissant à un niveau présynaptique. Nous postulons que le dérèglement des fonctions de FMRP dans la neurotransmission peut aussi participer à la pathologie de la FXS. La réalisation du projet est basée sur la modification génétique des neurones étudiés dans leur tissu natif (tranches de cerveau de souris), c'est-à-dire dans un contexte physiologique. Nous supprimerons le gène encodant la protéine FMRP dans les neurones étudiés avant d'analyser si la communication entre les neurones est perturbée par l'absence de cette protéine. Ces modifications génétiques seront réalisées grâce à l'utilisation de ciseaux moléculaires injectés dans les neurones du cerveau afin d'enlever ou de remplacer le gène encodant pour FMRP. Ces injections cérébrales auront lieu sur des souris anesthésiées par une procédure appelée « chirurgie stéréotaxique ». Nous utiliserons la lignée de souris *Fmr1cko* qui n'a pas de phénotype dommageable. Chaque semaine, une session de chirurgie stéréotaxique permettra d'injecter des souris qui seront par la suite utilisées au cours d'expériences d'enregistrement de l'activité des neurones (électrophysiologie en tranche) ou d'expériences d'imagerie cellulaire et moléculaire. Leur mémoire sera également évaluée à l'aide de tests comportementaux. Nous serons d'autre part amenés à utiliser des souris mutées pour un gène qui code pour une protéine régulée par FMRP, pour des expériences d'électrophysiologie en tranche.

Tout au long du projet, nous appliquerons la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement). (1) Les modèles de remplacement *in vitro* actuellement disponibles ne récapitulent pas l'architecture du cerveau et ne permettent pas d'étudier les mécanismes de communication au sein du réseau de neurones. D'autre part, la souris est à ce jour le seul modèle mammifère dont le génome est facilement modifiable. (2) Le même animal sera utilisé pour différents protocoles d'électrophysiologie ou d'imagerie afin de récolter un maximum de données scientifiques pour chaque souris (réduction). (3) Des protocoles expérimentaux simples avec un nombre limité de conditions seront employés. Toutes les procédures seront réalisées par des personnes formées et ont été optimisées pour soulager le stress et la douleur des animaux tout au long de cette étude. De plus, un enrichissement des cages constitué de tunnels ou de maisons en papier mâché seront utilisés pour permettre aux animaux de se cacher et établir des liens sociaux entre eux. (raffinement).

664 souris seront nécessaires à la réalisation de ce projet essentiel à une meilleure compréhension du syndrome de l'X fragile, et éventuellement sur la définition de nouvelles cibles thérapeutiques pour cette maladie du neurodéveloppement.

18952 L'insuffisance cardiaque (IC) frappe chaque année une à cinq personnes pour mille dans les pays industrialisés, tous âges confondus, avec une prévalence de trois à vingt pour mille. La survie à un an, tous stades confondus, est de l'ordre de 65 %. L'IC traduit un état pathologique progressif dans lequel la pompe cardiaque n'est plus capable d'assurer un débit sanguin suffisant pour satisfaire les besoins de l'organisme. Cette pathologie peut faire suite à une lésion du muscle cardiaque lors d'une souffrance provoquée par un infarctus du myocarde. Dans la semaine qui suit l'obstruction d'une artère coronaire qui irrigue le cœur, le tissu cardiaque n'est plus alimenté en sang ni en oxygène. Asphyxié et lésé, le tissu cardiaque se nécrose et une cicatrice se forme. Plus la cicatrice est importante plus les conséquences seront dramatiques. La réparation des cœurs endommagés suite à un infarctus du myocarde reste un défi majeur en médecine régénérative. À cet égard, l'utilisation de cellules souches mésenchymateuses (MSC) représente une approche prometteuse pour réparer les cœurs endommagés car elle s'est avérée sûre et faisable. L'efficacité des thérapies actuelles à base de ces cellules qui peuvent régénérer le tissu cardiaque lésé reste atténuée principalement en raison de leur survie limitée une fois dans le muscle cardiaque. Les stratégies classiques développées jusqu'à présent pour améliorer l'efficacité thérapeutique des MSC, basées sur la modification génétique ou le traitement pharmacologique, se sont avérées insuffisantes pour les applications humaines. Il a été démontré que le sort des MSC greffés était fortement régi par le microenvironnement environnant. Cela a été observé dans les tissus lésés, où les signaux de stress libérés par les cellules endommagées stimulent les propriétés régénératrices des MSC. Dans ce

contexte, nous avons récemment démontré que les mitochondries transférées des cellules endommagées aux MSC suite à une insulte ischémique, est un signal micro-environnemental critique qui stimule les capacités de cicatrisation des MSC. Notre projet actuel vise à développer un protocole pour la thérapie de l'infarctus à base de MSC qui sera efficace et traduisible en clinique.

Nous utilisons un modèle de souris d'IC chronique développée à la suite d'un infarctus permanent chez des souris (swiss) et des rats (wistar). Malgré son caractère délétère, cette intervention est nécessaire pour reproduire dans un système intégré les différentes composantes de la pathologie humaine, gage d'une meilleure transposition vers la clinique dont le besoin de nouveaux traitements est urgent. Ces animaux seront traités avec des MSC, et les données biologiques issues de cette étude permettront d'optimiser la thérapie cellulaire dans l'IC. Une analyse raisonnée du nombre d'animaux utilisées a conduit à prévoir un nombre maximal de 660 animaux (570 souris, 90 rats) dans le respect du principe de la règle des 3 R. La physiologie cardiovasculaire des rongeurs présente de grandes similitudes avec celle de l'homme en terme de régulation et de structure morpho-fonctionnelle. Cependant, si le modèle animal demeure à ce jour inévitable pour étudier l'efficacité de la thérapie cellulaire, nous veillerons toutefois à Remplacer notre stratégie dès lors qu'une alternative serait identifiée pendant la réalisation de nos travaux.

Nous avons organisé nos expériences pour Réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaires à l'acquisition des données (calcul statistique de l'effectif minimal, utilisation des mêmes animaux pour plusieurs expériences, choix de l'échocardiographie pour le suivi de la fonction cardiaque). Enfin, nous avons Raffiné nos approches pour réduire au strict minimum la détresse imposée à ces animaux, et pour apprécier au mieux les points limites (mise en place d'une grille d'évaluation des signes de douleurs; visites quotidiennes et soins par du personnel qualifié), en utilisant une anesthésie et analgésie pré- per- et post-opératoire afin d'éviter la génération de douleur et d'angoisse. Les animaux sont stabulés par cage de 4 sur des portoirs ventilés dans une pièce de l'animalerie agréée A1, sous contrôle permanent des températures, hygrométrie et sous un cycle de lumière (12/12h). En terme d'enrichissement, des plaques de cotons de cellulose (safe square) leur permettant de faire des nids sont ajoutés et les animaux ont des cabanes en plexiglass teinté. Les animaux ont accès à la nourriture et l'eau ad libitum. Ils font l'objet, au sein de notre animalerie, d'une surveillance quotidienne, jours de semaine et week-ends par du personnel qualifié.

18953 Les protéines sont des molécules biologiques présentes dans toutes les cellules vivantes. Lors de leur synthèse, elles peuvent nécessiter des modifications pour devenir actives biologiquement. Ces modifications peuvent être mise en œuvre par des protéines appelées protéines convertases (PCs). Des résultats, antérieurs et récents, ont permis de définir une nouvelle stratégie thérapeutique basée sur l'inhibition de l'activation de protéines impliquées dans le développement du cancer et des métastases. Ces travaux ont mis en évidence le rôle important des modifications par les PCs dans l'acquisition des caractéristiques cancéreuses des cellules. La conception ou l'identification d'inhibiteurs chimiques des convertases puissants et spécifiques en tant que molécule respectivement anti-angiogéniques (empêchant le recrutement des vaisseaux sanguins nécessaires à la tumeur) et/ou anti-tumorigéniques (empêchant la croissance tumorale) pourraient permettre de développer de nouvelles thérapies ciblées seules ou en combinaison avec des agents déjà existants et/ou la radiothérapie pour le traitement de certains cancers.

Nous avons récemment identifié des petites molécules inhibitrices des PCs. Dans ce projet de recherche nous évaluerons leur efficacité sur la progression tumorale, l'apparition de métastases et l'angiogenèse (recrutement de nouveaux vaisseaux sanguins) à l'intérieur des tumeurs. Cette étude a pour but d'évaluer in vivo les effets anti-tumoraux et anti-métastatiques de deux inhibiteurs synthétiques identifiés par notre groupe. Le modèle de la souris est le plus adapté à notre projet de recherche car nous avons différents modèles de tumeurs à greffer chez la souris qui se comportent comme des tumeurs humaines. De plus les PCs sont très homologues chez la souris et chez l'homme. Et enfin, nous avons un modèle de souris pouvant développer des tumeurs colorectales spontanées après l'injection d'un produit chimique. Tout en veillant à limiter le nombre d'animaux impliqués dans ce projet de recherche, ces modèles nous permettront de confirmer et d'évaluer les

effets réels des PCs et de nos molécules inhibitrices sur la croissance tumorale, la formation de métastases et l'angiogénèse.

Ce projet de développement d'inhibiteur des PCs en tant que nouvelle stratégie dans le traitement du cancer nécessite 5220 animaux.

Dans ce contexte, nous veillerons à respecter la règle des 3R:

-Remplacer: des tests sur des cellules tumorales et des cellules normales en culture in vitro nous ont déjà permis de déterminer certains effets de nos molécules. Cependant, l'utilisation de modèles in vivo comme la souris est indispensable à la compréhension des mécanismes d'action de ces molécules dans un organisme entier proche de l'homme, incluant des paramètres comme le développement tumoral, le microenvironnement, les contraintes physiques etc. qui ne sont pas retrouvés in vitro. Cette étape est également nécessaire puisque nous envisageons une potentielle et future utilisation chez l'homme comme thérapie.

-Réduire: afin de limiter au maximum le nombre d'animaux, nous utiliserons les mêmes souris pour nos contrôles positifs et négatifs dès que ce sera possible. Cette association nous permet de réduire le nombre de souris contrôles utilisées. Le nombre d'animaux par lot sera également réduit au maximum afin d'avoir des résultats statistiquement significatifs (lots de 6 animaux par condition).

-Raffiner: le bien-être de l'animal au quotidien est nécessaire au bon déroulement de nos expériences, mais également à la reproductibilité de nos résultats. Des enrichissements (maisons rouges) sont présents dans les cages. Au cours de nos expériences, de la nourriture humidifiée sera accessible directement dans la cage pour éviter la déshydratation des souris après la chirurgie. Des tapis chauffants seront également utilisés dès l'anesthésie des souris, pendant l'opération, et lors de la phase de réveil. Des injections d'analgésique pré et postopératoire pourront être réalisées en fonction de l'expérience et de la souffrance de l'animal. Un suivi attentif quotidien par du personnel compétent et formé, weekend compris, sera également mis en place. Au moindre doute, nous ferons appel aux conseils de notre vétérinaire ou de la structure du Bien-Etre Animal (SBEA).

18954 Notre projet s'inscrit dans un contexte actuel de développement de thérapies ciblées contre les cancers du sang. Nous tentons de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires qui régulent le développement normal et pathologique de plusieurs populations cellulaires du sang (dont les cellules souches du sang et les leucémies humaines et en particulier les leucémies d'enfants en rechute) avec le but à long terme d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Nous voulons savoir si des perturbations, comme des stress oxydants (par exemple: modification de la concentration en oxygène, irradiations ou présence d'antioxydants), modifient les propriétés des cellules souches du sang. Nous espérons que la présence d'anti-oxydants dans des milieux de culture permettra d'améliorer les propriétés des cellules souches du sang avec une visée d'application aux protocoles de transplantation de cellules de moelle osseuse chez l'homme. D'un autre côté nous voulons comprendre comment les leucémies interagissent avec la moelle osseuse au cours de leur développement. Ce projet s'inscrit dans un cadre large d'apporter de nouvelles connaissances dans le domaine de la génération des cellules du sang. Il participe aussi à un réseau national, appelé MAPPY-ACT, et à un groupement de laboratoires dans un projet commun du PAIR-Pédiatrie 2017. Les objectifs de la participation du laboratoire à ces réseaux sont de proposer de nouveaux modèles expérimentaux de leucémies de l'enfant et de fournir des moyens à la communauté scientifique et médicale d'explorer de nouveaux médicaments.

Des systèmes de culture sont disponibles pour atteindre certains de ces objectifs et nous les utilisons le plus souvent possible. Mais ils ne reproduisent pas toutes les étapes du développement normal et pathologique des cellules humaines qui se déroulent dans la moelle osseuse ou dans d'autres organes du corps.

Le projet proposé est la prolongation de plusieurs études scientifiques qui ont déjà permis d'acquérir des connaissances et d'élaborer des modèles animaux de cancers humains aujourd'hui utilisés par le monde scientifique. Afin de mieux comprendre les interactions entre les cellules leucémiques et leur environnement, nous proposons aussi le développement de nouveaux modèles permettant la

propagation de prélèvements leucémiques humains récalcitrants aux signaux émis par l'environnement de la moelle osseuse de la souris.

Notre étude nécessite des transplantations de cellules souches sanguines qui miment celles qui sont utilisées en traitement de personnes atteintes de maladies du sang dans un modèle de rongeurs génétiquement modifiés. Le but est de comprendre le mécanisme conduisant une cellule normale à devenir leucémique/anormale, de mettre en évidence des sous-populations de cellules leucémiques responsables des rechutes, de tester les effets d'irradiation à des débits de dose variables, notamment proches de ceux qui sont utilisés en radiothérapie, sur le développement leucémique et normal, d'améliorer la conservation des propriétés des cellules souches du sang lors de leur manipulation ex-vivo avant la transplantation.

Le nombre d'animaux a été calculé en tenant compte des mises au point et des résultats des études précédentes. Il est d'un minimum nécessaire de 2535 rongeurs, nés dans des élevages agréés à des fins scientifiques. Les méthodes expérimentales effectuées sous anesthésie, consistent en des injections, des prélèvements (prises de sang et biopsies de moelle osseuse), des irradiations et des tests de molécules thérapeutiques. Une observation quotidienne des animaux est réalisée pendant plusieurs mois. A la moindre manifestation de douleur ou de signes cliniques, l'équipe d'expérimentateurs interviendra rapidement pour éviter toute souffrance par la mise en place de traitement analgésique.

Les animaux sont hébergés en groupe sociaux pour reproduire leur mode de vie. Un enrichissement en modules divers sera distribué dans leurs cages afin d'élargir leurs activités quotidiennes.

18955 L'adréno-leucodystrophie liée à l'X (X-ALD) est une maladie génétique grave liée au chromosome X et qui peut débuter dans l'enfance, l'adolescence ou l'âge adulte. Elle affecte de manière progressive le cerveau et la moelle épinière. Sa fréquence est de 1 pour 17 000 naissances et est causée par une mutation du gène ABCD1 codant pour la protéine ALDP.

Il existe deux formes majeures de cette maladie :

- La forme cérébrale infantile (ALD-cérébrale), qui se manifeste chez les garçons entre 3 et 12 ans et 35% des hommes adultes, et dont l'évolution spontanée est souvent létale ;
- L'adrénomyélongueuropathie (AMN), forme beaucoup plus fréquente, entraînant une paralysie progressive des membres inférieurs et des troubles sphinctériens, se manifestant chez les hommes adultes, entre 20 et 50 ans, et chez 50% des femmes porteuses de la mutation génétique après l'âge de 40 ans.

Concernant les prises en charge thérapeutiques connues à ce jour, pour la forme cérébrale d'ALD, la transplantation de cellules souches hématopoïétiques est le seul traitement qui permet, lorsqu'il est effectué au tout début de la maladie, dans une fenêtre thérapeutique relativement étroite, de stabiliser ou de faire régresser les lésions cérébrales. Pour l'AMN il n'existe actuellement aucun traitement curatif, seule une prise en charge symptomatique est réalisée.

Notre projet porte sur le développement d'une nouvelle approche de thérapie génique pour traiter l'AMN. Cette approche consistera à rétablir la synthèse d'une protéine ALDP fonctionnelle par administration d'une copie du gène ABCD1 normal dans les cellules du cerveau et de la moelle épinière à un stade précoce. Pour évaluer les différentes constructions génétiques développées et sélectionner les plus efficaces, nous utiliserons un modèle de souris de la pathologie, ce modèle ayant une délétion du gène ABCD1 et présentant par conséquent un déficit en protéine ALDP. Ce modèle récapitule nombreuses caractéristiques de la maladie observée chez l'être humain comme la paralysie des membres inférieurs, la présence de certains marqueurs biochimiques ou encore l'évolution progressive.

La première partie du projet permettra d'évaluer 3 différentes constructions génétiques pour rétablir la synthèse d'une protéine ALDP fonctionnelle dans les cellules du cerveau et de la moelle épinière. Cette étude « pilote » aidera à caractériser le bon promoteur, élément clé permettant la production de la protéine fonctionnelle. La seconde partie du projet portera sur l'expression du gène thérapeutique sélectionné chez les souris déficientes pour le gène ABCD1 et d'évaluer son effet (en

analysant, entre autres, les marqueurs moléculaires et biochimiques spécifiques de la pathologie, et l'évolution des déficits locomoteurs).

Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet sont 349 souris :

Groupes expérimentaux :

- 1) Reproduction afin d'obtenir les animaux malades : n=45 (n=30 femelles + n=15 mâles déficientes en ABCD1)
- 2) Etude « pilote » caractérisation des promoteurs : n=56 Wt (durée de l'étude 12 mois)
- 3) Evaluation du gène thérapeutique : n=248 (durée de l'étude 48 mois)

Les animaux sont nés et élevés en captivité dans des élevages reconnus. Leur nombre a été réduit au minimum nécessaire pour obtenir des données suffisantes tout en s'assurant d'une interprétation statistique fiable des résultats pour évaluer l'effet thérapeutique du traitement chez la souris.

L'évaluation fonctionnelle du traitement sera analysée par des techniques indolores et non-invasives comme pesées, études comportementales et d'imagerie in vivo.

128 animaux du groupe expérimental 3 seront examinés par imagerie in-vivo

- Les séquences IRM 11. 7T quantifieront les lésions de la substance blanche (MW) et la remyélinisation du système nerveux
- L'imagerie de diffusion Kurtosis détectera les changements microstructuraux de la matière blanche du système nerveux
- Le transfert de saturation par échange chimique (CEST) et le transfert de magnétisation permettront de cartographier et de quantifier la myéline du système nerveux

à l'âge de 12-15-18 et 22 mois et euthanasiés à la fin de l'étude pour l'analyse moléculaire et histologique.

Les souris déficientes en ABCD1 ne présentent pas de phénotype grave. L'euthanasie pourrait être envisagée dans le cas où les animaux attendraient un de ces points limites fixés

Les organes périphériques et le système nerveux seront analysés post-mortem.

Remplacement :

Toutes les constructions génétiques utilisées seront caractérisées in vitro avant leur utilisation chez l'animal. Des études in vitro sur des cellules neurales déficientes en ABCD1 ont déjà été menées. Cependant, elles ne nous permettent pas d'évaluer l'efficacité des constructions génétiques pour corriger les manifestations cliniques de la maladie à l'échelle de l'organisme entier.

Réduction :

Tous les vecteurs et les préparations utilisées seront caractérisés in vitro avant leur utilisation chez l'animal.

Les effectifs des groupes pour tester les traitements de thérapie génique seront réduits au minimum. Notre expérience nous permet d'évaluer l'efficacité des différentes constructions génétiques développées sur 8 animaux par groupe au maximum. La constitution des groupes est basée sur notre expérience et le type d'analyses réalisées. Cette constitution nous permettra d'obtenir des données statistiquement significatives permettant d'évaluer l'effet thérapeutique du traitement.

Raffinement :

Une observation quotidienne des animaux, des pesées hebdomadaires et l'application de critères d'arrêts permettent de veiller au bien-être des animaux. Pour l'administration du gène thérapeutique, des protocoles anesthésiques et d'analgésie adaptés seront mis en place selon la procédure et validés par le vétérinaire.

18956 Les probiotiques sont définis comme des microorganismes vivants qui confèrent un bénéfice pour la santé de l'hôte. Les effets bénéfiques sont spécifiques à chaque microorganisme et une sélection rigoureuse est requise avant toute utilisation chez l'homme. Le bien-être intestinal et la promotion des défenses immunitaires de l'hôte sont les propriétés bénéfiques les plus couramment recherchées. La rhinite allergique (RA) est une maladie inflammatoire chronique nasale induite par

une réponse allergique. Elle peut être provoquée de façon périodique par des molécules extérieures (pollens d'arbres ou de plantes herbacées), ou bien de façon continue par la présence d'allergènes intérieurs (acariens). La RA touche jusqu'à 40 % de la population mondiale, avec une prévalence croissante ces 20 dernières années. Elle se manifeste par des écoulements nasaux (rhinorrhées), éternuements et congestion du nez, et est associée à une qualité de vie nettement altérée. La RA est traitée par l'éviction des allergènes, la désensibilisation, ou par des antihistaminiques. Plusieurs études font état de l'effet bénéfique des probiotiques dans des modèles animaux comme chez l'humain, notamment en améliorant la qualité de vie des patients et en diminuant certains symptômes nasaux. Cependant, les mécanismes d'actions sur la réponse immunitaire ne sont pas suffisamment connus ni décrits.

L'espèce choisie pour ce projet est la souris, plusieurs équipes de recherche ayant validé qu'il est possible d'induire une RA chez la souris, avec des réponses immunitaires comparables à celles observées chez l'humain. Le projet est décliné en 3 étapes.

ÉTAPE 1 : Trente bactéries seront évaluées grâce à une série de tests in vitro/ex vivo permettant de sélectionner les meilleurs candidats pour leur évaluation dans un modèle animal. Elles seront évaluées d'abord sur des cellules sanguines humaines, puis sur des cellules isolées de rate de souris (procédure 1 – 20 animaux). Ces essais conduiront à la présélection de 6 bactéries qui présentent des effets anti-inflammatoires.

ÉTAPE 2 : Ces 6 bactéries feront l'objet d'une caractérisation afin de déterminer partiellement leur mécanisme d'action, via des tests in vitro (lignée cellulaire) et ex vivo : explants de poumons (procédure 2 – 25 animaux). Cette procédure consiste en la préparation d'explants (tranches) de poumons de souris, en leur culture, puis en l'analyse de la libération de molécules importantes dans les allergies en présence des bactéries sélectionnées.

ÉTAPE 3 : À l'issue de ces tests, 2 bactéries seront sélectionnées et testées dans un modèle in vivo de RA induite par un allergène, l'ovalbumine - (OVA). La première étape consistera en la validation de notre modèle d'induction de la RA (procédure 3 – 24 animaux). Les souris seront rendues allergiques par 3 injections intrapéritonéales d'OVA. Puis le développement de la RA sera induit par une administration quotidienne d'OVA par voie intranasale via la respiration naturelle de l'animal. Ensuite, les effets des bactéries probiotiques (avec ou sans antihistaminique) contre la RA seront étudiés (Procédure 4 - 126 animaux). Les souris recevront les bactéries par voie orale (gavage). Les manifestations attendues chez les souris sont des éternuements et grattements du museau au moment des administrations intranasales d'allergène.

Les bénéfices attendus du projet sont la validation d'une série de procédures in vitro, ex vivo et in vivo permettant d'évaluer un grand nombre de bactéries (30) jusqu'à sélectionner progressivement 1 à 2 candidates efficaces contre la RA. Ces procédures permettront de mieux comprendre les effets des bactéries sur les défenses immunitaires et d'envisager des essais cliniques chez l'humain.

L'élaboration de ce projet a été faite dans le respect des 3Rs.

Remplacer : L'utilisation d'un modèle in vivo de RA chez la souris est indispensable. Il n'existe pas encore de modèle in vitro (ou ex vivo) reproduisant la complexité du système immunitaire. L'apport de cellules par le sang lors de l'inflammation, la migration des cellules aux ganglions pour activer des réponses adaptatives, sont autant de facteurs impossibles à reproduire in vitro. De plus, la stratégie thérapeutique est d'administrer le probiotique par voie orale (qui atteindra donc l'intestin) afin de traiter une pathologie des voies respiratoires supérieures. Ainsi, étudier l'impact du produit sur la rhinite allergique RA nécessite l'utilisation de modèles animaux. Néanmoins, l'utilisation de tests in vitro sur lignées cellulaires et cellules mononuclées issues du sang périphérique humain va permettre de remplacer les tests sur modèle animal dans les premières étapes du projet de sélection des bactéries d'intérêt.

Réduire : Le projet prévoit le recours à 195 souris adultes (20 + 25 + 24 + 126). Afin de réduire le plus possible le nombre d'animaux, nous avons utilisé une technique de prédiction du nombre d'animaux nécessaires, calculé à partir de la répartition des résultats observés dans un modèle similaire et de l'estimation de l'effet escompté. Nous prévoyons également d'utiliser des tests ex

vivo (Procédures 1 et 2 sur cellules de rate et explants de poumons de souris), pour lesquels, avec un seul animal, il est possible d'investiguer de nombreuses conditions. Ils nous permettront d'étudier les 30 souches afin de sélectionner 2 candidates pour les tests in vivo.

Raffiner : A la fin de chaque procédure et afin de réaliser les différentes analyses, les animaux seront euthanasiés selon les recommandations éthiques européennes. Au cours des procédures, aucune souffrance animale n'est attendue. Mais pour limiter au maximum le risque de stress ou douleur, des points limites sont clairement définis à l'avance. L'état de santé des animaux sera surveillé quotidiennement tout au long de l'expérience. Cela nous permettra d'intervenir rapidement et de façon appropriée si un problème survient. Pour favoriser le bien-être des animaux, un enrichissement du milieu est aussi prévu par l'ajout de mouchoirs en papier pour la nidification et de boîtes en carton où les souris peuvent se cacher.

18957 La thérapie génique consiste à introduire du matériel génétique dans des cellules pour soigner une maladie liée à la dysfonction d'un gène ou le traitement de cancers par exemple.

Le projet de thérapie génique, réalisé dans un cadre réglementaire, a comme objectif de permettre l'évaluation du potentiel toxique de produits de thérapie génique, ainsi que la bio-distribution de ce produit après administration unique ou répétée.

Le projet consiste en l'injection d'un transgène thérapeutique grâce à un vecteur (par exemple un vecteur adéno-associé recombinant ou AAVr), Les administrations de produit de thérapie génique sont à faire selon la voie envisagée chez l'homme. Il peut s'agir de la voie systémique (intraveineuse, elle permet alors de traiter un grand nombre de tissus et des tissus difficiles à atteindre par injection directe) ou d'une voie locale (injection directement dans le tissu cible, par exemple le muscle).

Les animaux sont observés pendant a minima 1 à 3 mois selon la nature du vecteur et du gène testé.

La recherche des effets toxiques à la suite de l'administration du vecteur contenant le gène à transférer ne peut être conduite in vitro. Les effets toxiques résultent des interactions complexes entre les réactions cellulaires locales au niveau de l'injection du vecteur et du gène à transférer et les réponses mises en œuvre par l'organisme en réponse à cette injection de gènes. L'animal est le seul organisme vivant permettant d'étudier l'impact d'un transfert de gène dans différents types cellulaires (différents organes) et sur son phénotype, en lien avec le produit testé, le mode d'administration utilisé et la dose. L'espèce chien a été choisie à cause de similarités avec l'homme, par exemple dans les dimensions du tissu cible et/ou par l'approche chirurgicale des injections (par exemple les muscles).

L'évaluation de la bio-distribution du gène transféré permettra de déterminer sa capacité à transduire l'intégralité du site ciblé (par exemple, le muscle dans le cas d'une injection intramusculaire).

Le nombre d'animaux utilisés est déterminé a minima de façon à obtenir des résultats suffisamment robustes d'un point de vue statistique et ainsi atteindre tous les objectifs de l'étude en procédant à toutes les analyses nécessaires sur un nombre d'animaux optimisés pour évaluer la bio-distribution et/ou la recherche de biomarqueurs de la réponse immunitaire par exemple.

Nombre d'animaux pour une période de 5 ans: 200

Les animaux sont hébergés en groupe selon la réglementation en vigueur avec enrichissement du milieu (hébergement a minima par deux individus si possible, jeux type balle mis à disposition, séances de socialisation régulières, sorties régulières et planifiées dans des couloirs de jeux...)

Un suivi régulier des animaux (observations biquotidiennes, pesées régulières, analyse du comportement) est assuré

Des mesures adaptées sont mises en place en fonction des interventions prévues au cours de ce projet. Si une intervention invasive ne peut être évitée et est nécessaire pour administrer le produit génique (via une chirurgie), les animaux pourront être prémédiqués et suivis de façon à minimiser les douleurs éventuelles (anesthésie et analgésie adaptées) ; dans ce cas, les animaux sont ensuite

isolés (environnement enrichi) pour permettre leur suivi. En fin d'étude, les animaux seront euthanasiés selon une procédure éthiquement acceptée.

L'état de santé des animaux est contrôlé tous les jours et évalué par rapport à des points limites définis de façon à éviter un inconfort/souffrance prolongé. Si la souffrance d'un animal est jugée trop importante et si aucun soin ne peut lui être apporté, il sera euthanasié selon une procédure éthiquement acceptée, avec le vétérinaire.

18958 L'esturgeon européen fait l'objet d'un plan de restauration aux niveaux national et européen. Dans ce cadre, un stock captif issu des derniers individus sauvages et des premières reproductions assistées a été constitué afin de permettre des repeuplements en milieu naturel. L'âge de première maturation des individus est tardif. Les premiers mâles issus des premières reproductions assistées sont en âge de se reproduire et de la semence est récoltée depuis 2 ans, pour alimenter la banque de sperme en vue d'optimiser les croisements génétiques. Cette expérimentation a fait l'objet d'une saisine déjà autorisée. Les femelles vont commencer à être matures et pourront produire des œufs et participer aux reproductions prochainement. Le projet proposé concerne les manipulations des femelles et la mise en œuvre du protocole de reproduction assistée développé sur l'espèce.

La principale atteinte aux animaux concerne leur manipulation depuis leur capture dans les bassins, le suivi de la maturation des gonades (grâce à des échographies, des prises de sang, des biopsies), et le prélèvement des œufs matures par le biais d'un massage ventral et une microchirurgie. Les premières manipulations consistent en la capture des femelles, grâce à l'intervention d'un plongeur professionnel, afin de réaliser des échographies et prises de sang pour valider le stade de maturation des gonades. Les poissons restent dans l'eau le temps des échographies et prises de sang qui durent moins de 5 minutes. Le repérage des individus est réalisé sous l'eau, avant capture par le plongeur professionnel, grâce à la lecture de son numéro d'identification individuel, cela permet de ne pas manipuler les poissons non souhaités (le plongeur vérifie le numéro avant de capturer le poisson). Si le poisson est sélectionné pour participer à la reproduction car le stade de maturation des gonades est avancé, il est transféré à l'aide d'un chariot équipé d'une cuve en eau dans des bassins spécifiques de 15m³ d'eau, 4 m de diamètre. Les poissons de grande taille (environ 1,65 m) ont besoin de nager dans des bassins qui font a minima 2 fois leur taille. Ces poissons sont lourds, environ 20 à 30 kg. Hors de l'eau, le poids des organes peut avoir des conséquences néfastes pour le poisson. Il doit rester hors de l'eau le moins longtemps possible. Le transport dans la cuve remplie d'eau dure environ 3 minutes. Les poissons seront ensuite recapturés 15 jours plus tard, afin de subir un nouveau contrôle de la maturation par échographie et une prise de sang. Des biopsies des organes reproducteurs peuvent être réalisés afin d'identifier le stade ultime de maturation. La biopsie se fait hors de l'eau à l'aide d'un trocart et les œufs sont prélevés grâce à une canule. Les injections d'hormones et une modification du régime thermique sont réalisées pour finaliser la maturation, ce qui permet de finaliser la maturation des œufs. La phase de prélèvement des œufs se fait hors de l'eau, les poissons sont alors anesthésiés. Les œufs sont prélevés par massage ventral dans un premier temps, puis grâce à une microchirurgie afin d'éviter que les derniers œufs restent dans la cavité et se nécrosent par la suite.

Les individus sont ensuite remis dans leur bassin d'origine et surveillés jusqu'à leur réveil complet. En fonction des années, et des degrés de maturation des individus, 40 poissons pourront être utilisés sur toute la période du projet. Au vue des retours d'expérience sur les taux de fécondation et d'éclosion, et les objectifs de repeuplement du plan national d'actions, il faudra utiliser environ 8 femelles par an pendant 5 ans. L'optimisation des croisements génétiques réalisée pendant la phase de fécondation permet de réduire le nombre d'individus utilisés (R de réduire).

Le projet doit être obligatoirement être mis en place sur les spécimens d'esturgeons européens, puisque l'objectif du programme est la sauvegarde de cette espèce (R de remplacer). Les juvéniles et larves issues de ces reproductions sont destinées à être réintroduites dans le milieu naturel dans le cadre du Plan National d'Actions.

Toutes les précautions seront mises en place afin de réduire au maximum le stress des poissons. Ainsi la plupart des manipulations lorsque le poisson n'est pas anesthésié se feront dans l'eau afin de minimiser le stress. Le moment idéal des injections d'hormones est identifié grâce à des suivis

mis en place spécifiquement (échographies des individus, prises de sang et suivi de la maturation grâce aux analyses de sang réalisées et biopsies des organes reproducteurs). Ces manipulations sont réalisées un nombre minime de fois et dans des conditions de diminution du stress des poissons. Les poissons sont sédatisés pour les manipulations faites hors de l'eau (biopsies et prélèvement des œufs). Ces mesures correspondent au R de raffiner. De plus en terme de raffinement, quand les poissons sont sortis de l'eau, ils sont déposés sur un matelas humidifié et sont constamment oxygénés grâce à un tuyau placé dans la bouche. Une fois les prélèvements réalisés, les poissons retournent dans leur bassin de repos et un suivi de l'état est mis en place. Si dans le bassin de repos, le poisson montre des signes de stress, de fatigue, cela indiquera que nous avons atteint le point limite de la manipulation et le poisson retournera dans le stock et ne subira pas d'injection.

Chaque poisson est identifié individuellement par numéro pit-tag, ce qui permet de ne pas confondre les individus et de n'utiliser qu'une fois chaque poisson.

18959 L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre d'une prestation contractuelle pour le compte d'un client qui développe des composés thérapeutiques visant les troubles liés au vieillissement. Les troubles liés au vieillissement (troubles neurodégénératifs, sarcopénie...) ont été largement associés à un dérèglement du processus de mitophagie (processus de recyclage des mitochondries endommagées au sein des cellules) dans différents organes. Ce mécanisme représente ainsi une cible d'intérêt thérapeutique majeur dans la lutte contre les effets du vieillissement. La famille de composés (10 molécules) testée dans le présent projet ont montré une capacité à déclencher une accélération du recyclage des mitochondries âgées au niveau musculaire notamment. Ce mécanisme laisse suspecter que ces composés puissent induire une amélioration de la synthèse protéique et de la fonction musculaire, ce qui pourrait considérablement améliorer les déficits musculaires liés à l'âge (sarcopénie). La société cliente souhaite ainsi tester l'impact de 10 composés en développement sur la fonction musculaire dans un contexte d'administration chronique in vivo chez la souris âgées de 21 mois. Les 10 composés seront administrés par voie orale pendant 6 semaines et leurs effets sur la prise alimentaire, le poids corporel et la fonction musculaire seront mesurés et comparés à une administration orale de véhicule et d'un composé de référence pendant la même durée. La fonction musculaire sera abordée par des tests d'endurance menés sur tapis roulants, qui seront réalisés juste avant le début du traitement (valeurs de base) et à l'issue des 6 semaines de traitement. A l'issue de l'étude, des analyses biochimiques et histologiques seront menées sur les muscles prélevés post-mortem. Cette étude nécessitera l'utilisation de 234 souris C57Bl/6J divisés en 13 groupes expérimentaux de 18 animaux chacun:

- 10 groupes de souris âgées (21 mois) traités avec les 10 composés tests
- 1 groupe de souris âgées (21 mois) traitées au véhicule (contrôle négatif)
- 1 groupe de souris âgées (21 mois) traitées avec un composé de référence (contrôle positif)
- 1 groupe de souris adultes (11 mois) traitées au véhicule (contrôle du modèle âgé).

La règle des 3Rs a été prise en compte dans l'élaboration du présent protocole:

- **Raffinement:** Le protocole a été planifié de façon à limiter au maximum tout stress et tout inconfort pour les animaux. Les animaux seront hébergés par 3 en cages ventilées et un enrichissement du milieu sera assuré par l'ajout de maisons dôme et de briquettes en bois spécialement conçues pour les rongeurs. L'ensemble des prélèvements terminaux seront réalisés en post-mortem. Par ailleurs, bien que le protocole soit très peu invasif, un suivi journalier des animaux permettra une action rapide en cas d'atteinte des points limites établis. Ces actions incluent l'emploi d'analgésiques ou le retrait de l'animal du protocole expérimental.

- **Réduction:** Le nombre d'animaux utilisés par groupe (n=18) a été défini comme le nombre minimum nécessaire pour être en mesure de mettre en évidence une différence statistiquement significative sur les paramètres étudiés, notamment ici, la l'endurance sur tapis roulant.

- Remplacement: Des études préliminaires in vitro et ex-vitro ont été réalisées par le client à partir d'une famille de molécules afin de définir les 10 composés ayant les plus fortes chances de succès en termes de développement. L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie à ce stade afin de s'assurer de l'efficacité réelle d'un composé sur la mitophagie et la performance musculaire lors d'une administration in vivo.

18960 Les maladies des valves cardiaques (valvulopathies) sont fréquentes et graves. Il s'agit principalement du rétrécissement aortique et de l'insuffisance mitrale. Les symptômes des valvulopathies cardiaques sont principalement l'essoufflement, les douleurs thoraciques et la fatigue. Le cœur est divisé en quatre parties, appelées les cavités. Les cavités supérieures sont les oreillettes droite et gauche, tandis que les cavités inférieures, les ventricules droit et gauche. Chaque cavité est dotée d'une valve contrôlant le débit unidirectionnel et continu du sang, qui traverse le cœur pour se diriger vers les poumons et le reste du corps. Ce projet s'intéresse à la valve aortique qui est située à la sortie du cœur entre le ventricule et l'aorte et à la valve mitrale qui est positionnée entre l'oreillette gauche et le ventricule. Le traitement des valvulopathies était jusque-là chirurgical et donc très lourd (intervention à thorax ouvert) et souvent inadapté aux malades les plus fragiles.

Or il existe à présent des méthodes moins invasives (par voies percutanées). Pour le traitement de la valve aortique, il s'agit du TAVR pour « Transcatheter Aortic Valve Replacement » et du TMVR, « Transcatheter Mitral Valve Replacement », pour le traitement de la valve mitrale. Ces méthodes consistent à remplacer la valve concernée par une prothèse valvulaire (bioprothèse) par voie artérielle (cathétérisme).

Ces techniques ont lieu sous guidage échographique et fluoroscopique. Le TMVR fait pour l'instant appel à une thoracotomie latérale gauche, c'est-à-dire une incision sous le sein gauche. Cette voie permet d'aborder la pointe du cœur. C'est par là que la prothèse de valve est introduite. Cependant, comme toute bioprothèse, on peut s'attendre à une dégénérescence de cette valve TMVR dans quelques années. Il faudra alors être en mesure de proposer une technique de réparation efficace et mini-invasive. Justement, un TAVR est régulièrement utilisé pour traiter les dégénérescences de valves (bioprothèses) implantées par voie chirurgicale conventionnelle. Il peut s'agir de valves aortiques mais également mitrales. Dans ce dernier cas, le TAVR est avancé par voie transeptale, c'est-à-dire en passant par une veine fémorale puis à travers un orifice pratiqué entre les deux oreillettes. Toutefois, la faisabilité du traitement de la dégénérescence de la bioprothèse mitrale TMVR par un TAVR n'a encore jamais été démontrée. Nous nous proposons donc ici de faire la preuve de cette faisabilité. Il n'est actuellement pas possible de réaliser cette étape sur d'autres modèles, ainsi l'utilisation de modèle animal est nécessaire (Remplacement). L'expérimentation consistera dans un premier temps à implanter une valve TMVR puis de réaliser le TAVR-in-TMVR. Après vérification du bon fonctionnement du montage par échographie et fluoroscopie, l'animal sera alors mis à mort et le cœur examiné. Le modèle porc a été choisi. Les tests auront lieu avec deux tailles de bioprothèses et sur deux animaux à chaque fois. Quatre animaux seront donc inclus dans ce projet au rythme de un animal par session et ce sur une année. Ce nombre de quatre, est le minimum d'animaux à inclure pour répondre aux objectifs du projet (Réduction). Bien sûr, l'étude de la faisabilité sur l'animal est précédée de tests techniques sur modèles inertes. Cependant, il est indispensable de démontrer la faisabilité et la sécurité du procédé sur l'animal vivant avant de le considérer applicable chez l'humain. L'équipe comprendra au moins trois médecins aguerris aux techniques TMVR et TAVR Valve in Valve mitrale chez l'humain et avec une expérience des études animales. Il s'agit d'un chirurgien cardiaque, d'un cardiologue interventionnel et d'un échocardiographe. Les personnels de l'animalerie seront également présents tout au long du projet. Les expérimentations auront lieu en salle de cathétérisme cardiaque sous anesthésie générale. La mise en place des dispositifs est réalisée sous guidage fluoroscopique et échocardiographique. La procédure est sans réveil.

Le bien-être animal reposent sur plusieurs mesures, et ce tout au long du projet (Raffinement) :

. Les animaux sont hébergés dans des locaux agréés et bénéficient de soins quotidiens dispensés par du personnel compétent et soucieux du bien-être animal

- . Les animaux sont habitués au personnel animalier afin de limiter tout stress
- . Les animaux sont hébergés en groupes sociaux ce qui leur permet d'exprimer des comportements naturels. Ils disposent d'enrichissements adaptés (jouets : balle, chaîne, grattoir)
- . La procédure est réalisée sous anesthésie générale (mise en œuvre et surveillée par du personnel dédié) et une analgésie adaptée est systématiquement mise en place.
- . Des critères d'alerte précis sont surveillés; si l'animal présente un signe d'appel, des mesures adaptées sont mises en place immédiatement (ajout d'analgésique par exemple).

18961 Le projet de recherche fondamentale que nous mènerons pendant 5 ans consiste à déterminer le rôle des interneurons dans l'apprentissage par observation en condition physiologique. Cette question est primordiale sur le plan humain, car les souvenirs que nous formons (pour bon nombre par observation) définissent qui nous sommes, et sur le plan pathologique car il n'est pas envisageable de guérir les troubles affectant la mémoire si nous ne connaissons pas son fonctionnement.

L'approche expérimentale de ce projet utilise des souris transgéniques qui seront réutilisés à travers différents protocoles. Chez le rongeur, l'environnement est encodé par des réseaux de neurones qui sont distribués dans différentes aires cérébrales, principalement l'hippocampe. Cependant, nous n'en connaissons pas les mécanismes précis. De plus, de nombreuses études montrent que les interneurons de l'hippocampe semblent jouer un rôle majeur dans l'encodage de la mémoire, mais là non plus les mécanismes sont méconnus. Le principal marqueur de l'activité des neurones et des circuits qu'ils forment est leur activité électrique. Notre but est de comprendre, grâce à l'enregistrement de cette activité électrique, comment l'hippocampe encode l'information apprise par observation, et comment cela dysfonctionne dans l'épilepsie. Pour révéler l'identité précise des circuits impliqués, nous utiliserons une approche permettant de manipuler directement l'activité de neurones ciblés grâce à des outils génétiques et une technique permettant d'insérer dans des neurones précis un "interrupteur" contrôlé par un agent chimique. Nous pourrions ainsi éteindre ou allumer des groupes d'interneurones choisis pendant différents états de vigilance pour établir le mode de communication des circuits neuronaux et leurs rôles dans l'activité des réseaux sains et épileptiques. Ces "interrupteurs" seront insérés dans les aires cérébrales d'intérêt grâce à des vecteur viraux injectés in situ sous anesthésie générale dans un premier protocole chez des souris transgéniques. Cela nous permettra de viser des populations choisies de neurones.

Dans un second protocole, les souris issues du premier protocole seront testées dans une tâche comportementale permettant d'évaluer et manipuler l'apprentissage par observation. Dans un troisième protocole, nous utiliserons des microsondes, pour enregistrer l'activité électrique de neurones spécifiques, marqueur de l'apprentissage spatial. Ces animaux seront ensuite testés dans le protocole 2 pour corrélérer l'activité neuronale enregistrée à l'activité comportementale. Enfin, les animaux seront euthanasiés dans une dernière procédure avec une méthode adaptée et respectueuse afin d'extraire les cerveaux pour des analyses anatomiques.

Ce projet est conforme avec les exigences de la règle des 3R. Comme la mémoire ne peut être appréhendée que sur des individus réactifs, il est nécessaire d'utiliser des animaux vigiles pour ce type d'étude.

Remplacement ; Le caractère méconnu du fonctionnement cérébral implique que ce projet ne peut pas se passer de l'utilisation d'animaux afin d'en déterminer les mécanismes. Des études cliniques montrent que les régions cérébrales impliquées dans la mémoire et l'apprentissage semblent conservées à travers les différentes espèces, les résultats de notre étude permettront de mieux extrapoler les mécanismes de représentation et de stockage des informations chez l'Homme. En apportant de nouvelles connaissances sur les réseaux neuronaux impliqués dans la formation de la mémoire, cette étude permettra à plus long-terme de mieux comprendre les pathologies qui y sont associées chez l'Homme, comme la maladie l'Alzheimer ou bien les troubles mnésiques associés au vieillissement.

Réduction ; Ce projet utilise des outils de collection des données à la pointe de la technologie nous permettant d'obtenir des données fiables sur un faible échantillon. De plus, des tests statistiques adéquats nous permettront de limiter la taille des cohortes à un minimum (210 souris).

Raffinement ; Ce projet propose des méthodes pertinentes pour limiter la douleur : des points limites adaptés et précoces ont été mis en place pour chaque procédure (comme les interventions chirurgicales) et prévoient des interventions rapides sur l'animal (analgésie et suivi post-opératoire, puis suivi quotidien des animaux). En effet, tous les actes invasifs seront pratiqués sous anesthésie générales utilisant une association de sévoflurane et buprénorphine. Il potentialise le bien-être animal car les conditions d'hébergement (animaux à plusieurs dans de grandes cages, eau et nourriture ad libitum, enrichissement avec nid végétal, dômes en cartons et divers objets) et de manipulation des animaux (temps important de socialisation entre l'expérimentateur et chaque animal) ont été élaborées pour minimiser au maximum le stress qui est néfaste à tout paradigme comportemental. Toutes ces conditions sont conformes à la législation en vigueur et permettent d'être au plus près du comportement naturel de l'espèce animale. A la fin du protocole, les animaux seront euthanasiés (Euthasol 150 mg/kg + analgésie kétamine 100 mg/kg) et le prélèvement du cerveau sera effectué afin de confirmer la bonne localisation cérébrale des microsondes et des injections des virus.

18962 La maladie de Parkinson est la seconde maladie neurodégénérative la plus fréquente. Elle est caractérisée par des troubles de la coordination motrice, de la rigidité musculaire, des tremblements et une lenteur d'exécution des mouvements. La maladie de Parkinson frappe aujourd'hui 200,000 personnes en France. Les troubles moteurs engendrent rapidement une dépendance physique qui impact négativement la qualité de vie du patient et de son entourage proche. Le manque de médicaments efficace contre la maladie représente un défi majeur pour la santé humaine.

L'objectif de ce projet est de tester des candidats médicaments dans un modèle de souris pour la maladie de Parkinson. Ce modèle sera induit par une injection stéréotaxique de fibrilles d'alpha-synucléine dans le cerveau des souris, couplée à un traitement pharmacologique pour inhiber une protéine lysosomale, l'enzyme GBA. L'alpha-synucléine et l'activité GBA sont directement mis en cause dans la progression de la maladie chez les patients. Ce modèle reproduit les caractéristiques de la maladie de Parkinson, à savoir une perte de neurones de la partie du cerveau lésée chez les patients, une accumulation pathologique de la protéine alpha-synucléine, et une activation des cellules impliquées dans la neuro-inflammation. Ce modèle représente donc un outil pour le développement pré-clinique de candidats médicament pour la maladie de Parkinson.

Il n'y a pas, à ce jour, de traitement permettant de ralentir la progression de la maladie de Parkinson. Les candidat médicament seront administrés par voie sous-cutanée ou par gavage, sur une période de 4 semaines. A la fin des procédures, une analyse histologique permettra d'évaluer l'effet neuroprotecteur du traitement.

À cette fin, le nombre total de souris utilisées sera de 112. Cet effectif permettra de constituer des groupes expérimentaux nécessaires au projet. Le projet se base sur 4 procédures expérimentales.

Au cours de ce projet, une attention particulière sera apportée au respect de la règle des trois R.

Remplacement : Pour les raisons mentionnées dans la section "justification de l'utilisation des animaux", il ne sera pas possible de remplacer cette étude par des stratégies in vitro et/ou in silico. Brièvement, la maladie de Parkinson est caractérisée par l'interaction de plusieurs types cellulaires et plusieurs structures cérébrales, qui ne peuvent pas être reproduite in vitro ou in silico.

Réduction : Le nombre de souris (n par expérience) a été optimisé pour assurer l'obtention de résultats statistiquement significatifs. À cette fin, des études antérieures disponibles dans la littérature scientifique suggèrent un nombre minimal de 7 souris par groupe, afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs en termes de neurodégénérescence et de neuroinflammation, deux caractéristiques essentielles et déterminantes dans la pathophysiologie de la maladie de Parkinson.

Raffinement : nous incluons des procédures visant à améliorer le bien-être des animaux, en nous basant sur:

- (i) la présence d'objets d'enrichissement,
- (ii) des stratégies d'analgésies pré-chirurgie et post-chirurgie,
- (iii) et le contrôle strict des besoins physiologiques des animaux (température corporelle) pendant et après l'opération (pour assurer un rétablissement rapide).

Les animaux seront hébergés par deux au minimum (5 au maximum), en cages ventilées, avec accès ad libitum à l'eau et à la nourriture.

18963 La résistance croissante de certains micro-organismes aux antibiotiques est une préoccupation majeure de santé publique. L'Organisation mondiale de la santé (OMS) a défini les bactéries *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et celles de la famille des *Enterobacteriaceae* comme organismes critiques pour la recherche de nouveaux antibiotiques ou le développement d'alternatives à l'usage de ces derniers.

Des situations inspirées de la nature pourraient permettre de contrôler les populations de bactéries pathogènes tout en limitant le phénomène de résistance. En effet, les bactéries interagissent dans l'environnement avec de nombreux microorganismes tels que les amibes libres. Celle-ci se nourrissent de bactéries et participent ainsi naturellement à la régulation des populations bactériennes, sans cibler un processus bactérien spécifique, limitant potentiellement le développement de résistance. Des amibes libres ont été récemment isolées à partir d'un échantillon environnemental et leur capacité de prédation a été évaluée *in vitro* vis-à-vis de différentes souches bactériennes antibiorésistantes d'*A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*. Les résultats obtenus révèlent que certaines amibes sont extrêmement efficaces pour tuer plusieurs de ces agents pathogènes. Ceci suggère que celles-ci pourraient être utilisées afin de contrôler les populations de bactéries antibiorésistantes qui se développent au niveau de sites infectieux, comme certaines plaies cutanées.

Ce projet a pour objectif d'étudier l'innocuité de l'application des amibes au niveau de sites infectieux et la capacité de celles-ci à contrôler la survenue de réactions inflammatoires cutanées induites par une bactérie pathogène. Cette étude *in vivo* est la suite logique des tests *in vitro* en cours de réalisation et l'utilisation d'animaux est nécessaire afin d'étudier au mieux la réponse inflammatoire vis-à-vis des amibes ainsi que l'innocuité de l'application de ces dernières.

A ce titre, nous capitaliserons sur l'utilisation d'un modèle murin (= souris) de dermatite atopique (maladie chronique inflammatoire de la peau qui touche environ 10% des enfants et 1 à 4% des adultes en Europe) ainsi que sur un modèle murin de cicatrisation d'une plaie cutanée. Nous explorerons tout d'abord (i) l'innocuité des amibes lorsqu'elles sont appliquées sur une peau non compromise (=non lésée) ou (ii) sur une plaie cutanée. Ces expérimentations seront réalisées en déposant (i) les amibes sur la peau de l'oreille des souris ou (ii) sur une petite plaie générée artificiellement au niveau de la peau du dos des souris. Nous chercherons ensuite à démontrer que (iii) les amibes conservent leur activité de prédation vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, lorsque ces agents sont appliqués sur la peau des oreilles de souris, et qu'elles préviennent le développement de l'inflammation cutanée induite par cette bactérie. Lors de ces expériences, les amibes seront dans un premier temps déposées en même temps que les bactéries le premier jour de l'expérimentation, ou alors 6 jours suite à la première application de bactéries lors d'une seconde expérimentation.

Les résultats de cette étude ouvriront de nouvelles perspectives pour tester l'innocuité et l'efficacité de cette approche thérapeutique basée sur l'administration épicutanée d'amibes, pour traiter des réactions inflammatoires et/ou des infections cutanées chez l'homme ou l'animal.

Parmi les différentes espèces animales utilisées en expérimentation, la souris est l'animal le mieux adapté pour le développement de modèles immunologiques et la mesure de l'innocuité d'un traitement. Les expériences ont été conçues en accord avec le principe de la règle des 3R (réduction, raffinement et remplacement). En effet, nous projetons de réduire le nombre de souris nécessaire tout en préservant la robustesse des analyses statistiques, en utilisant au maximum 336

souris. Le protocole est planifié de telle sorte que plusieurs analyses sont réalisées sur le même animal, et en fonction des résultats obtenus, certaines expériences ne seront peut-être pas réalisées. Le bien-être des animaux (raffinement) est également pris en compte : ceux-ci seront endormis par anesthésie générale lors des procédures (application topique des amibes et/ou des bactéries, et lors de la réalisation d'une plaie cutanée) afin de diminuer au maximum le stress et la douleur de ces derniers. De plus, les procédures mises en œuvre ne devraient pas donner lieu à des troubles des fonctions corporelles ou de la santé des animaux. L'état de santé général des animaux sera surveillé tous les jours ouvrés et tout animal qui présenterait des signes physiologiques anormaux suite à l'application épicutanée des amibes, serait mis à mort.

De plus, les animaux seront hébergés par groupes d'individus compatibles, dans des conditions contrôlées et avec la mise en place d'une diversification du milieu.

18964 La mucoviscidose est une maladie génétique autosomique récessive qui se manifeste principalement dans la population caucasienne et qui touche 1 naissance vivante sur 2 500. Cette maladie est la conséquence des mutations du gène Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR) induisant un dysfonctionnement de la protéine CFTR. Chez les patients atteints de mucoviscidose (CF), l'absence de CFTR fonctionnel dans les voies respiratoires entraîne une incapacité à prévenir les infections bactériennes, le déclin progressif de la fonction pulmonaire et in fine la mort du patient. Au cours des 50 dernières années, les progrès spectaculaires réalisés en médecine et en recherche dans le traitement de la mucoviscidose ont permis de faire passer l'âge moyen de survie des patients CF de 5 ans à environ 40 ans. Si la mortalité continue à diminuer au rythme actuel, la durée de vie moyenne des enfants nés devrait atteindre 50 ans. Cette amélioration est un résultat positif. Toutefois, l'allongement de la durée de vie de ces patients s'accompagne d'une augmentation de la survenue de plusieurs comorbidités, en rapport avec le dysfonctionnement de CFTR, comme l'ostéoporose, l'hypertension, l'insuffisance pancréatique et le diabète. Le diabète lié à la mucoviscidose (CFRD) est la comorbidité la plus courante chez les sujets atteints de mucoviscidose. Le développement d'une intolérance au glucose, avant la survenue du diabète chez ces patients, a été lié à une détérioration clinique majeure. L'incidence du CFRD est de 2 % chez les enfants, passant à 20 % chez les adolescents pour atteindre 40 à 50 % à l'âge adulte. Cette proportion croissante suggère une pathogenèse progressive du CFRD. Par conséquent, la survie est significativement affectée chez les patients atteints de CFRD, avec moins de 25 % d'entre eux survivant jusqu'à l'âge de 30 ans, contre 60 % des patients CF affichant une tolérance normale au glucose. Comme la durée de vie moyenne des personnes atteintes de mucoviscidose continue de croître, on s'attend à ce que le CFRD devienne plus fréquent. En raison du caractère unique et de l'importante croissance du CFRD, une meilleure compréhension de son évolution est nécessaire pour améliorer les options thérapeutiques rationnelles. L'objectif de notre projet vise à déterminer comment l'absence ou l'inactivation de CFTR peut contribuer à faire émerger le diabète chez les patients souffrant de mucoviscidose. Seule l'expérimentation in vivo, permettant d'étudier les conséquences métaboliques de l'absence ou de l'inactivation de CFTR, nous permettra de répondre à cette question. En effet, le métabolisme glucidique s'appuie sur un dialogue entre plusieurs organes qu'on ne peut pas reproduire en dehors des modèles animaux. Pour cela, nous étudierons le développement du pancréas endocrine et sa fonctionnalité dans deux modèles murins de mucoviscidose, lesquels sont caractérisés soit par une absence ou une inactivation de CFTR. Notre étude sera menée sur un total de 120 rats et 672 souris sur une période de 5 ans. Nous respecterons la règle des '3R'. Pour cela, les différentes procédures expérimentales ont été consciencieusement pensées et élaborées afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en permettant d'obtenir des résultats statistiquement satisfaisants. Enfin, concernant le raffinement, le confort des animaux sera amélioré par enrichissement de l'environnement. De plus, un suivi régulier du comportement des animaux sera mis en place pour limiter une éventuelle souffrance ou angoisse de chaque animal. Ainsi, des points limites ont été établis et adaptés à la pathologie et à la tranche d'âge des animaux, entraînant l'euthanasie de l'animal si nécessaire. Les résultats de ce projet permettront d'identifier le rôle de CFTR dans la croissance du pancréas endocrine et pourront

servir de base pour développer des thérapies dans le but d'enrayer les conséquences d'un dysfonctionnement de CFTR dans le développement du diabète.

18965 L'axe neuromusculaire est composé d'un neurone dit « moteur », situé dans la moelle épinière, et des fibres musculaires qu'il innerve. Les muscles sont donc innervés par le prolongement (axone) du neurone moteur qui les contrôle et permet le mouvement. Les atteintes de l'axe moteur, telles que la perte des axones et des neurones moteurs ainsi que la dénervation musculaire, sont à l'origine des maladies neuromusculaires. Des études montrent que dans certaines maladies neuromusculaires, comme la sclérose latérale amyotrophique, les neurones moteurs encore fonctionnels sont capables de compenser cette perte en créant de nouveaux prolongements axonaux et une réinnervation partielle. Ces mécanismes compensatoires sont induits par des voies de signalisation pro-régénératives : on parle de régénérescence de l'axe moteur. Ici, nous étudierons des candidats médicaments pour leur capacité à promouvoir la régénérescence de l'axe moteur après compression/lésion du nerf sciatique.

L'objectif de ce projet est dans un premier temps de caractériser un modèle murin de compression nerveuse, c'est-à-dire un modèle où une dégénérescence des axones est induite, afin d'observer le temps que met l'axe moteur à se régénérer chez la souris (7/14/21 jours après l'opération). Ce modèle permettra par la suite de caractériser 3 nouvelles molécules thérapeutiques qui pourraient promouvoir la régénérescence de l'axe moteur dans un contexte de maladie neurodégénérative. Nous testerons donc ensuite trois candidats médicaments dans ce modèle murin de compression nerveuse. Les candidats médicaments seront administrés par voie per os (gavage), sur une durée optimale préalablement déterminée dans la 1^{ère} procédure. L'administration des médicaments sera réalisée 2 fois par jour. A la fin de l'étude, des analyses histologiques permettront d'évaluer les effets régénérateurs des traitements sur la régénérescence de l'axe moteur.

Le nombre total d'animaux sera de 120. Cet effectif permettra de constituer des groupes expérimentaux nécessaires au projet. Le projet se base sur 4 procédures expérimentales. Au cours de ce projet, une attention particulière sera apportée au respect de la règle des trois R.

Remplacement : Il n'est pas possible de remplacer cette étude par des stratégies *in vitro* et/ou *in silico*. Brièvement, La souris possède un système moteur complexe présentant de fortes similitudes avec le système moteur humain. Ce système moteur ne peut être reproduit *in vitro* ou *in silico*, car il est basé sur l'interaction de neurones de moelle épinière, de nerfs périphériques, et de fibres musculaires.

Réduction : Le nombre de souris (n par expérience) a été optimisé pour assurer l'obtention de résultats statistiquement significatifs. Des études antérieures disponibles dans la littérature scientifique ainsi que l'expérience du porteur du projet suggèrent un nombre minimal de 12 souris par groupe, afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs pour les analyses histologiques.

Raffinement : nous incluons des procédures visant à améliorer le bien-être des animaux, en nous basant sur:

- (i) la présence d'objets d'enrichissement,
- (ii) des stratégies d'analgésiques pré-chirurgie et post-chirurgie,
- (iii) et le contrôle strict des besoins physiologiques des animaux (température corporelle) pendant et après l'opération (pour assurer un rétablissement rapide).

Les animaux seront hébergés par deux au minimum (5 au maximum), en cages ventilées, avec accès *ad libitum* à l'eau et à la nourriture.

18966 L'agriculture est un secteur d'activité qui émet une part élevée des émissions de gaz à effet de serre, une partie de ces émissions étant due à la fermentation entérique. Les ruminants émettent notamment du méthane dont la production est directement liée à la quantité de fibres ingérées. Le contexte agro-écologique actuel incite cependant les systèmes de production de ruminants à inclure une part croissante de pâturage dans l'alimentation. L'amélioration de l'efficacité alimentaire est un caractère d'intérêt, notamment dans ce contexte, puisqu'elle permet d'accroître la capacité des animaux à transformer l'aliment ingéré en un produit d'intérêt tout en limitant les rejets polluants.

L'efficacité alimentaire est sélectionnable chez les ovins allaitants, mais la sélection se pratique à partir de mesures effectuées chez un animal en croissance, nourri à volonté avec de l'aliment concentré. Il est ainsi possible de sélectionner des béliers dont les agneaux auront une meilleure efficacité alimentaire lors de leur phase d'engraissement avant abattage. Sur ces agneaux en croissance, l'efficacité alimentaire et l'ingestion sont négativement corrélés : des animaux efficaces ingèrent moins d'aliment pour un même niveau de croissance et de poids. Nous ne pouvons par contre pas avancer que cette sélection permette également une meilleure efficacité alimentaire des brebis adultes en production, nourries principalement avec des fourrages (secs, ou au pâturage). Il convient donc de vérifier si la sélection telle qu'elle est pratiquée actuellement permet également d'améliorer l'efficacité alimentaire dans des régimes alimentaires basés sur des fourrages ou sur du pâturage. En pratique, il est possible de connaître les quantités de fourrage ingérées par chaque animal en bergerie, en utilisant des distributeurs automatiques de fourrage. Quand les animaux pâturent, la connaissance de la quantité ingérée quotidiennement par chaque animal devient difficilement accessible. Or, le calcul de l'efficacité alimentaire d'un animal requiert que cette valeur d'ingestion soit connue. Des méthodes existent pour estimer les quantités ingérées au pâturage. Ces méthodes portent principalement sur l'utilisation de molécules non digestibles qui servent de marqueurs. Notre projet porte sur la faisabilité d'utiliser la méthode des N-alcanes en ovins allaitants afin de prédire leur ingestion au pâturage. Les N-alcanes sont des chaînes carbonées longues, naturellement présentes dans les végétaux, notamment les chaînes avec un nombre impair d'atomes de carbone. Les chaînes à nombre pair d'atomes de carbone sont beaucoup plus rares dans les végétaux. La méthode consiste à faire ingérer un bolus contenant une dose connue (et constante entre bolus) de N-alcanes à nombre pair d'atomes de carbone. Des dosages précis de N-alcanes (chaînes paires et impaires) par chromatographie en phase gazeuse dans des échantillons d'herbe offerte et de fèces permettent d'estimer la quantité d'herbe ingérée par chaque animal.

Dans notre projet, nous souhaitons tester cette méthode par l'administration de N-alcanes à nombre pair d'atomes de carbone par voie orale pendant 22 jours, et la collecte d'échantillons (foin et fèces) réalisée pendant 2 périodes de 5 jours chacune. Ainsi, 5 brebis adultes de race Romane seront nourries ad libitum de foin distribué par un distributeur automatique de fourrage et de bouchons de cellulose imprégnés de N-alcanes à chaîne paire. Les brebis seront choisies de poids très variés de façon à maximiser les écarts d'ingestion attendus. Les brebis de cet essai seront des brebis destinées à la réforme car elles devront être euthanasiées en fin d'essai. En effet, les N-alcanes ne font pas partie des aliments et additifs alimentaires autorisés dans l'alimentation animale. Ce projet pilote nous servira à valider l'utilisation de cette méthode et sa faisabilité dans une condition d'élevage proche des conditions conventionnelles, avant d'envisager de l'appliquer sur un plus grand nombre d'animaux issus de béliers sélectionnés pour leur efficacité alimentaire.

Respect de la règle des 3R :

- Raffiner : les animaux seront hébergés en groupe de façon à ce qu'ils expriment leurs comportements sociaux. Afin de limiter le stress de contention, l'administration de bouchons de cellulose imprégnés de N-alcanes ainsi que les prélèvements seront réalisés par du personnel qualifié à l'aide de matériel de contention et de droguage adapté aux ovins et auquel les animaux sont habitués. Le suivi en continu de leur ingestion grâce au distributeur automatique de fourrage permettra d'alerter si une baisse significative de l'ingestion est observée. Une surveillance accrue de l'animal concerné serait alors mise en place, en complément de la surveillance quotidienne habituelle des animaux.
- Réduire : notre projet vise à valider la technique des N-alcanes afin de dimensionner au mieux de futurs essais. Ainsi, 5 brebis adultes seront suivies pour leur ingestion quotidienne de fourrage et suivront le protocole d'administration et de dosage des N-alcanes. L'utilisation de 5 individus permettra de mettre en évidence d'éventuelles limites techniques et servira de référence pour le dimensionnement de futurs essais.
- Remplacer : Aucun modèle alternatif à l'utilisation d'animaux vivants n'existe pour mesurer l'ingestion chez ovins.

18967 La maladie veineuse thromboembolique (MVTE) est la conséquence de la formation d'un caillot dans une veine. Il s'agit d'une maladie fréquente qui constitue un problème de santé publique majeur du fait de sa mortalité et sa morbidité importante. En effet, la MVTE est responsable de 10 à 20 000 décès par an en France. 150 000 nouveaux cas par an en France sont enregistrés. Malgré les traitements anticoagulants, la MVTE s'accompagne de séquelles qui affectent la qualité de vie des patients. Nous pensons que ces séquelles sont notamment la conséquence du remodelage de la paroi veineuse. Cela se produirait suite à des modifications de l'expression génique induite par des mécanismes épigénétiques. Il existe des inhibiteurs permettant de bloquer ces mécanismes. Nous nous proposons de tester différents inhibiteurs et d'évaluer leur effet sur la thrombose veineuse. Pour cela, nous souhaitons mettre en place un modèle expérimental in vivo. Nous allons étudier l'inhibition de certaines protéines d'intérêts dans un contexte de thrombose. Une mise au point de la dose et de la fréquence de l'inhibiteur sera effectuée.

Ce projet de recherche aura une durée de 5 ans et nous utiliserons 282 souris. L'étude de cette pathologie complexe nécessite la mise en place de modèles animaux. En effet, la MVTE est une maladie multifactorielle impliquant le système vasculaire mais également les cellules sanguines. De nombreux types cellulaires étant impliqués dans la formation d'un thrombus, l'étude des mécanismes mis en jeu nécessite donc l'utilisation de modèles expérimentaux. Les souris ne faisant pas spontanément de thrombus, la thrombose veineuse devra être induite de manière chirurgicale. Nous serons amenés à induire la formation de caillot sanguin veineux par application d'un courant électrique au niveau de la veine cave inférieure (procédure de classe sévère). Les dommages induits par la procédure peuvent être une gêne ou une douleur liée à la chirurgie et à la cicatrisation. Pour limiter les contraintes induites par ces actes, nous avons pensé ce projet de recherche en suivant la règle des 3 R « Remplacer, Réduire, Raffiner ». Afin de réduire le nombre d'animaux, certains lots ne seront pas utilisés si les données obtenues avec les premiers groupes d'animaux sont concluantes. Les prélèvements issus d'un seul animal serviront à différentes analyses. De plus, nous utilisons une technique non-invasive de mesure du thrombus chez la souris basée sur l'échographie-doppler nous permettant de réduire le nombre d'animaux. Concernant le raffinement des expériences, nous avons tenu compte du bien-être des animaux tout au long du protocole expérimental. En dehors des actes techniques réalisés, les animaux sont hébergés selon les standards prévus par la réglementation, en groupes sociaux, dans un environnement adapté et enrichi. Dès lors qu'une souris entrera dans la procédure expérimentale, nous évaluerons son bien-être à l'aide d'une grille d'évaluation conçue pour ce projet. Elle nous permettra d'identifier les points limites et d'apporter dans les plus brefs délais la mesure adaptée à l'animal. Concernant le remplacement des animaux, nous avons réalisé des études in vitro au préalable, qui suggèrent l'implication de nos protéines d'intérêts dans la dysfonction endothéliale.

Les animaux seront systématiquement anesthésiés lors des chirurgies et des prélèvements sanguins. Lors des actes chirurgicaux, nous utiliserons des analgésiques afin de limiter la douleur. Les animaux seront mis à mort par dislocation des vertèbres cervicales lorsqu'ils sortiront de la procédure.

18968 L'acétylcholine est un neurotransmetteur qui est impliqué dans de nombreuses fonctions cérébrales et a été impliqué dans de nombreuses maladies neuropsychiatriques (Maladie d'Alzheimer, Maladie de Parkinson, Schizophrénie, Troubles de Déficit d'Attention avec ou sans Hyperactivité...) à partir d'étude post-mortem. En effet, il n'est pour l'instant pas possible d'étudier le système cholinergique in vivo, car il n'existe pas de traceurs radioactifs utilisables en imagerie moléculaire en tomographie par émission de positons (TEP) ciblant ce système. Au laboratoire, nous avons développé et mis au point un radiotracer ciblant ce système qui présente des caractéristiques physico-chimiques et in vitro prometteuses. Des tests réalisés chez le rongeur confirment le potentiel du radiotracer pour l'imagerie TEP du transporteur vésiculaire de l'acétylcholine, et des études chez le primate non humain (PNH) sont maintenant requises afin de pouvoir pousser le développement de ce radiotracer jusqu'à la clinique.

L'objectif de ce travail est de continuer la caractérisation in vivo ce traceur sur le PNH pour l'imagerie TEP de la neurotransmission cholinergique à l'aide d'un nouveau système récemment acquis et dédié à l'imagerie TEP chez le primate. Cette saisine s'articulera autour de deux procédures.

Une première procédure regroupant 3 types d'expériences:

- des expériences préliminaires nécessaires à la prise en main du nouveau système d'imagerie que nous réaliserons sans radiotraceur
- des expériences à l'aide du radiotraceur le plus utilisé i. e. le 2-desoxy-2-(18F)fluoro-D-glucose (18FDG)
- des expériences à l'aide du radiotraceur ciblant le système cholinergique (mis au point au sein de notre laboratoire)

La seconde procédure portant sur les expériences dédiées à la caractérisation cinétique du radiotraceur dans un compartiment de fixation non spécifique, le sang.

Nous utiliserons 6 primates non humains pour ce protocole.

Ce protocole répond aux exigences des 3R :

(i) Remplacement : l'utilisation de l'imagerie TEP en préclinique permet de quantifier des cibles de façon non invasive et longitudinale chez l'animal, et l'étape primate non humain est un prérequis avant passage à la clinique.

(ii) Réduction : l'utilisation de l'imagerie permet de réduire le nombre d'animaux utilisé, et notamment pour ce protocole, des animaux provenant d'autres protocoles seront réutilisés.

(iii) Raffinement : les administrations seront réalisées sous anesthésie générale. Durant cette procédure, les animaux seront surveillés par le personnel compétent. Ce projet n'induit aucune détresse ou douleur (prévention de l'hypothermie, monitoring cardio-pulmonaires, utilisation de matériel et techniques dédiées à la clinique humaine et pédiatrique). Les macaques sont hébergés ensemble en volière (enrichissement social). Les animaux disposent de plateformes surélevées. L'alimentation couvre les besoins journaliers et est complétée par une distribution de friandises deux fois par jour. Un programme d'enrichissement hebdomadaire est mis en place dans le cadre de leur hébergement (recherche et diversité de l'alimentation, manipulation d'objets, échelles, plateformes surélevées, musique, vidéo...), ceci donnant un environnement favorable aux procédures expérimentales ; chaque injection est précédée de l'application locale d'une crème anesthésique permettant de réduire une éventuelle douleur. Une relation de confiance entre l'animal et le personnel affecté aux soins et à l'hébergement est propice et nécessaire à la réussite de ce projet.

18969 Fin 2019, un nouveau coronavirus (syndrome respiratoire aigu sévère coronavirus 2; SRAS-CoV-2) qui provoque des maladies respiratoires chez l'Homme a été détecté à Wuhan, en Chine. Le 11 mars 2020, l'Organisation mondiale de la santé a déclaré que les infections causées par ce nouveau coronavirus avaient atteint des proportions pandémiques. Avec plus de 120 millions de cas confirmés dans le monde depuis le 31/12/2019 dont 24 millions en Europe et 2,6 millions de décès dans le monde dont 580 000 en Europe, un état d'urgence a été lancé.

Brièvement, la pathologie se déclenche suite à l'infection par le virus SARS-Cov2 qui pénètre dans l'organisme via les voies aériennes, depuis le nez et la bouche. Une partie de sa protéine de surface (la région RBD de la protéine S) se fixe au récepteur ACE2 exprimé à la surface des cellules qui tapissent les voies respiratoires. Une autre protéine cellulaire (TMPRSS2) permet ensuite au virus de pénétrer dans la cellule. Une fois à l'intérieur, il utilise la machinerie cellulaire de l'hôte pour s'y multiplier. De nouveaux virions se forment et vont infecter de nouvelles cellules. Ainsi, l'affinité de la liaison entre la protéine S et le récepteur ACE2 détermine le niveau de la réplication virale et la sévérité de la maladie. Bloquer expérimentalement le récepteur ACE2 ou TMPRSS2 permet d'empêcher le virus de pénétrer dans les cellules et se répliquer.

L'infection déclenche rapidement la production de molécules impliquées dans l'inflammation, un moyen naturel de lutte contre les infections : des cytokines (IL-6, IL-8, IL-10...) et d'autres médiateurs. Ces molécules exercent une action antivirale locale et attirent des cellules immunitaires capables d'éliminer les cellules infectées (monocytes, macrophages, lymphocytes T). Si cette

réponse initiale est inefficace, la production des cytokines devient anormale et engendre un phénomène hyper inflammatoire : cet évènement, appelé « orage cytokinique », survient souvent autour du 8e jour suivant le début des symptômes. Il induit une réponse immunitaire incontrôlée dont les conséquences peuvent mettre en jeu le pronostic vital et imposer une admission en réanimation.

Une stratégie clé pour protéger les humains de cette pandémie de coronavirus est le développement de vaccins et molécules thérapeutiques efficaces. Par conséquent, des modèles animaux qui ressemblent étroitement à la pathogenèse de la maladie induite par le SRAS-CoV-2, la maladie à coronavirus 2019 (COVID-19) chez l'homme, sont essentiels pour la recherche sur la maladie, les mécanismes d'action du virus et pour l'évaluation des vaccins potentiels et des médicaments antiviraux.

Certains auteurs ont rapporté que le SRAS-CoV-2 causait une maladie pulmonaire grave chez les hamsters et ont suggéré que les hamsters pourraient servir de modèle mammifère utile pour COVID-19. Ces auteurs ont évalué la pathogénicité et le tropisme tissulaire des isolats de SRAS-CoV-2 chez les hamsters après une infection intranasale, et ont constaté que le virus répliquait efficacement dans les voies respiratoires. Ils ont déterminé le titre infectieux du virus dans les cornets nasaux et dans les poumons. Les isolats du SRAS-CoV-2 se répliquent efficacement dans les poumons des hamsters syriens et provoquent des lésions pathologiques sévères similaires aux caractéristiques d'imagerie communément rapportées des patients COVID-19 avec pneumonie.

De plus, des hamsters infectés par le SRAS-CoV-2 développent une réponse d'anticorps neutralisants et sont donc protégés contre le rechallenge avec SARS-CoV-2. Les hamsters syriens sont un petit modèle animal utile pour l'évaluation des vaccins, des immunothérapies et des antiviraux.

Le modèle souris génétiquement modifiée ou non, va permettre de compléter la recherches in vivo et le développement de traitements et de vaccins contre COVID-19.

Mise en œuvre des 3R :

Remplacement :

Aucune méthode évitant totalement le recours à l'animal selon les exigences réglementaires de tous les pays de destination des produits n'est développée à ce jour pour les procédures expérimentales décrites.

A l'heure actuelle, les tests in vitro, effectués préalablement pour valider l'intérêt des cibles identifiées et l'efficacité de nouvelles molécules, ne permettent pas d'appréhender l'intégralité des mécanismes de l'infection et de l'interaction hôtes/pathogènes. C'est pourquoi, le recours à des modèles expérimentaux in vivo s'avère nécessaire pour la compréhension et l'évaluation des mécanismes d'actions des composés candidats. Ces modèles in vivo permettent également d'anticiper l'éventuelle toxicité des molécules thérapeutiques dans ces conditions complexes de relation hôte/pathogène (implication du système immunitaire).

Réduction :

Le schéma expérimental des procédures de ce projet s'appuie sur des données bibliographiques. Ces expériences feront l'objet d'une revue par des biostatisticiens afin de calculer au plus juste le nombre d'animaux à utiliser. Ne seront administrées aux animaux que des modèles d'intérêt sélectionnées à partir de filtres in vitro, in silico etc...donc en moins grand nombre de molécules et donc moins d'animaux utilisés.

Raffinement

Les animaux sont hébergés en groupe dans des cages contenant des dispositifs d'enrichissement dans des locaux appropriés, conformes aux standards réglementaires et suivis par un personnel spécifiquement formé. Les procédures mises en oeuvre, de degrés de gravité modéré, de durées allant de quelques heures à 2-4 semaines selon la procédure nécessitent des observations quotidiennes dont la fréquence est adaptée à la hausse selon la durée et la sévérité du modèle. A chaque fois que cela est possible, une anesthésie générale ou topique est pratiquée et des points limites sont mis en place dans les études pour limiter la souffrance des rongeurs.

Les manipulateurs sont formés et validés dans leurs gestes ce qui réduit les manipulations douloureuses.

Dans le cadre de ce projet, le nombre d'animaux (hamsters et souris) utilisés représente 4000 rongeurs par an, soit 20000 rongeurs pour 5 ans,

18970 Ce projet encadre l'utilisation d'animaux pour la formation continue du personnel effectuée en interne. Cette formation est obligatoire et est complémentaire à la formation spécialisée en expérimentation animale qui est un pré-requis. La formation interne permet d'acquérir les compétences nécessaires pour effectuer des gestes techniques auprès de personnes déjà formées (formation par des pairs). L'entraînement permet de s'assurer que le geste est toujours acquis. Le personnel est régulièrement évalué pour s'assurer qu'il maîtrise le geste technique. La fréquence des évaluations dépendra de la complexité du geste.

La formation et l'entraînement permettent d'assurer la compétence du personnel. Seules des personnes formées et compétentes peuvent participer aux expériences, entretenir les animaux ainsi qu'être responsables de la mise à mort. De la compétence du personnel va dépendre la bonne réalisation de l'étude et permettre ainsi d'obtenir un résultat fiable en utilisant le moins d'animaux possible. La formation et les évaluations sont tracées dans le livret de compétence de la personne formée.

Ce projet s'applique à toute utilisation de souris, de rats, de gerbilles ou de hamsters permettant d'assurer la formation continue du personnel pour des gestes tels que par exemple les techniques d'administrations et de prélèvements, la chirurgie, l'anesthésie et l'euthanasie.

L'utilisation d'animaux n'est réalisée que s'il n'est pas possible d'effectuer la formation par des méthodes alternatives. Ces formations et entraînements s'appliquent :

- à une technique existante,
- à une nouvelle technique qui sera ensuite utilisée dans un autre projet éthique.

Lorsque le geste technique est susceptible d'engendrer une douleur ou souffrance des anesthésiques et/ou des analgésiques seront administrés. Dans le cas de formations chirurgicales des soins spécifiques seront apportés aux animaux. La formation est encadrée par une personne compétente au geste enseigné et/ou par un vétérinaire. La bonne acquisition du geste est ensuite évaluée par un pair compétent.

Les animaux utilisés seront préférentiellement des animaux utilisés au préalable dans d'autres projets pour lesquels le degré de gravité précédent n'a pas été sévère. De plus, afin de réduire le nombre d'animaux utilisés pour évaluer les compétences du personnel, les évaluations seront préférentiellement réalisées lors des études. Le nombre total d'animaux utilisés pour les 5 ans du projet est de 1600 animaux (soit, par an, 200 souris, 100 rats, 10 hamsters et 10 gerbilles).

18971 L'espérance de vie des femmes est passée de 48 ans à plus de 80 ans en un siècle. L'arrêt de la production d'oestrogènes à la ménopause (51 ans en moyenne) entraîne souvent un cortège de troubles fonctionnels (impactant la qualité de vie) et une moindre protection artérielle, métabolique et osseuse. Le traitement de la ménopause est donc un défi relativement récent, qui a connu des aléas à la suite de l'étude américaine réalisée chez des patientes en période largement post-ménopausique. Les effets protecteurs des oestrogènes vis-à-vis du développement de l'athérosclérose et du diabète de type II sont largement décrits dans des modèles animaux. Le but de projet est de comprendre comment les oestrogènes agissent en physiologie et physiopathologie grâce à des modèles de souris transgéniques uniques. Le but à terme est d'identifier de nouvelles molécules qui permettent de découpler les effets bénéfiques (protection vasculaire, diabète, prévention de l'ostéoporose) des effets délétères (cancer du sein et de l'endomètre, thrombose), qui sont un frein au traitement hormonal substitutif de la ménopause mais aussi de la contraception (risque thromboembolique). Pour comprendre l'impact des oestrogènes dans ces différents effets physiologiques et physiopathologiques, les souris femelles, sauvages ou transgéniques subissent ou non une ablation des ovaires pour supprimer la production d'oestrogènes, et pour mimer ce qui se passe à la ménopause. Puis, ces souris sont soumises quelques semaines plus tard, à un

traitement oestrogénique pour mimer le traitement hormonal de la ménopause. L'analyse des différents effets des oestrogènes est alors effectuée par mesure des différentes fonctions vasculaires (cicatrisation du vaisseau et prévention des dépôts de gras dans l'artère).

De la naissance à la mort, les souris sont hébergées selon les conditions de la directive européenne, régies par les principes de remplacement, de réduction et de raffinement (Règle des 3 R) :

1- L'ensemble des effets étudiés étant des effets physiologiques ou physiopathologiques, il n'y a pas d'autre alternative d'étude que l'utilisation d'animaux vivants. L'analyse des fonctions vasculaires ne peut être modélisée en boîte de pétri. Il n'y a donc pas d'alternative de remplacement.

2- Chaque lot de souris est composé de groupes sauvages et transgéniques (10 modèles d'invalidation), dont chacun sera traité ou non avec des traitements oestrogéniques (100 à 150 souris en fonction du nombre de traitements utilisés). 5000 animaux seront utilisés dans ces 8 procédures permettant d'étudier les effets vasculaires des traitements oestrogéniques. Le nombre de souris utilisées a été calculé pour donner des résultats statistiquement significatifs par un test ANOVA 2 facteurs (effet de la mutation génique et du traitement).

3- Le choix de l'espèce s'est orienté vers la souris car c'est le seul modèle pour lequel a été générée l'invalidation génique du récepteur aux oestrogènes de façon tissu-spécifique. Les souris utilisées pour ce projet seront surveillées quotidiennement. Le bien-être de l'animal sera pris en compte avec enrichissement du milieu, et les conditions d'anesthésie seront adaptées à chaque procédure chirurgicale. Pendant les chirurgies, les souris seront maintenues sur des tapis chauffant et des anti-douleurs sont utilisés. En cas d'amaigrissement excessif (>20%) ou de signe de souffrance de l'animal (apathie, yeux fermés, absence de toilettage, prostration), l'animal sera sorti de la procédure et euthanasié.

18972 Un dysfonctionnement du système immunitaire peut provoquer la rupture de la tolérance au soi et être à l'origine du développement de maladies auto-immunes. Ainsi, la connaissance approfondie des mécanismes immunologiques impliqués dans la tolérance représente un enjeu capital pour améliorer à la fois la compréhension et le traitement des maladies auto-immunes.

L'auto-immune PolyEndocrinopathy - Candidiasis - Ectodermal - Dystrophy est une maladie auto-immune héréditaire rare qui reste aujourd'hui mortelle et incurable. Les patients atteints de cette pathologie présentent une déficience pour la protéine auto-immune regulator qui est le régulateur de la transcription clé de la sélection négative. Lorsque la protéine AIRE n'est pas exprimée les thymocytes auto-réactifs échappent à la délétion clonale ce qui conduit au développement d'auto-immunité en périphérie.

Récemment notre équipe a généré le premier modèle de rat déficient pour la protéine AIRE. Contrairement aux modèles déjà existants, celui-ci présente des symptômes similaires à la pathologie humaine. Notre équipe a de plus étudié la capacité du traitement anti-CD45RC à réguler le développement des symptômes sur ce modèle de rat.

L'objectif de ce projet est d'étudier la capacité du système immunitaire dans un modèle de psoriasis induit par l'application d'une crème à l'origine d'une hypersensibilité (Aldara Crème 5%, Imiquimod) sur les oreilles chez des rats déficients pour la protéine AIRE, traité ou non par l'anticorps anti-CD45RC, afin d'en étudier les mécanismes d'action dans cette maladie.

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

- Remplacer : L'utilisation d'animaux dans ce cadre ne peut être remplacé, en effet les modèles in vitro ne permettent pas de mimer la complexité du système immunitaire dans ce modèle.

- Réduire : Le nombre d'animaux par groupe est réduit au nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Le nombre de groupes a été réfléchi de sorte à avoir les contrôles suffisants pour pouvoir conclure quant aux résultats obtenus.

-Raffiner : Les animaux atteignant une perte de poids de 20% par rapport à leur poids initial seront euthanasiés, ainsi que les animaux montrant des signes physiques caractéristiques d'un mal être tel qu'un changement de comportement. Durant le protocole, les animaux seront suivis pour leur poids, le développement des symptômes de l'APECED (vitiligo, alopecie et dystrophie onguulaire).

Tous les animaux traités et ceux des groupes contrôles seront analysés afin d'en obtenir un maximum d'information post mortem. De plus, afin d'améliorer leurs conditions de vie et d'éviter l'angoisse, des produits d'enrichissement sont placés dans la cage (rouleur de carton et paper wool). Dans l'ensemble de ce projet 80 rats seront utilisés, toutes souches et génotypes confondus. Grâce à ce "n", les résultats obtenus dans chaque procédure pourront être statistiquement significatifs.

18973 Certaines maladies génétiques rares sont causées par des mutations sur des gènes régulateurs de ce que l'on appelle les voies de signalisation intracellulaires. Ces voies de signalisation permettent aux cellules de percevoir les informations sur leur environnement (facteur de croissance, hormone, cellules voisines, nutriments, oxygène...) et de modifier leur comportement (prolifération, différenciation, migration, métabolisme...) afin de s'adapter aux conditions extérieures. Ces processus sont essentiels au cours du développement et dans le maintien de l'homéostasie. En conséquence, leur dérégulation suite à une mutation génétique est à l'origine de nombreuses anomalies, notamment des malformations congénitales, des défauts de croissance ou des dysfonctions endocriniennes ou métaboliques, certaines pouvant avoir des conséquences dramatiques en l'absence de traitement efficace.

Si la plupart des mutations génétiques responsables de ces syndromes ont été identifiées, on ne sait souvent pas comment elles induisent les différents symptômes de ces maladies. Pourtant, comprendre les dysfonctionnements provoqués par ces mutations constitue une étape clé pour identifier des cibles thérapeutiques.

Les travaux des dernières années ont montré que des souris génétiquement modifiées, portant certaines mutations responsables de ces maladies génétiques (souris Knock In), développent l'ensemble des traits cliniques associés à ces syndromes. Ces souris représentent donc le modèle le plus proche qu'il existe des syndromes humains, offrant ainsi une opportunité unique pour mieux comprendre la physiopathologie de ces maladies, ce qui ne peut être abordé que dans un modèle physiologique intégré (principe de remplacement).

Les objectifs de ce projet seront donc de caractériser 2 modèles murins d'un syndrome polymalformatif associant notamment des anomalies cardiaques et squelettiques et des dérégulations endocriniennes et métaboliques, de déterminer les mécanismes moléculaires sous-jacents, et d'évaluer comment les dysfonctions identifiées participent au développement ou à l'aggravation des principaux symptômes post-nataux de ces maladies. Cela permettrait de proposer des candidats pour des thérapeutiques ciblées.

Compte tenu de la variabilité des paramètres biologiques généralement observée au sein d'un groupe homogène et de la durée des protocoles, des groupes de 8 animaux seront formés afin de pouvoir mettre en évidence des différences statistiques (principe de réduction). La réalisation de l'ensemble du projet rendra nécessaire l'utilisation de 1848 animaux sur une durée de 5 ans.

Les procédures seront réalisées dans le respect du bien être animal, sous anesthésie et analgésie lorsque nécessaire pour limiter la souffrance, la douleur ou l'angoisse des animaux, et en respectant des points limites préalablement définis (principe de raffinement).

18974 Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme en France. Il persiste un besoin important d'améliorer la prise en charge afin de diminuer le risque de récurrence et ainsi diminuer le risque de décès lié au cancer du sein. L'immunothérapie est un des traitements du cancer. L'immunothérapie agit en favorisant la réponse immunitaire du patient vis-à-vis du cancer. Il existe plusieurs types et sous-types de cancers du sein dont certains sont peu immunogènes et répondent donc moins bien à l'immunothérapie.

Les Ultrasons focalisés de haute intensité ont montré leur efficacité pour augmenter l'accumulation de cellules immunitaires dans l'environnement tumoral.

Ainsi l'hypothèse de notre travail est que l'utilisation d'ultrasons focalisés sur les cancers du sein peu immunogènes permettra d'augmenter l'infiltrat de cellules immunitaires dans l'environnement tumoral et de potentialiser l'efficacité de l'immunothérapie par inhibition de récepteurs.

L'objectif est de vérifier cette hypothèse sur des modèles précliniques murins.

Les ultrasons thérapeutiques sont aujourd'hui utilisés en clinique pour le traitement du cancer de la prostate et sont à l'étude comme traitement prometteur de nombreuses autres tumeurs solides. Ils présentent l'avantage d'être non invasifs et bien tolérés. Ils ne peuvent cependant pas être utilisés pour traiter de manière généralisée, et particulièrement les métastases à distance, première cause de mortalité. Ces traitements par ultrasons focalisés de haute intensité (HIFU) reposent sur une focalisation d'un faisceau d'ondes ultrasonores pour concentrer l'énergie dans une zone, dont la taille typique est similaire à celle d'un grain de riz. Dans cette région très localisée, il est possible d'induire des effets thermique ou mécanique afin de détruire les cellules tumorales. Des travaux récents ont montré que les HIFU pourraient avoir une action locale et généralisée sur la réponse immunitaire anti-tumorale.

L'hypothèse de travail est ainsi qu'il est possible d'induire une stimulation de la réponse immunitaire anti-tumorale par un traitement ultrasonore et que cette stimulation pourrait se traduire par une action généralisée et potentialiser les immunothérapies. Des résultats préliminaires ont montré qu'une combinaison d'ultrasons focalisés et d'immunothérapies menaient à un meilleur contrôle de la croissance tumorale et à une meilleure survie sur un modèle murin. L'objectif de cette étude est maintenant de montrer l'efficacité d'une telle combinaison de traitement sur des tumeurs peu immunogènes et de caractériser cette réponse immunitaire. Pour répondre à cet objectif, l'étude s'articule en 3 différentes étapes : optimiser les paramètres d'ultrason (procédure 1), évaluer l'efficacité clinique d'une telle combinaison (procédure 2), vérifier l'impact de l'immunothérapie et des ultrasons seuls (procédure 3).

La démarche 3R (Remplacement, réduction, raffinement) est appliquée : l'emploi de modèles in vivo est obligatoire car il s'agit d'étudier la réponse immunitaire due au traitement, impossible à reproduire in vitro ; le nombre d'animaux sera réduit à minima : nombre total de 300 souris pour 19 lots. Cependant, des études statistiques au cours des protocoles seront effectuées et ceux-ci s'arrêteront dès que des résultats significatifs seront obtenus. Plusieurs modèles de tumeurs murines seront étudiés mais au fur et à mesure des protocoles si un des modèles est jugé non concluant alors ce modèle sera écarté pour le reste de l'étude. Ceci aura pour but de réduire au minimum le nombre d'animaux. Une définition précise des points limites a été effectuée et ceux-ci seront surveillés régulièrement, contribuant au bien-être animal. L'environnement et l'habitat dans lequel évolueront les souris seront optimisés (nombre de souris par cage, ajout de cotons, ...) et toutes les précautions nécessaires seront prises afin que nos animaux soient le moins stressés possibles. Les traitements seront effectués sous anesthésie gazeuse et traitement antalgique afin de limiter au possible le stress ou une possible douleur. Après une greffe tumorale, les souris seront traitées deux à trois fois par semaine, un traitement ultrasonore suivi d'un traitement d'immunothérapie associé ou non à un traitement par chimiothérapie ou par hormonothérapie, sous anesthésie générale, sur une durée maximale de 60 jours. L'évaluation de l'efficacité de traitement, chez ces souris, sera étudiée via le suivi de la croissance tumorale et le taux de survie.

18975 La diminution progressive de la masse musculaire observée au cours du vieillissement, associée à une perte d'autonomie avec l'âge, représente un enjeu majeur de santé publique. La protéine d'intérêt, appelée ici T, est liée au vieillissement cellulaire. En effet, cette protéine protège une partie de l'ADN. Cependant, la quantité de cette protéine diminue avec l'âge, ceci a déjà été observé chez l'homme, la souris, le poisson, entre autres. Son rôle est bien décrit pour des cellules qui se renouvellent rapidement. Cependant, sa fonction reste inconnue dans des tissus à renouvellement lent ou presque inexistant, tels que le muscle squelettique et le cerveau. Une lignée de souris dans laquelle T a été supprimée dans le muscle squelettique a été créée. Des résultats préliminaires suggèrent que les souris femelles déplétées de T ont une résistance supérieure à des tests de force musculaire, ainsi qu'une prolongation de la longévité.

L'objectif est de compléter ces données sur un effet bénéfique de la suppression dans le muscle de la protéine T.

Pour répondre à la question, 3 lignées seront utilisées : la lignée dans laquelle la protéine T est supprimée dans le muscle et deux lignées contrôle.

10 souris par groupe seront nécessaires (mâles et femelles pour chaque lignée, donc 6 groupes en tout) afin d'obtenir des résultats fiables. Cette expérimentation sera donc effectuée sur $6 \times 10 = 60$ souris.

Ces souris seront suivies de façon rapprochée à partir de 15 mois avec une pesée par mois jusqu'à l'âge de 18 mois, auquel la fréquence des pesées sera augmentée à une fois par semaine, et à nouveau augmentée à deux pesées par semaine à partir de 24 mois. Cette fréquence de suivi sera, durant tout le protocole, adaptée individuellement selon l'état de santé de chaque animal.

Des prélèvements de muscles seront effectués sur ces souris à l'atteinte des points limites afin de compléter les résultats préliminaires.

Aucun geste expérimental ne sera effectué sur ces souris, il s'agit d'un protocole d'observation du vieillissement, avec un suivi rapproché du bien-être de ces animaux.

Pour limiter l'impact du vieillissement sur le bien-être animal, la règle des 3Rs sera appliquée:

-Raffinement: pour limiter l'impact du vieillissement, un suivi strict et régulier des animaux sera mis en place grâce à l'utilisation d'une grille de score qui définit des points limites clairs, précis et précoces.

-Réduction: pour réaliser ce projet en 5 ans, un maximum de 60 animaux sera utilisé. Le nombre de souris utilisées dans ce projet a été déterminé afin d'obtenir des résultats statistiquement robustes.

Le projet se base sur des résultats scientifiques obtenus in vitro sur des cellules musculaires humaines (remplacement). Cependant, le processus physiologique du vieillissement ne peut pas être réalisé, à l'heure actuelle, sur des cultures cellulaires.

18976 Le projet proposé ici s'inscrit dans un programme de recherche dont l'objectif est de comprendre les mécanismes neurophysiologiques qui permettent de capturer du regard un objet visuel stationnaire ou en mouvement. En amenant l'image de l'objet sur la région de la rétine qui nous dote de la plus grande acuité visuelle (la fovéa), l'orientation du regard entraîne une analyse visuelle plus fine de l'objet ou le déclenchement de sa poursuite s'il est en mouvement. La réaction d'orientation permet aussi de localiser les objets, les uns par rapport aux autres et par rapport au corps. Elle commence par un mouvement extrêmement rapide (la saccade) des deux yeux, qui est parfois accompagné d'un mouvement conjoint de la tête. Un mouvement plus lent (réflexe ou volontaire) prend ensuite le relai et stabilise l'image de l'objet sur la rétine.

Le projet sera conduit chez le singe macaque rhésus car cet animal possède des systèmes visuel et moteur oculaire très similaires de ceux de l'Homme sur les plans morphologique (fovéa, vision binoculaire) et fonctionnel (champ oculomoteur étendu, capacités de découplage oculo-céphalique et de poursuite oculaire lisse). Le recours à une expérimentation chez l'animal est inévitable car l'objectif de mes recherches est une compréhension neurophysiologique, c'est-à-dire de caractériser comment les interactions entre assemblées neuronales permettent à un organisme animal de s'orienter dans son environnement externe. Les mouvements d'orientation oculaire et céphaliques produits en réponse à l'apparition de cibles visuelles sont enregistrés par une technique qui est basée sur le principe d'induction électromagnétique. Deux procédures expérimentales sont alors mises en œuvre. La première consiste à provoquer expérimentalement des dysfonctionnements localisés au niveau de territoires neuronaux bien spécifiques afin de comprendre leur place dans la neurophysiologie des fonctions d'exploration du milieu extérieur et ainsi déterminer spatialement (où précisément dans le cerveau) et temporellement (à quel moment) la symptomatologie qui affecte certains patients cérébro-lésés. Ces dysfonctionnements sont réalisés de deux manières : soit par injection locale d'un agent pharmacologiquement actif, soit par microstimulation électrique à très bas courant. La seconde procédure expérimentale consiste à étudier les propriétés électrophysiologiques des neurones situés dans les territoires en question à la lumière des désordres provoqués par leur dysfonctionnement.

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

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

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

18977 La prématurité est la principale cause de décès et de handicaps chez les nouveau-nés. Dans les pays industrialisés, en raison de l'amélioration des soins intensifs néonataux, le nombre des nourrissons de très faible poids de naissance qui survivent au delà de l'enfance est en hausse. Cependant, le cerveau de ces prématurés reste extrêmement fragile.

La substance blanche du cerveau est le tissu constitué par les axones des neurones. C'est dans ces axones, entourés d'une gaine de protéine appelée myéline, que le signal nerveux circule. Les lésions diffuses de la substance blanche (LSB) constituent la principale forme de lésion cérébrale du prématuré. Les LSB sont majoritairement la conséquence de la présence d'une inflammation, qui peut être induite par différentes causes, par exemple une infection, pendant la fin de la grossesse et dans les jours suivant la naissance (période périnatale). Ce stress inflammatoire périnatal, subi par une grande majorité des enfants prématurés, atteint les cellules cérébrales qui sont encore en développement, et donc particulièrement vulnérables. Les LSB induisent des handicaps moteurs, des déficits cognitifs et des troubles comportementaux qui persistent à l'âge adulte. Malheureusement, aucune thérapie spécifique de ces lésions diffuses n'existe à ce jour. L'amélioration du pronostic de cette pathologie repose donc sur la découverte de nouvelles stratégies neuroprotectrices. Les objectifs de ce projet visent à tester les effets potentiellement thérapeutiques des cellules souches mésenchymateuses humaines (HuMSCs), qui sont des cellules immunitaires capables d'agir sur la réparation et la régénération des tissus, dans les lésions cérébrales induites par la neuroinflammation. Pour cela, nous utiliserons un modèle de LSB induites chez le raton par des injections intra-péritonéales d'interleukine 1 beta (IL-1B), une molécule qui induit l'inflammation. Ce modèle reproduit la pathologie humaine de l'enfant prématuré. Après avoir déterminé les meilleures doses et voie d'administration des HuMSCs (intra-nasale vs intra-veineuse), leur présence dans les différents organes, leurs effets spécifiques sur des cellules du cerveau (structure, activation, métabolisme, prolifération), sur le fonctionnement des vaisseaux sanguins, et sur le comportement des animaux seront analysés.

Ce projet respecte la règle des 3R :

Remplacement : une partie des travaux de ce projet sera réalisée in vitro sur des cultures cellulaires. Le remplacement total des analyses in vivo par des stratégies in vitro n'est cependant pas envisageable actuellement, car les mécanismes impliqués dans les LSB mettent en jeu l'interaction de plusieurs types cellulaires au cours du développement cérébral qu'il est impossible de reproduire en culture. Il est donc indispensable d'associer, aux études in vitro, des études chez l'animal soumis à un stress inflammatoire qui reproduit les LSB.

Réduction :

Il n'y a pas eu de mortalité ni d'inconfort des animaux lors d'expériences préliminaires avec une faible dose d'IL-1B, mais ces 1ers tests n'ont pas permis d'explorer la survenue de LSB ni les effets à long terme. L'étude prévoit donc de déterminer la dose d'IL-1B induisant l'apparition de LSB

(définies par une présence de myéline anormalement basse) à 3 semaines, avec des signes d'inconfort limités (apparence de la peau et respiration normales, prise de poids non inférieure à 10% par rapport au poids moyen de la portée) et une mortalité \leq 5%. Cet objectif de faible mortalité permet de prévoir un nombre d'animaux limité par groupe pour la suite de l'étude mais suffisant pour la réalisation d'analyses statistiques. Le nombre d'animaux par groupe est adapté au risque de mortalité (plus élevé en cas d'administration d'IL-1B et d'injection intra-veineuse) et à la variabilité du paramètre mesuré. Pour les analyses biologiques, on comptera n=6 rats par groupes, +1 (n=7) pour les groupes recevant l'IL-1B, +2 (n=8) pour les groupes recevant l'IL-1B et les HuMSCs en intra-veineux. Chaque paramètre biologique sera mesuré dans des groupes recevant l'IL-1B et les HuMSCs (plusieurs doses et 2 voies d'administration), comparés aux groupes contrôles « IL-1B seul » (1 groupe), et « HuMSCs seules » (plusieurs doses et 2 voies d'administration). Pour l'analyse du fonctionnement des vaisseaux sanguins du cerveau, on comptera n=15 rats par groupes, +2 (n=17) pour les groupes recevant l'IL-1B, +2 (n=19) pour les groupes recevant l'IL-1B et les HuMSCs en intra-veineux. Ce nombre peut être augmenté à cause de l'instabilité du signal, qui nécessitera éventuellement une duplication de chaque groupe. Pour l'analyse comportementale, tous les tests seront successivement réalisés sur les mêmes animaux, avec 2 séries de 20 animaux (n=40) prévues par groupe, +2 (n=44) pour les groupes recevant l'IL-1B, +4 (n=48) pour les groupes recevant l'IL-1B et les HuMSCs en intra-veineux. Toutes les mesures (biologiques, vasculaires, comportementales) seront effectuées à plusieurs temps (de 12h à 6 semaines) après administration d'IL-1B et d'HuMSCs, et porteront au total sur 1123 rats au maximum, sur 5 ans, mais la détermination de la dose et de la voie d'administration des HuMSCs en début d'étude permettra de définir ces critères (1 dose et 1 voie ou 2 voies combinées) pour la suite de l'étude, et donc de réduire le nombre total d'animaux utilisés.

Raffinement : l'injection intra-nasale, non-invasive, et les injections intra-péritonéales seront pratiquées sur animal éveillé par du personnel entraîné. L'injection intra-veineuse sera réalisée sous anesthésie. La surveillance des animaux sera quotidienne. Les critères de scores adaptés à l'âge des animaux (P1-P7 : cyanose, déshydratation, respiration anormale, absence de prise de poids ; P7-P22 : cyanose, déshydratation, poil ébouriffé, respiration anormale, absence de prise de poids ; après P22 : déplacements dans la cage, cyanose, déshydratation, poil ébouriffé, respiration anormale, absence de prise de poids) seront relevés quotidiennement ou 2 fois par semaine pour identifier l'atteinte de points limites. En cas de prise de poids insuffisante (avant sevrage), ou de faible activité dans la cage (après sevrage), une réhydratation (sérum physiologique en sous cutané) sera mise en place. Les mesures de fonction des vaisseaux sanguins seront réalisées sous anesthésie. Tout signe de souffrance fera l'objet d'une surveillance allongée d'une heure pendant la phase de réveil. Tout signe de souffrance au-delà d'une heure constituera un point limite. seuls les animaux qui ne présentent aucun signe de souffrance et reprennent une activité normale seront replacés dans leur cage

En cas d'atteinte des points limites, l'animal sera euthanasié.

A l'issue de toutes les procédures, les animaux seront euthanasiés pour prélèvements et analyses biologiques.

18978 Introduction : La thrombose veineuse profonde (TVP) est une maladie fréquente, associée à un risque d'insuffisance veineuse sévère, dénommée syndrome post-thrombotique (SPT). Ces dernières années ont vu émerger des techniques de recanalisation de la veine ayant pour but de prévenir le SPT, sans traitement systémique afin d'éviter un risque hémorragique. L'histotripsie est une technique ultrasonore récente, permettant de fragmenter de tissus biologiques à distance, grâce à un transducteur externe. Appliquée à la veine thrombosée, cette technique non invasive, locale, rapide, ne nécessitant pas de traitement systémique peut permettre la destruction du thrombus (appelée thrombotripsie) en de petits fragments, sans altération des tissus. Afin de permettre le développement de ce nouveau dispositif externe de recanalisation veineuse, il convient de s'assurer de la sécurité du dispositif.

Objectif : Du fait de la rigidification progressive de la thrombose au cours du temps, nous souhaitons évaluer la capacité du dispositif à recanaliser une thrombose plus ancienne, se rapprochant plus de

la maladie humaine. L'objectif principal est la validation du dispositif de thrombotripsie en termes d'efficacité et de sécurité à l'aide d'un modèle animal avec une anatomie vasculaire comparable à celle de l'homme

Méthodes : Sous anesthésie générale profonde, une thrombose de la veine fémorale sera réalisée par voie endovasculaire. Après confirmation d'une thrombose occlusive, les porcs seront suivis 14 jours sous anticoagulation efficace. A 14 jours, la thrombose sera réévaluée, et une thérapie par thrombotripsie sera effectuée dans un groupe (16 porcs) et ne sera pas traitée dans le groupe contrôle (16 porcs). Puis au terme d'un second suivi de 14 jours, au cours d'une 3ème procédure une phlébographie et une échographie-doppler seront réalisées sous anesthésie générale profonde sur l'animal afin d'évaluer la perméabilité de la veine fémorale à distance pour le groupe traité et le groupe contrôle. Les animaux seront ensuite tous euthanasiés par surdosage anesthésique à la fin de la procédure. Le critère principal d'efficacité est le taux de perméabilité de la veine fémorale chez les porcs traités à J28.

Résultats attendus : Cette étude permettra de valider l'efficacité et la sécurité de ce dispositif sur des thromboses veineuses profondes de 14 jours à l'aide un modèle animal avec une anatomie vasculaire comparable à celle de l'homme.

Paragraphe des 3 R :

Afin de limiter le plus possible la souffrance et l'angoisse des animaux, les procédures se dérouleront sous anesthésie générale profonde avec une analgésie préopératoire. Au cours du suivi, l'analgésie sera adaptée quotidiennement par le vétérinaire en charge du projet. Durant cette période, l'analgésie sera adaptée quotidiennement par le vétérinaire avec surveillance des points limites.

Dans l'objectif de suivre la règle des 3R, et donc de réduire le nombre d'animaux utilisés, nous évaluons à 32 (16 porcs par groupe) le nombre total de porcs nécessaires. Ce nombre est le nombre minimal de porcs nécessaire pour établir une comparaison statistique entre les porcs traités et non traités en tenant compte du modèle. Il s'agit d'une augmentation de 18 porcs par rapport au projet initial, qui a permis d'obtenir des résultats encourageants mais insuffisants du fait de la difficulté de la création du modèle. Pour ce travail, seul un modèle de gros animal pouvait convenir du fait de la nécessité d'un calibre de veine accessible de plus de 2 mm, d'où l'utilisation d'un modèle porcin indispensable déjà validé pour la thrombose aiguë, limitant ainsi l'utilisation d'animaux pour la création d'un nouveau modèle.

Le raffinement est obtenu par l'utilisation de points limites validés avec l'animalerie, et dédiés pour les procédures sous anesthésie générale ainsi que pour le suivi (surveillance du comportement, respiration, mobilité, posture et plaies éventuelles de l'animal).

Ce travail permettra de valider l'efficacité et l'innocuité du dispositif ultrasonore non invasif de recanalisation veineuse dans la perspective d'un développement clinique novateur de la prise en charge de la thrombose veineuse profonde chez l'homme.

18979 Depuis une centaine d'années, l'étude de souris en laboratoire a permis de nombreuses avancées scientifiques, notamment concernant la génétique des mammifères. De nombreuses connaissances sont disponibles sur les génomes de ces rongeurs, ils sont génétiquement très similaires à l'être humain, et ont une reproduction rapide, sans saisonnalité. Le transfert d'embryons chez la souris est une méthode de procréation assistée (destinée à favoriser la gestation) qui consiste à transplanter un embryon issu d'une femelle appelée donneuse dans l'utérus d'une femelle dite receveuse par voie chirurgicale. Pour qu'une femelle receveuse soit gestante après un transfert embryonnaire, il faut nécessairement qu'elle soit pseudogestante au moment du transfert, c'est à dire être prédisposée d'un point de vue hormonal à avoir une gestation. Cet état physiologique particulier est obtenu après un accouplement avec un mâle rendu stérile suite à une vasectomie. La vasectomie quant à elle, est une opération chirurgicale qui consiste à couper les canaux déférents qui transportent les spermatozoïdes à partir des testicules. Après cette opération, les mâles stériles gardent une libido normale et s'accouplent normalement. La stérilisation par vasectomie est définitive.

Nous proposons dans ce projet pilote d'étudier deux méthodes alternatives destinées à remplacer ces deux actes chirurgicaux :

- La première qui vise à remplacer à terme la vasectomie chez les mâles. Elle consiste à injecter à une souris mâle une molécule (médicament utilisé contre le cancer chez l'Homme) qui va induire la disparition des spermatozoïdes, qui sont les cellules reproductrices. Cet animal devenu stérile gardera sa libido et pourra s'accoupler normalement. Cette stérilisation est temporaire, une période d'environ 20 semaines après l'injection du médicament permet à la souris de retrouver une fertilité normale.

- La seconde permet de remplacer la procédure chirurgicale nécessaire à la réimplantation classique d'embryons chez la souris. Elle consiste à réimplanter chez la souris, grâce à un cathéter, des embryons dans l'utérus de la femelle receveuse par la voie vaginale en s'inspirant de ce qui est pratiqué chez la femme lors d'un transfert d'embryons. Nous utiliserons pour ce projet une canule commerciale prévue pour cet usage chez la souris, en plastique souple, et dont l'extrémité est émoussée pour éviter toute altération de l'intégrité du tissu vaginal ou utérin. La canule est légèrement courbée pour s'adapter au mieux à l'anatomie de la souris. Cette méthode de transfert dure moins d'une minute et génère peu ou pas de souffrance a priori, ce qui sera évalué dans le présent projet.

Ces deux nouvelles approches proposent donc deux alternatives aux procédures invasives classiquement utilisées chez la souris, avec l'objectif de minimiser le désagrément causé aux animaux, en substituant les procédures chirurgicales, par des procédures moins invasives.

Ce projet nécessitera un nombre maximum de 52 souris sur deux ans. Ce chiffre est basé sur notre expertise concernant le pourcentage de réussite des transferts embryonnaires par voie chirurgicale. Il tient compte de l'effectif total d'animaux nécessaires pour cette demande de projet, à savoir les mâles qui seront stérilisés, les femelles qui permettront d'obtenir les embryons à réimplanter et les femelles receveuses.

Nous appliquerons une surveillance quotidienne de ces animaux depuis l'injection de la molécule chez le mâle et du transfert embryonnaire jusqu'à la naissance des souriceaux chez les femelles. Nous respecterons des points limites définis au-delà desquels la douleur, la détresse et/ou l'inconfort doivent être arrêtés, minimisés ou réduits soit en euthanasiant l'animal selon la réglementation en vigueur, soit en arrêtant l'intervention si elle semble douloureuse, soit en administrant un traitement visant à soulager la douleur ou la détresse, si c'est applicable en concertation avec la personne en charge du bien-être animal, ou encore en restaurant les exigences de base (comme remettre un animal isolé en hébergement de groupe par exemple). Les femelles receveuses auront à disposition dans les cages, du matériel adapté pour fabriquer un nid comme des boules de coton, afin que la mise bas de ces animaux se passe dans les meilleures conditions possibles. Les mâles auront des buchettes de bois pour qu'ils puissent les ronger. Tous les animaux auront un accès permanent à l'eau et à la nourriture. Les paramètres d'élevages comme la température, l'hygrométrie, la durée de l'éclairage et l'intensité lumineuse sont constants et sont contrôlés régulièrement.

Si les objectifs de cette étude sont atteints et montrent que :

- la gestation des femelles receveuses se déroule normalement en utilisant la voie vaginale de la souris pour réimplanter des embryons, cette dernière sera mise en place dans notre laboratoire et remplacera le transfert embryonnaire par voie chirurgicale. Ces souris receveuses pourront alors être utilisées par la suite pour d'autres protocoles de gestations alors qu'elles ne peuvent plus l'être lors d'un transfert par voie chirurgicale ;

- si la stérilisation chimique des mâles permet d'obtenir des animaux stériles pouvant s'accoupler normalement, cette méthode sera appliquée dans notre laboratoire et substituera la vasectomie par chirurgie. Les mâles serviront également pour d'autres protocoles d'accouplements nécessitant l'obtention de souris pseudogestantes, ou à des accouplements normaux après restauration de la fertilité ;

ces deux procédures seront alors appliquées pour tous les protocoles futurs nécessitant une réimplantation d'embryons en réduisant le nombre d'animaux nécessaire dans nos projets.

18980 L'obésité touche plus de 1,9 milliards d'adultes dans le monde. Elle se caractérise par une surcharge pondérale et favorise le développement de nombreuses complications, dont la dyslipidémie, l'insulino-résistance ou la stéatose hépatique qui impliquent le dysfonctionnement de nombreux organes.

Parmi les différentes possibilités thérapeutiques, les hormones thyroïdiennes présentent du potentiel. En effet, l'administration d'hormones thyroïdiennes chez l'homme ou la souris augmente la dépense énergétique des individus, menant ultimement à la perte de poids. Toutefois, elles ne peuvent pas être utilisées comme telles car elles régulent une multitude d'organes, ce qui résulterait en de la tachycardie et de l'ostéoporose, par exemple. Parmi les cibles métaboliques de ces hormones, le tissu adipeux brun suscite depuis des années bien des intérêts puisqu'il est capable de métaboliser les lipides et le glucose pour les transformer en chaleur dans un processus appelé thermogenèse. De cette manière, le tissu adipeux brun augmente l'élimination des lipides et du glucose ainsi que la dépense énergétique, rendant les animaux moins susceptibles à développer de l'obésité, du diabète ou de l'athérosclérose, par exemple.

Ce processus de thermogenèse est activé en conditions physiologiques après que les animaux se soient alimentés pour éliminer l'excès de calories ou lorsqu'ils sont exposés au froid afin que la production de chaleur les protège de l'hypothermie. Ce mécanisme est finement régulé par le système nerveux sympathique : le cerveau détecte le froid ou l'alimentation et déclenche la libération de norépinéphrine au niveau des terminaisons nerveuses qui innervent le tissu adipeux brun afin d'activer le processus de thermogenèse. Toutefois, si la signalisation thyroïdienne est perturbée dans le ce tissu, la thermogenèse est bien moins efficace, montrant l'importance des hormones thyroïdiennes dans ce processus. En effet, des souris hyperthyroïdiennes ont une plus grande activité du tissu adipeux brun et profitent ainsi des bénéfices métaboliques que présente ce tissu.

Alors qu'il était jusque-là pensé que les hormones produites par la glande thyroïde passaient par le compartiment sanguin pour aller jouer leur rôle directement dans le tissu adipeux brun, ce que l'on appelle l'action périphérique, des études récentes montrent que l'administration des hormones thyroïdiennes au niveau du cerveau des souris active directement le tissu adipeux brun, sans même qu'elles atteignent le tissu, on parle alors d'action centrale. Le cerveau serait alors la véritable cible de ces hormones, qui activerait les fibres nerveuses innervant le tissu adipeux brun pour induire la thermogenèse.

Cette découverte chamboule ce qui était précédemment établi mais reste encore controversée. A court terme, l'objectif de ce projet est donc d'arriver à distinguer la part de l'action centrale et celle de l'action périphérique des hormones thyroïdiennes, afin de tirer au clair les données contradictoires jusqu'alors publiées. A plus long terme, et avec les progrès de la pharmacologie, l'objectif sera de concevoir de nouvelles molécules ne stimulant que les activités métaboliques des hormones thyroïdiennes sur le tissu adipeux brun tout en s'affranchissant des effets secondaires néfastes.

Cette étude vise donc à décortiquer comment les hormones thyroïdiennes induisent le métabolisme du tissu adipeux brun et si cela dépend de l'action centrale et/ou périphérique. Pour cela, nous rendrons ce tissu insensible au système nerveux sympathique chez des animaux hypothyroïdiens via une chirurgie de dénervation chimique du tissu adipeux brun. Nous pourrons alors ensuite déterminer si l'administration des hormones thyroïdiennes est toujours capable d'activer aussi efficacement le tissu adipeux brun par rapport à des animaux dont la sensibilité de ce tissu au système nerveux sympathique est intacte. Le statut hypothyroïdien, l'injection d'hormones thyroïdiennes ou la dénervation chimique du tissu adipeux bruns sont des procédures déjà réalisées de nombreuses fois par le personnel en charge de l'expérimentation. Ainsi, l'expérience et le recul accumulés permettent d'affirmer qu'aucun effet indésirable ou néfaste n'est attendu sur les animaux.

Un nombre total de 64 souris sera utilisé pour l'accomplissement de ce projet. Le modèle murin présente de très nombreuses similarités avec l'Homme concernant comment les hormones thyroïdiennes et le tissu adipeux brun stimulent la dépense énergétique. Ainsi, comprendre comment les hormones thyroïdiennes stimulent ce processus chez la souris apportera de précises

indications sur les mécanismes présents chez l'Homme et pourront, à terme, être utilisés pour développer de nouveaux composés pharmacologiques afin de lutter contre l'obésité.

Ce projet sera réalisé selon le respect de la règle des 3R:

Remplacement :

Cette étude nécessite de manière incontournable l'utilisation d'animaux puisqu'elle vise à comprendre le rôle des hormones thyroïdiennes en présence ou non d'innervation nerveuse du tissu adipeux brun : cette réponse intègre une réponse physiologique multi-organes incluant le cerveau, une configuration qui ne peut être retrouvée que chez l'animal entier. De précédents tests au sein du laboratoire ont déjà été menés sur plusieurs modèles *in vitro* afin d'évaluer la pertinence de méthodes alternatives dans le cadre de ce projet. Aucune de ces alternatives n'a permis d'apporter de réponses claires ou pertinentes aux questions posées, nécessitant l'utilisation d'animaux en ultime recours.

Réduction :

Le nombre de souris a été calculé en fonction des précédentes expériences effectuées et du recul qu'elles ont apporté. Nous savons ainsi que ce nombre permettra d'obtenir des résultats statistiquement significatifs et de répondre aux questions scientifiques posées avec le nombre minimal d'animaux. Par ailleurs, si nous détectons des effets significatifs répondant aux questions avec moins d'animaux au cours de l'expérience, alors les animaux restants ne seront pas utilisés et aucune procédure ne sera réalisée sur ceux-ci afin de limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés.

Raffinement :

Les souris seront élevées et hébergées par groupe de 3-4 souris par cage en milieu enrichi pour favoriser la nidation (coton de nidation, bois à ronger). Les animaux seront observés quotidiennement afin de réagir le plus rapidement possible en cas de comportements ou de signes physiologiques anormaux. Une attention toute particulière sera apportée dans la surveillance des animaux après la chirurgie. En prévention de toute douleur éventuelle en regard de la chirurgie, des anti-inflammatoires seront administrés. Les procédures qui seront réalisées sont déjà largement maîtrisées par les personnes en charge de l'expérimentation animale, qui ont ainsi l'expérience et le recul nécessaire pour assurer le raffinement de cette expérimentation.

18981 Le sepsis est une pathologie aiguë qui entraîne la dysfonction de plusieurs organes. Cette dysfonction est suffisamment sévère pour mettre la vie d'un patient en danger. Le mécanisme du sepsis est lié à une réponse inflammatoire disproportionnée de l'hôte face à un agent infectieux. La physiopathologie du choc septique est une défaillance circulatoire responsable d'un défaut d'apport en oxygène aux cellules. En 2017, 49 millions de cas de sepsis ont été recensés dans le monde ce qui représente environ 20% de la mortalité globale.

Nous étudions une molécule novatrice qui joue un rôle majeur dans la protection de l'organisme contre l'activation excessive des globules blancs, des plaquettes et des cellules endothéliales (cellules qui tapissent l'intérieur de tous les vaisseaux sanguins). Ces activations excessives sont à l'origine des effets potentiellement mortels du sepsis.

Notre projet vise à étudier le potentiel thérapeutique de cette molécule dans le choc septique pour diminuer les effets délétères du sepsis et améliorer le pronostic des patients.

Nous prévoyons une durée de projet de 12 mois.

Nous utiliserons un modèle murin de choc septique par péritonite (infection intra-abdominale) qui est largement documenté dans la littérature. Une solution fécale sera préparée à partir de selles de souris, puis administrée par injection intra-abdominale dans les souris pour induire une péritonite bactérienne. Les souris du groupe expérimental recevront une injection sous-cutanée de la molécule étudiée en même temps que l'induction de la péritonite septique et les souris du groupe contrôle recevront un placebo (sérum physiologique). Un prélèvement sanguin par voie sous-mandibulaire sera réalisé juste avant l'induction de la péritonite sous anesthésie volatile. Nous prévoyons également un groupe de souris témoins (=sham) qui recevront une injection de la molécule étudiée

sans l'induction de la péritonite. L'analgésie sera assurée par l'injection sous cutanée de buprénorphine juste avant l'injection intra-abdominale des selles, puis toutes les 8 heures. Nous appliquerons du gel ophtalmique hydratant au niveau des yeux (dès l'apparition des sécrétions)

Le critère de jugement principal sera l'évaluation d'un score clinique de sévérité du sepsis établi de manière horaire pendant 24 heures. A 24 heures (ou avant selon la gravité du score de sévérité du sepsis), on procédera à l'injection intraveineuse lente du bleu d'Evans sous anesthésie volatile afin d'évaluer la perméabilité capillaire. Trente minutes après l'injection du bleu d'Evans, nous procéderons à un deuxième prélèvement de sang par voie sous-mandibulaire sous anesthésie volatile sans réveil de l'animal. L'Euthanasie se fera par dislocation cervicale sur les souris anesthésiées avec de l'isoflurane en surdose. Les critères de jugement secondaires seront l'étude de la perte de l'étanchéité de l'endothélium (couche de cellules tapissant l'intérieur des parois des vaisseaux) induite par le sepsis et le dosage des cytokines qui sont des molécules libérées par les cellules immunitaires en réaction à l'infection.

Le remplacement du modèle animal par un autre modèle n'est pas possible du fait que le sepsis polymicrobien est une pathologie multi-organes liée au passage des bactéries de l'intestin dans la circulation sanguine et qui ne peut être reproduite in vitro. Une analyse statistique a été effectuée afin de réduire le nombre d'animaux utilisés lors des expériences au minimum nécessaire. Le projet prévoit le recours à 70 souris (20 souris de mise au point du modèle de péritonite, 20 souris dans le groupe expérimental et le groupe contrôle, et 10 souris dans le groupe témoin). Afin de limiter l'angoisse, l'inconfort, le stress et la douleur, les expériences seront raffinées avec enrichissement des cages (des bûchettes de bois à ronger, des tunnels en carton pour se cacher et des filaments de papier kraft et du coton pour la nidation). Toutes les procédures (les prélèvements sanguins, l'injection sous-cutanée de la molécule et l'induction de la péritonite) seront réalisées sous anesthésie volatile. Les souris seront anesthésiées par inhalation d'isoflurane pendant les procédures. L'analgésie sera assurée par l'administration systématique d'une dose de morphinique (buprénorphine en sous cutané toutes les 8 heures) pendant toute la durée de la procédure (24 heures).

18982 Les progrès de la médecine ont permis une augmentation importante de notre espérance de vie. En contrepartie, les pathologies liées au vieillissement (cancers, diabète, faible renouvellement des tissus) peuvent diminuer la qualité de vie des personnes âgées. Une sénescence cellulaire et une inflammation chronique semblent contribuer à l'apparition de ces pathologies. Nos dernières études ont permis l'identification d'une protéine qui s'accumule avec l'âge dans certaines cellules de la peau. Nos études préliminaires, avec des cellules en culture, indiquent que cette protéine agit comme un régulateur qui favorise l'expression des gènes d'inflammation lorsque les cellules de la peau vieillissent.

Nous voudrions comprendre les fonctions physiologiques de cette protéine chez l'Homme et tester son rôle possible dans le développement d'un état d'inflammation chronique associé à des pathologies lors du vieillissement, point de départ éventuel au développement de nouveaux traitements. Pour cela, il est nécessaire de comparer l'inflammation et le vieillissement entre un modèle témoin et un modèle pour lequel le gène codant la protéine d'intérêt est invalidé. Seul un modèle animal est capable de rendre compte de la complexité de ces deux phénomènes. Comme il existe un modèle rongeur invalidé spécifiquement pour le gène codant la protéine d'intérêt, nous l'utiliserons pour notre étude. Tous les animaux proviendront d'élevages reconnus.

Dans ce projet, des prélèvements sanguins et d'organes seront réalisés sur les animaux, aux âges de 6, 12, 18, et 24 mois, afin de procéder à une batterie de tests biochimiques permettant de caractériser l'état physiologique des organes et le niveau des facteurs inflammatoires circulant dans le sang.

Nous prévoyons l'utilisation de 120 rongeurs de laboratoire pour cette étude, ce qui est un minimum nécessaire pour obtenir des analyses statistiques fiables.

Les animaux seront hébergés selon les règles en vigueur dans l'animalerie, conformes à la législation. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des

interventions sur les animaux. Par exemple, les animaux seront systématiquement anesthésiés avant un prélèvement sanguin. Leur état de santé sera surveillé tout au long de l'expérience, ce qui nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance. Des critères d'arrêt (poids des animaux, apparence, comportement) sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuelles pathologies. . Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie.

18983 La mesure de bioimpédance ('bio-electrical impedance analysis', BIA en anglais) caractérise l'impédance électrique d'un tissu, qui est liée à sa teneur en eau ainsi qu'à sa teneur en gras. Chez les poissons, la BIA est utilisée pour évaluer la 'condition' des individus et populations sauvages, en termes de teneur corporelle en eau et en gras, car la mesure est relativement simple à mettre en œuvre, peu coûteuse, et ne demande pas le sacrifice de l'animal. Cette technique a aussi été largement utilisée pour des applications médicales, en particulier pour caractériser l'évolution de l'état de santé de patients pour certaines conditions ou pathologies métaboliques. De nombreux travaux expérimentaux montrent que la BIA, et par extension la spectroscopie de bioimpédance (mesure de bioimpédance à différentes fréquences de courant électrique), est une mesure intégrative susceptible de refléter un grand nombre de processus biologiques qui affectent les teneurs en eau et en gras des tissus. Ces processus peuvent être à long terme tels que des variations de l'état nutritionnel ou reproductif, mais aussi à courte terme, par exemple les effets d'une variation de température corporelle ou de niveau d'activité physique. Il en résulte que l'exploitation de la mesure de bioimpédance dans un contexte d'écophysiologie et d'écologie des poissons requiert une meilleure compréhension, d'une part, des processus physiologiques qui peuvent influencer le signal et, d'autre part, des informations physiologiques que la mesure peut fournir. Des expérimentations sur des espèces modèles, en milieu contrôlé, sont nécessaires pour caractériser la variabilité de la mesure en termes d'intensité et de rapidité de réponse, en lien avec les processus biologiques, afin de pouvoir interpréter le plus justement possible la signature de BIA dans l'espace et le temps. Cela devrait permettre des innovations dans l'étude des populations sauvages, telles qu'une marque qui mesure l'impédance in situ le long des trajectoires des grands poissons pélagiques en haute mer.

L'objectif du présent projet est d'évaluer les effets de l'état nutritionnel (jeûne versus alimentation) sur la bioimpédance du muscle squelettique. L'espèce modèle est le bar (ou loup) *Dicentrarchus labrax*, une espèce emblématique en Méditerranée et importante dans la pisciculture.

Les protocoles suivent la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner):

- Remplacer: Il n'est pas possible remplacer des animaux pour ces études, qui impliquent l'évaluation des processus physiologiques qui peuvent influencer le signal de bioimpédance in vivo.
- Réduire: Le nombre d'individus utilisé (N = 310) est le minimum nécessaire afin de permettre des tests statistiques qui permettent une analyse des relations entre les mesures de BIA et l'état physiologique des individus qui composent les populations.
- Raffiner: Tout a été mis en place dans le cadre des procédures pour limiter la souffrance et le stress des animaux pendant les mesures de composition corporelle, par des procédures d'anesthésie optimale. En dehors de ces mesures, les poissons seront conservés dans la station de recherche en pisciculture, à des densités optimales, dans des bassins isolés des perturbations humaines, dans une salle avec photopériode programmée et illumination réduite. Pendant les phases d'alimentation, ça sera 'ad-libitum'. Les phases de jeûne, avec durée de 3 semaines, amènent à une perte de masse des loups mais des expériences précédentes indiquent qu'ils ne posent aucun risque pour leur santé.

18984 Le cancer du poumon, par manque de traitements efficaces, est la première cause de décès par cancer dans le monde. La découverte de nouveaux traitements représente donc un challenge majeur.

Les modèles de souris génétiquement modifiées (invalidées ou transgéniques), conçus pour développer des cancers imitant avec précision leurs homologues humains, sont devenus l'un des modèles les plus prometteurs, non seulement pour étudier la biologie tumorale pulmonaire mais aussi pour développer de nouveaux traitements. Dans le cancer du poumon non-a-petites-cellules, les mutations du gène KRAS se caractérisent par leur fréquence et la difficulté à élaborer des stratégies d'inhibition efficaces. Nous cherchons à identifier de nouvelles voies de signalisation interconnectées avec les voies KRAS. Nous avons identifié deux protéines de signalisation, PTPN13 et Syk, qui sont des suppresseurs de tumeurs (pour lesquels il n'existe malheureusement pas de drogues activatrices) également impliquées dans la régulation de la tumorigenèse des adénocarcinomes pulmonaires et dont nous avons montré dans des modèles de lignées cellulaires qu'elles présentent des interactions avec la signalisation de KRAS.

Nous avons l'intention de générer des nouveaux modèles de souris qui développent des tumeurs pulmonaires avec les mêmes caractéristiques génétiques retrouvées chez les patients (transgéniques KRAS activé et invalidées pour PTPN13 ou Syk). Elles nous permettront de valider l'importance de ces 2 protéines dans la régulation de l'agressivité des tumeurs mutés KRAS. En parallèle nous décortiquons dans nos modèles de lignées cellulaires les signalisations de KRAS de PTPN13 et de Syk afin d'identifier les protéines communes à ces voies de signalisation. Les protéines ainsi identifiées représenteront de nouvelles cibles thérapeutiques dont nous pourrions tester la pertinence dans nos modèles de souris.

Pour ce projet nous souhaitons utiliser 323 souris comme expliqué ci-après.

Ce chiffre, regroupe les deux parties du projet :

- établissement /caractérisation des nouveaux modèles de souris transgéniques;(2 ans)
- validation de nouvelles cibles thérapeutiques (3 ans)

Afin de respecter la règle des 3R :

Le nombre d'animaux a été déterminé afin de réduire au maximum leur nombre et de nous permettre de réaliser des études statistiques. L'utilisation d'imagerie médicale permet de limiter le nombre de souris en suivant l'évolution des tumeurs au cours du temps.

Toutes les hypothèses (Interférence entre les voies de signalisation PTPN13, Syk et KRAS ; cibles thérapeutiques) ont été ou seront préalablement testées sur des lignées de cellules cancéreuses pulmonaires humaines afin de n'inclure dans les tests in vivo que les cibles les plus prometteuses.

Afin d'améliorer les conditions de vie des souris, elles sont maintenues dans des cages tecniplast d'une superficie de 500cm². La litière est un mélange de litière et de copeaux de peuplier. L'enrichissement des cages se fait avec des briques de peuplier ou des carrés de cellulose.

Pour toutes les procédures nécessitant une immobilisation des souris celles-ci seront anesthésiées le temps de la procédure.

Les seuls prélèvements effectués sont destinés aux analyses anatomopathologiques et biochimiques, ils seront réalisés après euthanasie en fin d'expérimentation.

L'utilisation d'imagerie médicale permet de mesurer la croissance tumorale de manière précoce avant l'apparition de signes extérieurs de souffrance, un volume tumoral de 1000mm³ sera considéré comme point limite et les souris seront euthanasiées. Toutefois si les souris présentent des signes extérieurs de souffrance (perte de poids de 20% ou prostration et dos vouté ou perte des poils...) avant ce point limite elles seront euthanasiées.

18985 La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie auto-immune caractérisée par une synovite inflammatoire qui évolue par poussées, espacées par des périodes de rémission, aboutissant en quelques années à une invalidité aux conséquences socio-économiques lourdes. En l'absence de traitement permettant d'obtenir une rémission complète et définitive dans la PR, il est nécessaire de développer de nouvelles approches thérapeutiques. Notre équipe de recherche développe depuis plus de 20 ans de nouvelles approches d'immunothérapies pour cibler les cellules pathogènes de cette maladie. Nous testons actuellement une nouvelle approche thérapeutique, in vitro, ciblant ces cellules pathogènes productrices des anticorps pathogènes appelés ACPA pour

Anticorps spécifique des protéines citrullinées. Nous devons valider ces nouvelles approches thérapeutiques, in vivo, dans un modèle expérimental qui mime la pathologie humaine afin de proposer une thérapie chez l'homme. Pour cette validation pré-clinique, nous utiliserons des souris immunodéficientes (ID) qui permettent l'injection et/ou l'implantation de cellules humaines. Le nombre total d'animaux est de 298 souris ID qui seront soit, injectées en intra-péritonéal avec les cellules cibles, soit, greffées avec du tissu synovial. La douleur induite chez l'animal sera légère, sans phénotype dommageable attendu, correspondant à une simple injection ou une greffe sous-cutanée et le bénéfice sera grand puisqu'il permettra de valider une approche thérapeutique pour l'homme.

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

- Remplacement : Les stratégies utilisées dans ce projet ont été validées in vitro dans un premier temps afin d'optimiser chacun des paramètres et seules les stratégies efficaces in vitro seront testées pour une preuve de concept in vivo pour une application thérapeutique chez l'homme.

- Réduction : le nombre d'animaux a été calculé avec l'aide d'un logiciel permettant d'évaluer le nombre minimum nécessaire pour mettre en évidence des différences statistiquement significatives sur les paramètres à mesurer. Seules les molécules efficaces in vitro seront testées dans le modèle expérimental. Un suivi longitudinal des animaux greffés en mesurant le taux des anticorps dans le sérum permettra également de réduire le nombre d'animaux utilisés.

- Raffinement : toutes les mesures seront prises pour réduire la souffrance et le stress des animaux. La plupart des animaux seront rapidement euthanasiés après injection et ceux qui seront gardés sur plus long terme, seront observés quotidiennement pour rechercher tout signe de douleur et de stress grâce à une grille de score qui prend en compte de nombreux paramètres comportementaux et la perte de poids des souris. Un enrichissement des cages sera réalisé en utilisant des copeaux de litière et des igloos.

18986 La maladie de Parkinson (MP) ou la maladie d'Alzheimer (MA) présentent la caractéristique commune d'induire l'apparition progressive d'agrégats protéiques intracérébraux caractéristiques de chaque pathologie. Ainsi, la MP est associée à la présence d'agrégats protéiques intracellulaires (corps de Lewy) formés pour une grande part d'alpha-synucléine. La MA est caractérisée par l'apparition progressive de deux types de lésions : des dépôts extracellulaires d'amyloïde beta (plaques amyloïdes) et des agrégats intracellulaires de protéine tau hyperphosphorylée appelés dégénérescences neurofibrillaires ou « tangles ».

Il a été proposé que ce processus d'agrégation pourrait être un mécanisme de neuroprotection assez ubiquitaire pour séquestrer dans des agrégats « inertes » des espèces chimiques plus toxiques (oligomères) formées lors de l'évolution de ces maladies. Cependant, au fur et à mesure de l'évolution de la maladie, et sous l'effet combiné du vieillissement cellulaire, ces agrégats protéiques deviendraient eux-mêmes toxiques pour les cellules qui les hébergent.

Dans ce contexte, il est déterminant d'identifier le rôle joué par ces agrégats protéiques dans l'apparition des symptômes associés à ces pathologies, d'étudier si leur accumulation chez l'animal induit des déficits et si des stratégies visant à faciliter leur disparition (immunothérapies, par exemple) pourraient avoir un effet thérapeutique.

Si les modèles animaux existants tel que le rongeur permettent de mimer certaines des lésions caractéristiques de la MA et de la MP, ils ne récapitulent pas complètement l'apparition des symptômes caractéristiques, en particulier cognitifs, associés à ces maladies. Cela pourrait être dû à l'organisation anatomique particulière du cerveau humain qui jouerait un rôle important dans l'expression comportementale de ces lésions. Il est donc indispensable de disposer d'un modèle animal phylogénétiquement proche de l'être humain pour étudier l'impact fonctionnel de l'accumulation excessive de protéines aberrantes dans le cerveau.

Des observations récemment publiées décrivant le caractère « infectieux » de certaines protéines impliquées dans la MP et MA rendent maintenant possible le développement de nouveaux modèles chez le primate non-humain (PNH) : ceux-ci seraient capables à la fois de mimer le processus

d'agrégation protéique caractéristique de chacune de ces pathologies et également d'induire l'apparition de troubles moteurs et cognitifs très similaires à ceux observés chez les patients.

D'une part, l'utilisation du modèle PNH permettrait ainsi un suivi sur une longue durée des effets de différentes stratégies d'agrégation protéique sur le comportement moteur et cognitif. D'autre part, il permettrait l'évaluation sur une longue durée de l'évolution des lésions en utilisant de manière combinée deux techniques non-invasives, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et l'imagerie par émission de positons (TEP).

Les modèles de maladies neurodégénératives permettront ainsi d'évaluer in vivo la pertinence de radiotraceurs TEP existants ciblant les protéines d'intérêt et la spécificité de nouveaux radiotraceurs. Cette spécificité pourra être confirmée post-mortem chez le PNH avant une utilisation chez le patient en clinique.

L'objectif de ce projet est donc double. D'une part, il s'agit de générer des modèles PNH de maladies neurodégénératives, capables d'induire l'apparition progressive des agrégats, caractéristiques de chacune de ces pathologies (Parkinson, Alzheimer). Pour cela, différentes approches telles que l'utilisation de vecteurs viraux pour surexprimer localement des gènes codant pour ces protéines mutées ou l'injection de protéines extraites de cerveaux de patients malades ou encore des protéines de synthèse conçues in vitro (mimant les protéines isolées chez les patients) seront testées et comparées en utilisant également différentes voies d'administration (intracérébrale, intrathécale).

D'autre part, l'évolution des agrégats protéiques dans chacun de ces modèles sera suivie in vivo par imagerie anatomique (IRM) et fonctionnelle (TEP) et mis en relation avec l'évolution des déficits moteurs et cognitifs, observés en parallèle lors de tests spécifiques déjà validés. Des nouveaux radiotraceurs TEP seront caractérisés en termes de spécificité sur ces modèles animaux. D'où le fort caractère translationnel des recherches proposées et leur impact pour l'humain.

Ce projet prévoit l'utilisation d'un maximum de 12 macaques adultes mâles et femelles par an (sur 5 années) soit au total 60 animaux. Le recours à l'animal est nécessaire, car aucun milieu de culture ou système synthétique ne permet aujourd'hui d'évaluer ces effets physiologiques. Les PNHs étudiés dans le cadre de ce projet sont nés et élevés en captivité, dans des élevages reconnus. Leur nombre a été réduit au minimum nécessaire pour obtenir des données significatives afin d'évaluer l'effet de la délivrance de protéines pathologiques et la spécificité de plusieurs radiotraceurs dans le cerveau de l'animal après administration de ces protéines pathologiques.

En résumé, le choix d'un modèle, espèce proche de l'humain, s'explique par la complexité anatomique de son cerveau qui offre la possibilité d'évaluer les fonctions motrices et cognitives, en utilisant des échelles et tests de comportement non-douloureux et non-invasifs, très comparables, et pour certains semblables, à ceux utilisés sur l'humain en clinique. De même, la résolution des images IRM et TEP des équipements disponibles dans notre laboratoire permet d'appliquer le même suivi sur une longue durée chez l'animal et de disposer d'index prédictifs de la progression des maladies neurodégénératives avant et après traitement, similaires à ceux qui permettraient l'évaluation de traitements thérapeutiques chez le patient. Cela permet aussi de suivre le même animal dans le temps et de réduire le nombre total d'animaux nécessaire au suivi de la progression de la pathologie. Les procédures expérimentales de ce projet ont un degré de sévérité « modéré ». Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par le vétérinaire et la cellule de bien-être animal. Afin d'éviter au maximum toute douleur chez les primates, des points limites ont été définis au niveau de chaque geste invasif et en veillant à atténuer l'effet cumulatif des expériences. L'application de critères d'arrêts spécifiques et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe dans un milieu enrichi permettent de garantir le bien-être des animaux.

18987 L'hémorragie sous-arachnoïdienne est l'accident vasculaire cérébral grave du sujet jeune qui fait suite à une rupture d'anévrisme intracrânien. La moitié des patients concernés par cette maladie ont moins de 50 ans et ne présentent aucun symptôme avant le jour de la rupture d'anévrisme. L'irruption brutale de sang sous pression au sein de la boîte crânienne est systématiquement accompagnée de maux de tête violents, souvent d'une perte de connaissance transitoire et parfois

d'un coma persistant. Du fait de la gravité de cette maladie, les patients sont immédiatement transférés vers des centres régionaux de référence où une prise en charge bien menée permet la survie du patient dans 3 cas sur 4.

Parmi les survivants, la moitié des patients restent lourdement handicapés du fait de dommages cérébraux irréversibles. Alors qu'une partie des lésions cérébrales sont inaccessibles au traitement car elles surviennent trop précocement suite au saignement initial, une complication redoutable et imprévisible survient alors que le patient est stabilisé à l'hôpital, sous surveillance médicale. Il s'agit de l'ischémie cérébrale retardée. Des lésions cérébrales apparaissent secondairement. Celles-ci pourraient être prévenues à l'aide de traitements efficaces mais les connaissances actuelles ne permettent pas de comprendre les mécanismes à l'origine de cet événement différé. Une réduction retardée du calibre des vaisseaux cérébraux, concomitante de l'ischémie, et visible par scanner cérébral a longtemps été prise pour cible des traitements de l'ischémie cérébrale retardée. Même si l'implication d'une réduction du flux sanguin secondaire à ce macrovasospasme semblait évidente, les thérapeutiques rétablissant le calibre normal des gros vaisseaux n'ont pas permis de réduire les lésions cérébrales retardées, ou d'améliorer le pronostic des patients. L'hypothèse d'une atteinte précoce de la microcirculation cérébrale, menant secondairement à des lésions ischémiques, a alors été émise. Cependant, il n'est pas possible de l'explorer efficacement chez l'homme de manière non invasive et sans risque important pour les patients.

Nous proposons d'explorer les phénomènes d'ischémie cérébrale retardée chez la souris après avoir reproduit l'hémorragie sous-arachnoïdienne expérimentalement. Nous nous intéresserons à l'exploration de la microcirculation capillaire dans ce modèle animal, dont le fonctionnement est proche de celui décrit chez l'homme. Nous utiliserons des techniques de microscopie et d'échographie pour suivre de manière prolongée les variations morphologiques et fonctionnelles de la microcirculation. Nous chercherons à faire le lien entre les anomalies retrouvées et la survenue de lésions cérébrales retardées mis en évidence à l'aide d'outils électrophysiologiques, d'imagerie non invasifs (IRM, scanner) et confirmés par des techniques d'histologie optimisées pour cette étude.

Un total de 397 animaux sera nécessaire au déroulement de ce projet conforme aux exigences de réduction, de raffinement et de remplacement :

- Réduction : les mêmes animaux seront suivis sur plusieurs jours en imagerie non invasive. Les explorations en microscopie et en imagerie non invasive seront réalisés chez les mêmes animaux, dans les limites de faisabilité.
- Raffinement : la reproduction de l'hémorragie sous-arachnoïdienne se fera sous anesthésie générale. Des antalgiques seront administrés systématiquement pour contrôler les douleurs post-opératoires et la douleur-anxiété sera évaluée par une échelle validée. Autant que possible, les différentes procédures expérimentales seront faites dans le même temps opératoire, afin de réduire le nombre d'anesthésies générales.
- Remplacement : les explorations de la circulation cérébrale à l'échelle microscopique ne peuvent être réalisées efficacement chez l'homme. La souris est un modèle animal pertinent pour l'étude du système vasculaire cérébral. Il n'existe pas d'autre modèle adapté à cette étude.

18988 La maladie de Lafora (ML) représente une forme fréquente et particulièrement grave l'épilepsie myoclonique progressive. Ses premières manifestations surviennent à l'adolescence : la personne perd soudainement conscience et tombe avant de présenter des contractions musculaires généralisées. Cette première phase est suivie d'une seconde période durant laquelle le patient présente des spasmes rapides des quatre membres suivie d'une décontraction généralisée des muscles. Après un délai variable d'inconscience, la personne se réveille. L'évolution est dominée par une détérioration cognitive majeure et rapide, dont les premiers symptômes peuvent précéder les troubles moteurs. Le décès survient généralement 4 à 10 ans après les premiers symptômes dans les formes typiques.

L'utilisation d'un modèle rongeur, vertébré présentant des structures cérébrales comparables à l'Humain, permet l'étude de ces dernières et des circuits neuromusculaires associés afin de

développer de nouvelles cibles thérapeutiques pour la maladie de Lafora. L'objectif de ce projet est de tester une molécule enzymatique thérapeutique (VAL-1221) sur ce modèle murin. Pour cela, nos animaux vont subir une chirurgie permettant l'implantation d'une pompe injectant en continu la molécule cible et une solution contrôle. Trois, cinq et huit jours après ces actes chirurgicaux, les souris seront euthanasiées afin de réaliser des études anatomiques.

Justification de la règle des 3R.

Remplacer : ce protocole nécessite l'utilisation d'animaux. En effet, l'identification des structures cérébrales et des circuits neuromusculaires impliqués dans la maladie de Lafora nécessite l'utilisation d'un cerveau intact chez l'animal vigile. Des méthodes *in vitro* telles que la culture cellulaire ou bien les coupes de cerveau ne contiennent pas les connections neuronales qui sont le sujet de nos travaux. Il n'existe donc pas de méthodes alternatives.

Réduire : le nombre d'animaux a été calculé par l'estimation de la variance observée avec ce type de données permettant d'atteindre une signification statistique. Ce nombre est de 15 souris par groupe mais par expérience 10 animaux par groupe sont suffisant et seront utilisés, soit un total de 60 animaux pour la réalisation de ce protocole.

Raffiner : Afin de réduire au minimum la souffrance des animaux, nous appliquons systématiquement un traitement antalgique avant et trois jours suivant les actes chirurgicaux qui sont réalisées sous anesthésie gazeuse. L'évaluation du poids de l'animal est effectuée de façon journalière à partir du moment où il est isolé en cage individuelle et rentre dans la phase expérimentale. Ces mesures ont lieu lors de la manipulation journalière des animaux en même temps que la vérification de l'état général de l'animal. Ces mesures sont consignées dans un cahier d'expérience prévu à cet effet. Pour identifier les dommages et contraintes subis par l'animal, nous avons définis des points limites au nombre de 5. Ces cinq aspects évalués au cours de nos expériences nous aident à déterminer un point final à l'expérimentation. Chaque critère est évalué de 0 à 3 et si un critère obtient le score maximal, ceci induit un arrêt immédiat de l'expérience.

18989 Chaque année 1,5 millions d'européens sont victimes d'un traumatisme crânien le plus souvent lors d'un accident de la route, d'une chute, lors d'une maltraitance ou au cours de pratiques sportives. 70 000 personnes perdent la vie des suites du traumatisme et environ 100 000 ne présentent pas de récupération totale et demeurent handicapés, notamment chez les enfants et les jeunes adultes qui représentent une population particulièrement vulnérable en regard de ce type de traumatisme.

La prise en charge des traumatisés crâniens varie en fonction du degré de sévérité du traumatisme allant de léger à modéré voir sévère. Définir le traumatisme crânien comme mineur ne veut pas dire qu'il est sans risque mais à risque faible de lésions intracrâniennes.

Il est apparu qu'un grand nombre de patients ayant eu un traumatisme crânien léger pendant leur enfance développent des lésions post-traumatiques chroniques tels que la dépression, une démence progressive ou bien des maladies vasculaires et/ou cardiaques.

À ce jour, les mécanismes moléculaires influençant cette mauvaise adaptation au long cours sont inconnus. Un diagnostic précoce, comme la présence d'une signature moléculaire inflammatoire, permettrait de stratifier les jeunes patients à haut risque de développer de tels désordres à l'âge adulte.

Le projet s'inscrit dans la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires silencieux induit par un traumatisme crânien léger chez le jeune animal. Ces mécanismes pourraient déclencher et influencer un remodelage cardiaque et vasculaire pathologique. Le but étant de développer à termes des approches diagnostiques et thérapeutiques précoces.

L'originalité de l'étude proposée joue sur la globalité, c'est-à-dire : i) d'appréhender les changements qui se mettent graduellement en place au sein de l'organisme ii) d'identifier les perturbations moléculaires circulantes et tissulaires iii) de tester des traitements pour limiter les conséquences aiguës et chroniques d'un traumatisme crânien léger sur les organes périphériques.

Nous appliquerons la règle des 3R de la façon suivante :

Réduire : Nous utiliserons 720 souris au total réparties sur 45 groupes (16 animaux /groupes) pour ce projet. Nous avons limité le nombre d'animaux au strict minimum permis par les tests statistiques. Comme l'incidence des traumatismes crâniens touche aussi bien les jeunes garçons que les jeunes filles, nous avons choisi d'utiliser des souris males et des femelles avec une répartition à 50/50. Cependant, comme il y a une variabilité hormonale plus importante chez les femelles, nous avons pris ce paramètre en compte dans nos calculs du nombre d'animaux à utiliser. Notre étude porte également sur 2 niveaux de traumatismes léger et non invasif n'induisant aucune fracture du crâne ni de lésion cérébrale visible. L'onde de choc provoqué par le traumatisme crânien induira des modifications moléculaires. De plus, pour nous aider à déterminer les mécanismes moléculaires influençant le remodelage cardiaque après un traumatisme crânien mineur nous allons utiliser 3 souches de souris transgénique.

Remplacer : Ce projet propose d'évaluer, à partir d'un modèle de traumatisme crânien léger chez la souris, les interactions et les communications moléculaires entre plusieurs organes. À ce jour, aucun modèle in vitro ou informatique ne permet de simuler la complexité des interactions inter-organes. Cette procédure ne peut être remplacée par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau intégré d'informations.

Raffiner : Le projet s'appuie sur des méthodologies respectueuses du bien-être des animaux mises en œuvre uniquement par du personnel technique et de recherche formé et qualifié. Nous utiliserons un modèle déjà approuvé de traumatisme crânien léger chez la jeune souris n'induisant aucune fracture de la boîte crânienne, ni de lésion cérébrale visible, ni de mortalité au long cours. Le bien-être des animaux est un facteur clé de la réussite du projet et des points limites en adéquation avec les besoins expérimentaux ont été déterminés afin d'éviter toute souffrance ou détresse des animaux. Nous y veillerons par une observation quotidienne des animaux. Tous les protocoles s'effectueront sur l'animal anesthésié et en utilisant des antalgiques afin de limiter au maximum le niveau de douleur. Après chaque procédure, nous nous assurerons qu'aucun animal ne présente des signes de souffrance. Nous prêterons attention aux signes de douleur, et une grille d'évaluation des signes de la douleur sera employée. Nous disposons d'outils d'imagerie moderne non-invasif et non-ionisant permettant des études longitudinales et globales où chaque animal est son propre contrôle. En effet l'échographie couplée à la photoacoustique permet de suivre les processus de dégénérescence des organes à la fois au niveau moléculaire et au niveau physiopathologique de l'animal avec une définition encore inaccessible chez l'homme

Tous les animaux auront à leur disposition de la boisson et de la nourriture à volonté, et leur milieu sera enrichi à l'aide de carrés de coton pour la construction d'un nid, ainsi que de litière mélangée à des copeaux.

À la fin du projet tous les animaux seront sacrifiés afin de prélever les organes (cœur, cerveau,...) et le sang.

18990 L'augmentation exponentielle de l'utilisation des plastiques au 20ème siècle s'est suivie d'une pollution croissante des milieux marins due aux débris plastiques. Limiter cette pollution mais également tenter de remédier à celle-ci est une problématique qui touche l'ensemble du globe et un challenge contemporain et futur d'envergure. Chaque année 600 000 tonnes de plastiques sont déversées en mer Méditerranée (la France à elle seule est responsable de 11 200 tonnes), contribuant aux 5 trillions de débris plastiques qui polluent déjà les océans du globe. Les microplastiques (particules entre 0,1 µm et 5 mm), proviennent soit directement de la fabrication industrielle (e. g. microbilles cosmétiques, fibres issues des eaux de lessive), soit de la fragmentation de déchets plastiques dans l'environnement sous l'effet de différents éléments (houle, vague, sel, UV); ils sont omniprésents et persistants et contiennent le plus souvent des éléments chimiques néfastes pour la vie (contaminants organiques). L'intégralité de la faune marine est exposée à cette menace, et des particules plastiques sont observées à l'intérieur des tubes digestifs des animaux tout le long du réseau trophique. Les poissons petits pélagiques représentent à la fois des espèces clés de voûte de l'écosystème de par leur place centrale dans le réseau trophique mais aussi un enjeu économique très important pour les pêcheries françaises. La sardine est la première espèce débarquée en

France. Une quinzaine de conserveries en dépendent, qui produisent annuellement 70M de boîtes. Les études en milieu naturel ont montré que l'on pouvait retrouver jusqu'à 10 particules de microplastiques dans l'intestin d'une sardine de méditerranée. Toutefois, si l'on souhaite pouvoir estimer l'exposition réelle à laquelle les individus font face il est nécessaire de connaître les temps de transit des éléments plastiques au sein des organismes. En effet, plus les temps de rétentions sont importants (durée entre l'ingestion et l'élimination dans les fèces), plus l'exposition aux contaminants associés à ces éléments micro-plastiques (e. g. perturbateurs endocriniens) augmente.

Dans le cadre de ce projet, nous allons mesurer la durée de transit digestif de microplastiques (fibres et fragments de 20µm de diamètre et jusqu'à 1 cm de long) chez 160 sardines de méditerranée lors 1) d'une consommation aiguë de microplastiques (1 seul repas) et 2) d'une exposition chronique (2 semaines, 2 repas/jour). Cette seconde condition permettra d'évaluer les risques d'agglutinations et d'accumulations de microplastiques. L'ensemble des microplastiques en sortie du système de bassin sera filtré (filtration : 15µm). Il n'y aura donc bien entendu aucun rejet dans l'environnement.

Par ailleurs, les prédictions climatiques anticipent une augmentation de la température des eaux à l'échelle globale. Pour des espèces comme les poissons qui ne régulent pas leur température corporelle (ectotherme), une augmentation de la température de l'eau a pour conséquence directe d'augmenter leur métabolisme (toutes les réactions enzymatiques de l'organisme seront accélérées). Dès lors, il devient impératif de tester les conséquences futures d'une telle augmentation de la température sur le transit de microplastiques dans les organismes et ainsi l'exposition à la pollution associée qui en découle. Deux scénarios seront donc évalués : condition actuelle (T°C sous la ther-mocline = 13°C) et un réchauffement de 3°C.

Les protocoles mis en œuvre considèrent la prise en compte de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner) :

1. Remplacer : Le remplacement des animaux n'est pas envisageable dans ce projet. En effet l'étude par une approche expérimentale vise à étudier des processus naturels s'opérant sur une espèce sauvage précisément car celle-ci est exposée à une contamination en milieu naturelle.

2. Réduire : Le nombre d'animaux est défini au plus juste : il correspond au nombre minimal d'individus permettant l'observation de comportement naturel de banc et la survie d'individus en captivité (20 poissons par bac de 90 litres). 8 bacs au total seront utilisés, 4 par température testée (13°C et 16°C) soit 3 réplicas et un bac contrôle ne recevant pas de microplastique.

A l'issue de l'expérimentation, ils seront conservés en bassin pour de nouvelles expérimentations et/ou mis à disposition des aquariums de la région afin de limiter le recours à l'euthanasie. Ces répétitions et nombre d'individus permettront des analyses de variance (ANOVA) à mesures répétées pour évaluer la répétabilité des temps de transit des microplastiques chez la sardine de méditerranée.

3. Raffiner : Le respect du bien-être et la limitation des stress sont des éléments majeurs de la répétabilité et de la fidélité de nos études scientifiques. Le maintien de cette espèce en captivité est devenu une spécialité de nos équipes qui s'efforcent quotidiennement d'améliorer les conditions de vie des individus. Une alimentation adaptée sera proposée aux animaux sans aucune limitations. Les temps et intensités d'éclairage seront en phase avec le cycle naturel et leur gestion (mise en route, exposition, durée) sera optimisée grâce à des outils informatiques.

18991 Les apnées obstructives du sommeil (SAOS) sont caractérisées par des pauses respiratoires récurrentes dues à un rétrécissement /collapsus des voies aériennes supérieures et/ou à un arrêt périodique du réseau respiratoire ponto-bulbaire (réseau de neurone situé entre le pons et le bulbe rachidien contrôlant la respiration) au cours du sommeil. D'après les données de la littérature, les épisodes répétés d'hypoxie- réoxygénation liés aux apnées nocturnes qui constituent un stress d'hypoxie intermittente chronique (HIC) sont particulièrement délétères, du fait du stress oxydant et de l'inflammation de bas grade qu'ils génèrent.

Il est aujourd'hui admis que l'HIC est à l'origine d'une synthèse accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Or, le stress oxydatif et l'inflammation sont des médiateurs reconnus des perturbations respiratoires suite à une hypoxie intermittente mimant les apnées du sommeil chez le rongeur. Par ailleurs, des marqueurs inflammatoires périphériques stimuleraient NFκB entraînant une augmentation de la signalisation inflammatoire dans le système nerveux central via le tronc cérébral. Plusieurs éléments convergents de la littérature évoquent un rôle de l'HIC dans l'initiation de la plasticité respiratoire via des phénomènes de facilitation à long terme et d'augmentation progressive de la sortie motrice respiratoire.

De plus, une étude montre que l'HIC conduisait à une surmortalité des souris ainsi qu'à une aggravation de la fibrose pulmonaire avec une accumulation de collagène pulmonaire se traduisant par une altération de la mécanique ventilatoire. Néanmoins, les mécanismes à l'origine de ces altérations restent méconnus à ce jour. Afin d'élucider ces mécanismes, des résultats préliminaires ont été obtenus et montrent que l'exposition à de l'HIC à des temps courts (28 jours) initie un processus pro-fibrosant avec une augmentation des collagènes, des facteurs pro-fibrosants et des marqueurs du stress du réticulum endoplasmique (RE) au niveau pulmonaire.

Tout d'abord, notre hypothèse est qu'une exposition longue à de l'HIC conduit à une plasticité au niveau des structures ponto-bulbaires à l'origine de la commande centrale respiratoire. Ensuite, nous pensons que l'HIC telle que rencontrée au cours du SAOS et le stress oxydant qu'elle engendre dans les alvéoles pulmonaires pourrait altérer la fonction des cellules épithéliales alvéolaires (CEA) et les réponses adaptatives à visée protectrice du poumon. En effet, notre hypothèse est que l'HIC pourrait induire l'apoptose et la transition épithélio-mésenchymateuse des CEA, par l'intermédiaire du stress oxydant et/ou du stress du Réticulum Endoplasmique (RE) qu'elle génère, contribuant ainsi au développement de la fibrose.

Il n'existe pas à ce jour de méthode alternative à l'expérimentation in vivo pour étudier l'impact d'une longue exposition à l'hypoxie intermittente au niveau pulmonaire ni sur l'étude de la commande centrale respiratoire. Ainsi, ce projet nécessitera l'utilisation de 120 animaux sur 3 ans et se fera en accord avec la règle des 3R. Ces animaux utilisés pour mener à bien cette étude seront des souris mâles âgés de 8 semaines de souche C57Bl/6J issues d'un fournisseur agréé.

Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, ces derniers seront réutilisés dans différentes procédures expérimentales.

Les différentes procédures seront réalisées dans le respect total des règles du raffinement, les animaux suivront un protocole favorisant leur habituation au sein de l'animalerie afin de diminuer au maximum leur état de stress. De plus, Les souris seront surveillées quotidiennement par les expérimentateurs, afin de consigner leur apparence physique externe (poil hérissé ou mal entretenu, regard modifié, posture inhabituelle), leur comportement (réduction de l'appétit, niveau d'activité, diminution du comportement exploratoire, indifférence au milieu extérieur), leur poids (amaigrissement ou stabilisation), leur fréquence respiratoire. Pendant la durée de la procédure, les souris seront maintenues en cages de 410 ou 530 cm². Les animaux seront logés en groupes sociaux stables formés de 4 individus compatibles. Il n'y a pas de limitations dans les apports de nourriture ou d'eau. L'enrichissement du milieu consistera en un ajout de coton à la litière ou de bandes de papier naturel compacté (compact crinklet), ainsi que des maisons en carton, ce qui leur permettra de trier les morceaux de tailles différentes, de décompacter les morceaux compactés, et d'élaborer des nids.

De plus, il est à noter que les parties des projets réalisables in vitro seront appliquées. En effet, l'étude des atteintes des cellules épithéliales alvéolaires est réalisée in vitro.

18992 Plusieurs études de cas cliniques ont rapporté que le stress peut déclencher la maladie de Parkinson (MP) ou exacerber les symptômes moteurs et les troubles de l'humeur qui lui sont associés. Par ailleurs, l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien (axe HHS) qui contrôle la sécrétion de cortisol est un système effecteur majeur du stress. Or, des travaux précédents menés par notre équipe ont montré que les patients parkinsoniens présentent des altérations des taux de cortisol circulants ainsi que des modifications d'expression des récepteurs au cortisol (GR) dans le

cerveau. Sur la base de ces observations, nous avons proposé que l'axe HHS dérégulé dans la MP altère les réponses des patients parkinsoniens au stress et que les effets négatifs de ces altérations contribuent au mécanisme de la mort neuronale en cours et à la progression de la maladie selon un mécanisme qui pourrait mettre en jeu une hyperactivation des cellules microgliales, les cellules résidentes du système immunitaire dans le cerveau, à l'origine de processus inflammatoires chroniques et toxiques.

L'objectif de ce projet est donc de déterminer si le stress chronique et un dysfonctionnement des récepteurs aux glucocorticoïdes (GR) est un facteur important dans le développement de la maladie de Parkinson (MP) et d'en étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents avec un focus particulier sur les phénomènes d'inflammation cérébrale.

Pour 1) tester cette hypothèse et 2) comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents, nous proposons d'analyser l'impact du stress chronique sur les processus neurodégénératifs dans un modèle expérimental de la MP chez la souris. Par ailleurs, des animaux invalidés génétiquement pour le GR spécifiquement dans les cellules microgliales seront utilisés afin de déterminer si ces effets reposent sur l'altération des réponses immunitaires centrales en lien avec des niveaux élevés et chronique de glucocorticoïdes circulants. A travers ce projet, nous espérons également obtenir des informations précieuses concernant les mécanismes moléculaires mis en jeu et qui pourraient constituer des cibles thérapeutiques intéressantes et innovantes pour l'avenir.

Type d'animaux :

Souris mâles adultes (10-12 semaines)

Nombre d'animaux :

Nous estimons utiliser 504 souris.

Respect de la règle des 3R (Remplacement-Réduction-Raffinement) :

Remplacement:

Le projet que nous souhaitons mener repose sur diverses approches expérimentales complémentaires. En outre, l'identification de cibles candidates impliquées dans les mécanismes d'hyperactivation inflammatoire associée à l'altération du GR microglial sera réalisée à l'aide de modèles *in vitro* de cellules en culture. Ces modèles *in vitro* constituent un axe fort du projet et leur étude apporteront des éléments précieux qui permettront de réduire au maximum l'utilisation d'animaux. Toutefois, le développement des processus neuroinflammatoires dans le contexte pathologique des maladies neurodégénératives fait intervenir de nombreux acteurs cellulaires (neurones, cellules gliales, cellules immunitaires périphériques). Cette complexité cellulaire et organisationnelle est difficilement modélisable *in vitro*. Nous devons donc avoir recours à des systèmes intégrés afin de tester et valider nos hypothèses mécanistiques.

Réduction: Nous utiliserons le nombre minimum d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Compte tenu des données de la littérature (variabilité attendue) et des effets espérés, un test de puissance statistique a été utilisé pour déterminer le nombre minimum d'animaux nécessaire pour cette étude.

(Utilisation d'un logiciel en accès libre pour de calcul de puissance statistique).

Raffinement: Toutes les mesures pour réduire la douleur et la souffrance des animaux ont été prises lorsque les impératifs scientifiques le permettaient (chirurgie en condition aseptiques strictes et sous anesthésie, antalgiques pré- et post-opératoires, hébergement contrôlé et enrichi aux maximum des possibilités, temps d'acclimatation et de récupération respectés).

18993 Chez l'Homme, l'exposition *in utero* à l'alcool peut se traduire par des anomalies neurodéveloppementales sévères. Contrairement au syndrome d'alcoolisation fœtale qui est détecté dès la naissance du fait d'anomalies morphologiques, les troubles cliniques liés à une exposition à l'alcool *in utero* n'apparaissent que progressivement au cours du développement.

Dans ce projet nous voulons évaluer les conséquences d'une l'alcoolisation fœtale sur la vision et le réseau vasculaire cérébral une fois l'âge adulte atteint. Cette étude pourra permettre dans l'avenir une surveillance adaptée des enfants ayant été exposés à l'alcool in utero.

Afin de simuler une alcoolisation fœtale, de l'alcool sera administrée en sous cutanée à des souris gestantes. Les études seront ensuite menées sur les animaux nés de ces portées à l'âge adulte. Nous analyserons l'acuité visuelle des animaux par un test comportemental, l'état et la structure de la rétine seront étudiés des techniques d'imagerie non invasive de l'œil, et la fonction rétinienne par des analyses électrophysiologiques. Le réseau vasculaire sera visualisé à l'aide d'un échographe à ultrasons. Des études histologiques et/ou électrophysiologiques complémentaires seront réalisées après euthanasie des animaux sur les rétines et/ou les cerveaux qui auront été prélevées. Ces études seront menées sur des souris normales.

En incluant les portées contrôles, cette étude inclura un maximum de 22 portées (soit un maximum de 132 souris adultes incluses dans nos analyses).

Soit un total de 154 animaux : 132 souris adultes entrant dans l'étude + 22 mères alcoolisées ou non ayant données naissance aux 132 souris de notre étude

Conformément à la « règle des 3R » décrite au 2° de l'article R214-105 :

Remplacer : Il n'y a pas d'alternatives in vitro permettant l'étude des conséquences à l'âge adulte d'une exposition fœtale à l'alcool.

Réduction : Le nombre d'animaux a été limité au minimum nécessaire pour atteindre l'objectif scientifique de ce projet avec des résultats statistiquement interprétables. Le nombre a été évalué en fonction des précédentes études de nos collaborateurs.

Raffiner : Les animaux seront examinés quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié de l'animalerie et seront hébergés dans les conditions conformes à la réglementation (cages de stabulation avec enrichissement, nourriture et boisson à volonté). Ils bénéficieront, si besoin, d'une anesthésie générale. Pour les procédures chirurgicales, la douleur sera prévenue par l'administration d'opioïdes. Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée. Elle permettra une surveillance adaptée des animaux en fonction des points limites définis à chaque procédure afin de s'assurer de leur bien-être.

Les animaux commerciaux observeront une période d'acclimatation de 5 jours minimum.

18994 Les troubles du sommeil sont fréquents chez les personnes âgées. Ces dernières années, des études à la fois chez l'homme et chez les rongeurs ont mis en évidence une association entre sommeil perturbé et la maladie d'Alzheimer mais les mécanismes sous-jacents restent encore en grande partie inconnus. Le syndrome d'apnées du sommeil (SAS) est l'une des causes des troubles du sommeil et il est caractérisé par une obstruction répétée des voies aériennes supérieures, entraînant une fluctuation du taux d'oxygène sanguin (hypoxémie intermittente), un sommeil fragmenté et des signes diurnes tels que la somnolence et des troubles de la concentration/attention/mémoire. Le SAS doublerait le risque de démence chez l'homme, et serait associé au dépôt cérébral des protéines amyloïdes β (A β) retrouvées dans la maladie d'Alzheimer. Dans les modèles animaux, l'hypoxie intermittente (IH) entraîne une anomalie électrophysiologique (plasticité synaptique) au niveau de l'hippocampe du cerveau, une perte neuronale et une production d'A β . Les troubles cognitifs présentés par les patients souffrants de SAS sont d'ordre mnésique (hippocampe) et dysexécutif (cortex préfrontal). Or, la maladie d'Alzheimer est caractérisée au niveau physiopathologique par une altération des connexions entre les différentes régions cérébrales, notamment entre l'hippocampe et le cortex préfrontal.

En utilisant l'électrophysiologie, notre objectif est d'analyser l'effet de l'hypoxie intermittente chronique sur cette dynamique neuronale hippocampo-préfrontale, et de comparer le profil de cette dynamique neuronale entre le modèle SAS (hypoxie intermittente) et le modèle transgénique Alzheimer.

Par ailleurs les lésions cérébrales (inflammation, apoptose, sénescence cellulaire, structure des épines dendritiques, atteinte de la barrière hématoencéphalique) potentiellement induites par

l'hypoxie intermittente seront corrélées avec ces anomalies électrophysiologiques au niveau de ces régions cérébrales d'intérêt.

Ces études seront réalisées chez 2 modèles expérimentaux:

- Un modèle transgénique : des souris génétiquement modifiées surexprimant une mutation humaine de la préséniline 1 (PS1 KI/KI) à l'origine de formes familiales rares et précoces de la maladie d'Alzheimer chez l'Homme
- Un modèle expérimental d'hypoxie intermittente chronique : souris sauvages ou transgéniques Alzheimer exposées à l'hypoxie intermittente.

Nous procéderons à l'analyse spectrale des potentiels de champs locaux (LFP local field potential) du cortex préfrontal et du cortex hippocampique (Transformée de Fourier : FFT), à l'évaluation statistique du degré de linéarité de leurs relations chronologiques (Fonction de cohérence) et du lien temporel avec les champs de potentiels électriques locaux dans certains tests comportementaux tel que le labyrinthe en T. Ces données électrophysiologiques seront corrélées avec les lésions cérébrales induites par l'hypoxie intermittente.

L'étude électrophysiologique in vivo couplé à un test comportemental ne peut être réalisée que sur un animal, non anesthésié, dans un état de vigilance et comportemental précis. Par ailleurs, les études des lésions cérébrales (inflammation apoptose, sénescence cellulaire, perméabilité de la barrière hématoencéphalique, neurogenèse etc. .) ne peuvent être réalisées que sur un animal également. Un modèle expérimental de remplacement n'est pas envisageable. Le développement de méthodes de traitement des signaux très sophistiquées ainsi que l'analyse statistique multivariées des résultats ont permis de réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaires à la réalisation de ces études. L'anesthésie générale lors de la mise en place des électrodes, la procédure d'euthanasie dans une pièce dédiée à cet objectif, ainsi qu'une procédure quotidienne d'observation et d'examen, sont les pratiques expérimentales destinées à réduire au maximum la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux utilisés dans ce projet. Au total 728 souris seront utilisées pour ce projet.

18995 Les actions comportementales que nous réalisons dans notre vie quotidienne sont la résultante d'une suite de commandes et d'opérations effectués dans notre système nerveux et qui sont adaptées à notre environnement. Par exemple, saisir une tasse de café et la porter à ses lèvres requiert un haut degré de précision de l'analyse de l'environnement, du contrôle musculaire et de la perception sensorielle. Ces fonctions sont notamment assurées par des structures cérébrales : le néocortex et le cervelet qui reçoivent des informations en entrées et produisent des commandes en sorties. Leurs neurones sont organisés en circuits appelés microcircuits qui interagissent entre eux via des échanges électrochimiques : appelés activités neuronales. Elles se traduisent par des changements de potentiel électrique membranaire ainsi que de la transmission d'un message via le relargage de neurotransmetteurs à la synapse ou via le partage de neurotransmetteurs dans une structure dédiée appelé glomérule. La transmission synaptique est classifiée dans deux grandes familles: la transmission excitatrice, dont le neurotransmetteur le plus important est le glutamate, qui rend plus excitable le neurone, et la transmission inhibitrice, dont les transmetteurs principaux sont le GABA et la glycine. La plupart des neurones du système nerveux central reçoit un « barrage », variable dans le temps, d'excitation et inhibition dont la balance détermine le profil temporel de la transmission de l'information.

Quelles sont les règles qui déterminent comment inhibition et excitation interagissent au niveau de neurones individuels afin de produire un comportement adapté ? C'est une des questions-clé des neurosciences modernes qui reste non élucidé concernant les mouvements complexes, notamment ajusté par le cervelet. Nous devons obtenir des informations à plusieurs niveaux : de l'organisation morphologique des structures synaptiques, jusqu'à l'enregistrement de l'activité neuronale à la suite d'un barrage physiologique d'excitation et inhibition. Un ensemble de techniques différentes sera donc utilisé pour disséquer le rapport entre excitation et inhibition: suivi anatomique des circuits neuronaux, électrophysiologie des microcircuits et imagerie de l'activité in vivo et comportement in vivo en parallèle de l'activation musculaire.

Nous focalisons nos travaux sur le cervelet qui possède une structure anatomique hiérarchisée avec une couche d'entrée, une couche de traitement de la synthèse des entrées et un noyau de sortie. Chaque couche est constituée d'un ensemble de neurone limité dans leur diversité qui est bien défini génétiquement. Au sein de ces couches, des circuits de neurones sont impliqués dans le contrôle de l'ajustement du tonus musculaire afin de permettre à l'animal de gérer sa posture à chaque instant et nous nous intéressons à ces circuits afin de comprendre la structure et les mécanismes de transmissions de l'information neuronale pour comprendre cette fonction élémentaire qui est le prérequis à toute action motrice plus sophistiquée. Ces troubles posturaux sont également une conséquence néfaste chez les patients souffrants d'ataxie. Nous incluons dans ce projet un volet sur l'étude des mécanismes de transmissions neuronales dans un modèle transgénique de souris ataxique en nous appuyant sur l'étude des mécanismes fondamentaux des microcircuits cérébelleux.

Nous prenons avantage des outils génétiques pour les cibler avec des techniques optiques (méthodes optogénétiques) les microcircuits d'intérêts. Nous avons récemment développé des méthodes optiques performantes pour suivre l'activité de décharge et les variations du potentiel membranaire. Ces méthodes moins invasives permettent d'augmenter le nombre et la valeur des données acquises tout en minimisant la quantité d'animaux utilisés.

Les stratégies utilisées pour obtenir l'expression spécifique de ces outils sont génétiques, se basent sur l'existence et la disponibilité de modèles transgéniques. Les souris constituent le seul mammifère aisément modifiable génétiquement.

D'un point de vue technique, les souris seront l'objet de chirurgie et test comportementaux couplés ou non à des activations ou à des observations de leur activités neuronales par microscopie bi et monophotonique.

L'utilisation de souris en expérimentation in vivo ne peut pas être remplacé par des systèmes in silico ou in vitro pour l'étude des mouvements et coordination motrice. La réduction sera possible particulièrement en ce qui concerne les manipulations morphologiques, où un faible nombre d'animaux fournit typiquement un nombre très élevé d'échantillons utilisables pour des buts différents, et en ce qui concerne les manipulations chronique d'optogénétiques ou d'imagerie cellulaire in-vivo, où chaque animal peut être soumis à plusieurs tests en parallèle.

La réalisation de ce projet se fera suivant les règles de bonnes pratiques d'expérimentation animale. Tout effort sera pris pour réduire, supprimer ou soulager au maximum l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse subie par les animaux. D'une part, des points limites sont définis en amont. D'autre part, en ce qui concerne la douleur, nous utilisons analgésiques centraux et locaux en plus de l'anesthésie générale pendant les chirurgies et complétons par des soins peri-opératoires qui visent à prolonger la réduction de la perception de la douleur éventuellement résiduelle après l'opération. Concernant le raffinement, les animaux sont hébergés avec plusieurs animaux par cages et ont à leur disposition un enrichissement leur permettant de jouer et se cacher.

Nous sommes un centre de formation pour l'enseignement supérieure et nos recherches sont en parties effectuées par des étudiant. e. s diplômé. e. s à la sortie de leur cycle universitaire ainsi quelques animaux serviront à la fois à la recherche et à la formation des étudiant. e. s.

Ce projet nécessitera 3172 souris.

18996 Le néphron est l'unité structurale et fonctionnelle du rein qui assure la filtration du sang et la formation de l'urine. Plusieurs centaines de milliers de néphrons assurent cette fonction dans le rein humain. La compréhension des mécanismes gouvernant la différenciation des différents types de cellules qui le composent, leur organisation en glomérule et en tubule, sont des enjeux majeurs, tant au plan de la recherche fondamentale que dans des perspectives thérapeutiques de médecine régénérative pour les maladies rénales. L'organisation du néphron dans les reins des vertébrés est remarquablement conservée au cours de l'évolution, ce qui permet d'étudier ces mécanismes dans des organismes plus simples tels que les têtards du Xénope.

Chez le Xénope, la totalité du développement embryonnaire se produit en dehors de l'organisme maternel. Ce modèle d'étude est particulièrement bien adapté à l'étude des premières étapes du

développement d'un embryon de vertébré. Les étapes du développement de l'embryon de Xénope sont bien documentées. Il est très aisé d'obtenir plusieurs centaines d'embryons synchrones par fécondation in vitro. Les génomes de *Xenopus laevis* et *Xenopus tropicalis* ont été séquencés. L'accès à ces ressources génomiques confère à ce modèle toutes les possibilités d'analyses moléculaires requises par le projet.

Le projet a pour objectif d'étudier l'engagement des cellules embryonnaires multipotentes vers une destinée rénale pour comprendre comment elles vont s'organiser pour construire l'unité de filtration du rein, le néphron, avec les différents types cellulaires le constituant. Chez le Xénope, le pronéphros est le rein du têtard qui est constitué d'un unique néphron. Bien que beaucoup plus rudimentaire, il est formé des mêmes types cellulaires que le néphron humain. La formation d'un rein fonctionnel chez le Xénope est achevée en deux jours de développement. Le développement du pronéphros chez l'embryon de Xénope est un modèle couramment utilisé pour l'étude de la néphrogenèse. L'espèce utilisée le plus couramment est *X. laevis*, mais l'utilisation de *X. tropicalis* est également requise dans des expériences nécessitant la réalisation de lignées génétiquement modifiées, car cette espèce est diploïde et son temps de génération est beaucoup plus court que pour *X. laevis* (6 mois environ pour *X. tropicalis* contre 18 mois pour *X. laevis*).

Le projet requiert l'utilisation d'animaux pour l'obtention des embryons. Nous utilisons une méthode de fécondation in vitro qui requiert l'euthanasie du mâle pour le prélèvement des testicules. Ceci est réalisé chez l'animal anesthésié selon les bonnes pratiques vétérinaires. Elle est absolument indispensable car elle permet d'obtenir des lots d'embryons se développant de manière synchrone. Les femelles en revanche sont réutilisées après la ponte qui est obtenue par stimulation hormonale (injection d'hormone gonadotrope humaine -HCG- dans les sacs lymphatiques dorsaux). La ponte peut être induite tous les six mois environs (au minimum quatre mois).

Il est clair que l'étude du développement embryonnaire requiert de pouvoir analyser la plupart des processus mis en œuvre chez l'embryon. Ces études peuvent être complétées par des analyses sur des lignées cellulaires, mais sans pouvoir substituer ce type d'approche aux études chez l'embryon.

La règle des 3R est surtout applicable au nombre d'animaux utilisés. Il est évident que les lignées cellulaires ne peuvent pas totalement se substituer à l'embryon, dès lors qu'on étudie le développement embryonnaire d'un organe (ici le rein) et que l'embryon ne peut pas être totalement remplacé.

Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés pour les expériences, nous organisons le programme des expérimentations afin de pouvoir partager les embryons qui sont très nombreux entre les chercheurs de notre laboratoire. Une femelle de Xénope peut pondre plusieurs milliers d'œufs, ce qui permet d'obtenir assez d'embryons pour toutes les expériences programmées.

Les possibilités de raffiner les protocoles utilisés sont très limitées. Un programme d'enrichissement a été mis en place dans l'animalerie qui permet aux animaux de bénéficier d'une alimentation variée (vers de vase, granulés) et d'un environnement mimant un habitat naturel (abris constitués de section de tubes PVC, plantes plastiques).

Nous disposons de 300 femelles de *X. laevis* dans pouvant être stimulées tous les 4-6mois. Certaines femelles ne répondant plus à l'HCG après plusieurs stimulations, nous sommes aussi amenés à renouveler certains animaux. Ceci représente en moyenne un renouvellement de l'ordre de 40 femelles par an. Nous utilisons également une seconde espèce de Xénope pour nos expériences, *X. tropicalis*. Nous disposons de 50 femelles de *X. tropicalis* dans l'animalerie. Dans ce cas, nous évaluons le renouvellement à 20 femelles par an. Pour sa durée de 5 ans, le projet met en œuvre au total 500 femelles de *X. laevis*, 150 femelles de *X. tropicalis*.

18997 Le maintien de l'intégrité musculaire a été décrit depuis longtemps comme étant dépendant de l'innervation et de l'exercice. Néanmoins, les mécanismes moléculaires impliqués dans le maintien de l'homéostasie musculaire sont encore mal compris.

Parmi les différents signaux trophiques, l'activité contractile du muscle, la neurotransmission et les facteurs neurotrophiques sont des éléments essentiels qui régissent l'intégrité de la masse

musculaire. Une altération de l'activité électrique provoque une modification de l'expression de gènes impliqués dans l'homéostasie musculaire.

Le but de cette étude est donc de déterminer les mécanismes impliqués dans le contrôle de la masse musculaire après une altération de l'activité électrique et d'identifier la part de responsabilité «neurogénique» versus «myogénique».

Notre précédente étude nous a permis de montrer que la protéine GDF5, jouait un rôle très important dans le maintien de la masse musculaire.

Pour ce nouveau projet, nous utiliserons des souris déficientes en GDF5 (B6 x BALB/cJ-Gdf5 bp-3J/J) que l'on nommera « GDF5-KO » et que nous comparerons aux souris WT que l'on nommera « GDF5-WT ». Ce projet aura comme objectif de comprendre le rôle de la protéine GDF5 au cours du vieillissement, dans un muscle immobilisé ou après l'endommagement d'un nerf.

Remplacement: Afin de limiter au maximum le recours à l'utilisation de souris pour l'obtention de réponses à nos questions, les expériences seront, dans la mesure du possible réalisées in vitro avec des lignées cellulaires. Ce n'est qu'en dernier recours que nous utiliserons le système murin.

Réduction : Les processus expérimentaux seront conçus de façon à utiliser un nombre de souris limité permettant une analyse statistique. Néanmoins, 5 animaux par groupe seront malgré tout nécessaires et les protocoles seront rigoureusement élaborés et réfléchis en avance pour que l'expérience soit interprétable et que l'on n'ait pas à la refaire.

Raffinement : Les conditions d'hébergement et l'enrichissement du milieu sont gérés par l'animalerie. Elles consistent en un contrôle quotidien des cages, un changement régulier, un nombre réduit d'animaux par cage (5 maximum) et pas d'animaux isolés. Le changement des cages se fait sous hotte aspirante et les cages possèdent des filtres. L'enrichissement du milieu consiste en l'ajout de laine de bois afin que les souris puissent faire un nid ainsi que de lanières de papier Kraft et des tunnels en carton. Enfin, si nécessaire, la nourriture pourra être mise à disposition sur le plancher de la cage. Pour limiter la souffrance et l'angoisse, les procédures qui le nécessiteront seront réalisées sous anesthésie et sous analgésiques. Au cours des différentes procédures, la température des souris est maintenue constante à l'aide d'une plate-forme chauffante ou sous lampe radiante. Les animaux seront ensuite suivis quotidiennement afin de relever le moindre signe de souffrance.

Pour réaliser ce projet nous utiliserons 560 souris (280 souris GDF5-WT et 280 souris GDF5-KO)

18998 L'équipe travaille sur des transporteurs de neurotransmetteurs importants pour les comportements liés à l'humeur et certaines maladies psychiatriques, comme la dépression. Les troubles de l'humeur sont des maladies fréquentes et invalidantes, jusqu'à 16% de la population mondiale étant affectés à des degrés divers par des symptômes de type dépressif. L'étiologie de la dépression est complexe et mal connue, même s'il est admis qu'à la fois des facteurs de prédisposition génétique et des facteurs de risque environnementaux interviennent. La plupart des antidépresseurs traditionnellement utilisés pour soigner la dépression sont des inhibiteurs de recapture de la sérotonine (5-HT) et la noradrénaline (NE), interagissant avec des transporteurs à haute affinité pour ces neurotransmetteurs, situés dans les terminaisons des neurones. Ils exercent leurs effets principalement en augmentant la concentration extracellulaire des monoamines dans le cerveau. Ces médicaments présentent toutefois un trop long délai d'action et une mauvaise efficacité chez un nombre important de patients (jusqu'à 1/3 après deux essais), on parle alors de dépression "résistante". La nécessité d'identifier les facteurs de risque environnementaux de cette résistance, ainsi que de nouvelles approches thérapeutiques, plus efficaces, est une préoccupation majeure de santé publique.

Dans cette optique, notre projet se focalise sur le transporteur de cations organiques 2 (OCT2), une cible originale pour le traitement des troubles dépressifs. Précédemment, notre équipe a montré qu'il existait dans le cerveau des systèmes additionnels de clairance des monoamines, les transporteurs de cations organiques (OCT). Ces transporteurs à faible affinité fonctionneraient de manière complémentaire aux transporteurs à haute affinité, qui sont les cibles des antidépresseurs conventionnels. Un membre de cette famille de transporteurs en particulier, OCT2, joue un rôle

significatif dans la clairance de la 5-HT et la NE, modulant ainsi l'activité de certains neurones dans le cerveau. OCT2 contrôle des comportements liés à l'humeur comme le niveau d'anxiété et la réponse aux antidépresseurs. Nos travaux montrent notamment qu'OCT2 est un élément critique de la réponse aux traitements antidépresseurs prolongés dans un modèle chronique et validé de dépression, induit par l'administration prolongée de l'hormone corticostérone. Nous avons également développé des composés ciblant les OCT présentant un fort potentiel antidépresseur dans ce modèle de dépression chronique chez la souris.

Nos projets actuels visent à poursuivre l'étude du rôle d'OCT2 dans la réponse aux antidépresseurs et caractériser des molécules qui se fixent aux OCT (des ligands) ayant un potentiel antidépresseur. Notamment, nos résultats récents suggèrent que le transporteur OCT2 joue un rôle crucial dans la résistance aux antidépresseurs en fonction de l'apport alimentaire, modulant la neurotransmission 5-HT dans le cerveau. De surcroît, la metformine, un antidiabétique courant transporté par OCT2, exerce des effets antidépresseurs. Les expériences chez des souris mutées (knock-out) pour le transporteur OCT2 vont permettre de comprendre le mécanisme d'action de ces médicaments (antidépresseurs et antidiabétiques) couramment utilisés chez l'homme et potentiellement identifier de nouvelles pistes thérapeutiques. En particulier, le projet vise à caractériser le rôle d'OCT2 dans la réponse aux antidépresseurs dans des modèles validés de dépression chronique chez la souris, avec pour objectifs i) de déterminer comment OCT2 contribue à l'efficacité de certains antidépresseurs classiques ii) de définir son rôle dans les effets antidépresseurs de la metformine et iii) clarifier la contribution de l'environnement, en particulier le régime alimentaire, et divers processus biologiques dans les effets des antidépresseurs. Une autre partie du projet se propose de caractériser de nouveaux ligands spécifiques des OCT à potentiel antidépresseur dans notre modèle préclinique.

L'action à court terme ou long terme de molécules agissant sur le cerveau ne peut être évaluée de manière concluante qu'in vivo sur l'animal entier pour rester le plus conforme possible aux conditions de leur administration chez l'homme, ce qui exclut l'utilisation de modèles de remplacement à ce stade de l'étude. De même, l'identification des facteurs de risque contribuant à la résistance aux traitements antidépresseurs ne peut être réalisée que grâce à ces modèles in vivo. Bien que l'on essaie de minimiser le nombre d'animaux, des groupes de 8 souris minimum doivent être utilisés afin d'obtenir des résultats statistiquement concluants. La plupart du temps, les mêmes animaux seront soumis séquentiellement à des batteries de tests comportementaux pertinents entrecoupés de périodes de repos, afin d'en limiter le nombre. A terme, la quasi-totalité des animaux sera utilisée pour les analyses moléculaires et biochimiques. Dans le cadre du raffinement de l'expérimentation animale, les protocoles utilisés (chirurgie, chirurgie stéréotaxique, injection de médicaments ou défaite sociale) ont été optimisés pour exposer les animaux au minimum de douleur possible. L'injection d'AAV ou de médicament est réalisée sous anesthésie totale (kétamine et xylazine) et locale (lidocaïne), pendant la chirurgie, avec des analgésiques en pré- ainsi qu'en post-opératoire (carprofène). Les tests comportementaux sont réalisés plusieurs jours après la chirurgie et récupération totale. Des points limites définis sur le plan physique et comportemental ont été établis, au-delà desquels les animaux seront euthanasiés, ce qui arrive rarement. Dans le cas de la défaite sociale, toute souris présentant des signes de souffrance avant ou lors du test est exclue du protocole. On évalue le nombre d'animaux sur 4 ans à 300 souris (wild-type ou knock-out).

18999 La compréhension du métabolisme énergétique du cerveau sain ou affecté par une pathologie est une priorité en recherche fondamentale. Il s'agit de comprendre comment le cerveau dispose de ses réserves énergétiques pour entretenir l'activité de ses neurones. Une grande partie des réserves énergétiques de l'organisme se présente sous la forme de glycogène un glucide complexe stocké principalement dans le foie et le muscle et qui peut être transformé rapidement en glucose en cas de demande énergétique. Le cerveau possède aussi des stocks de glycogène en quantité limitée, mais situés au plus près des neurones dans les cellules gliales, appelées astrocytes. La façon dont ces stocks sont mis en jeu pour soutenir l'activité neuronale est encore largement inconnue. Ce projet, intitulé « contribution des stocks de glycogène astrocytaires au soutien

métabolique de l'activité neuronale dans le cerveau sain » se déroulera sur quatre ans. Il déterminera dans quelle mesure les stocks de glycogène sont recrutés pour alimenter l'activité neuronale au cours d'une épreuve énergétique, la dépolarisation corticale. Au cours de cette épreuve, nous suivrons les concentrations de glucose, lactate et oxygène au cours de l'épreuve énergétique. Notre hypothèse est que le cerveau puisera dans ses réserves de glycogène, conduisant ainsi les astrocytes à libérer du lactate. Ce lactate serait ensuite mis à disposition des neurones qui le transformeraient en pyruvate puis en dioxyde de carbone en consommant de l'oxygène. Dans un premier temps, les variations de concentrations de glucose, lactate et oxygène seront enregistrées d'abord dans un cerveau sain, puis en bloquant l'accès aux stocks de glycogène par l'administration d'un agent pharmacologique autour du site d'enregistrement. Notre hypothèse est que le blocage de l'accès au glycogène diminuera la quantité de lactate libérée par les astrocytes ainsi que l'oxygène consommé par les neurones. Dans un deuxième temps, les stocks de glycogène seront artificiellement augmentés par une administration d'insuline et de glucose et des effets inverses sur les concentrations de glucose, lactate et oxygène devraient être observés. Dans cette partie du projet, quarante rats mâles et femelles seront utilisés pour doser les quantités de glycogène présentes dans le cerveau. Les effets d'un traitement à l'insuline et au glucose, ainsi que ceux induits par une dépolarisation du cortex cérébral sur le niveau des stocks de glycogène seront quantifiés. Cette partie du projet sera effectuée sous anesthésie sans réveil.

Réduction du nombre d'animaux : ce projet impliquera 40 rats adultes mâles et femelles. Le nombre d'animaux utilisés au cours du projet est maintenu à un niveau minimal permettant des analyses statistiques nécessaires à l'établissement de conclusions fiables.

Raffinement du protocole expérimental : les animaux inclus dans ce protocole seront traités contre la douleur avec des analgésiques locaux et systémiques, les enregistrements seront réalisés sous anesthésie générale sans réveil. Pendant les jours précédant l'expérience, les animaux seront hébergés en groupe avec nourriture et boisson à volonté.

Remplacement par des procédures in vitro : Le recours à l'animal vivant ne peut pas être entièrement remplacé dans l'état actuel de nos connaissances. La régulation des stocks de glycogène et des niveaux de glucose, lactate et oxygène passe par une interaction entre le cerveau et le système vasculaire qui ne peut pas être modélisé sur des préparations in vitro, nécessitant ainsi le recours à l'animal.

Mots clés : cerveau, métabolisme, glucose, lactate, oxygène, neurone, cellule gliale

19000 L'inflammation chronique intestinale est un facteur connu de risque de développer un cancer colique. Les maladies chroniques de l'intestin (MICI) se caractérisent par une inflammation de la paroi du tube digestif liée à une hyperactivation du système immunitaire digestif et une altération de la fonction de barrière de l'intestin. Plusieurs données récentes suggèrent un rôle de la microflore intestinale dans le développement, le maintien et l'aggravation des MICI. Lors des MICI, il existe un déséquilibre de la flore intestinale (dysbiose) qui conduit à un défaut d'interaction entre la flore intestinale et le système immunitaire menant à une inflammation. Cette inflammation, si elle n'est pas résolue, devient chronique et peut conduire au développement de cancer colorectal. Il est donc important de mieux comprendre les mécanismes moléculaires qui participent au développement de l'inflammation intestinale chronique et d'identifier des facteurs qui contrôlent la susceptibilité à la colite inflammatoire. Notre projet a pour objectif d'étudier le rôle de différents gènes que nous avons identifiés dans ce dialogue entre microbiote et intestin. Dans ce projet, nous utiliserons différentes lignées de souris génétiquement modifiées pour nos gènes d'intérêt, dont le phénotype n'est pas dommageable. Le nombre de souris utilisées sera de 120 sur 5 ans. Nous utiliserons deux modèles bien établis qui induisent une inflammation intestinale suite à une infection par des bactéries pathogènes qui modélisent une MICI. Il s'agit d'une infection par la bactérie *Citrobacter rodentium* ou par la bactérie *Salmonella typhimurium* qui présentent des modes d'action différents, *Citrobacter rodentium* est une bactérie qui adhère à la paroi de la cellule épithéliale intestinale alors que *Salmonella typhimurium* est une bactérie invasive. Chez des souris immunocompétentes, l'infection par *Citrobacter rodentium* qui est un pathogène naturel de la souris, dure entre environ 15 et 21 jours. Il induit une dysfonction de la barrière intestinale et une inflammation associée au

développement d'une diarrhée et une perte de poids modeste et transitoire. Nous utiliserons une souche de *Citrobacter rodentium* que l'on peut suivre par une technique d'imagerie. Le deuxième modèle d'infection par *Salmonella typhimurium* qui dure entre 48 et 72h miment les réponses inflammatoires observées dans les infections à *Salmonelle* chez l'homme.

Respect du principe des 3R:

Remplacement : seule une approche intégrée par l'expérimentation animale est envisageable en raison de la diversité des types cellulaires présents dans l'intestin et de la complexité de leurs interactions avec leur micro-environnement incluant le système immunitaire et le microbiote intestinal.

Réduction: afin de réduire le nombre d'animaux, nous utilisons une approche d'imagerie de bioluminescence qui nous permet de suivre l'infection bactérienne de façon non invasive et nous utilisons un nombre optimal d'animaux permettant d'obtenir des résultats statistiquement significatifs.

Raffinement : afin de prévenir un maximum l'angoisse et la douleur des animaux, l'imagerie sera effectuée sous anesthésie. De plus, les animaux seront surveillés régulièrement et seront mis à mort de façon anticipée si ils ont atteint les points limites que nous avons fixés afin de limiter un maximum la souffrance des animaux. Les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux.

Les résultats de ce projet permettront de mieux comprendre les interactions entre l'hôte et le pathogène dans l'intestin, qui quand elles sont dérégulées conduisent au développement d'une MICI. A terme, cela devrait permettre de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour prévenir et traiter les MICI et ses complications, en particulier le cancer colorectal.

19001 La douleur est un problème majeur de santé publique. Une partie importante de la population mondiale souffre de douleurs chroniques, ce qui impacte considérablement la qualité de vie des patients et représente un fardeau économique pour la société. La douleur ne doit pas être considérée comme une entité unique. Il y a en fait plusieurs types de douleurs provenant des différentes parties du corps selon différents mécanismes, ce qui implique différentes stratégies thérapeutiques. Parmi ces douleurs, les douleurs musculosquelettiques représentent l'une des raisons les plus courantes de consultations médicales dans le monde moderne. Malheureusement, l'efficacité des médicaments analgésiques actuellement disponibles est décevante, beaucoup d'entre eux étant inefficaces ou avec seulement des effets modestes ou de courte durée. La principale raison qui limite le développement de médicaments plus efficaces est la mauvaise compréhension de la physiopathologie des douleurs musculaires, et le manque de cibles thérapeutiques spécifiques. La compréhension de la physiopathologie associée aux douleurs musculaires chroniques chez l'Homme passe par l'utilisation de modèles animaux pertinents d'un point de vue clinique. Ces modèles sont, en effet, des outils extrêmement importants et incontournables qui permettent d'étudier les mécanismes moléculaires de ces douleurs, de comprendre comment elles deviennent chroniques et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques spécifiques.

Ce projet a pour but d'établir un nouveau modèle animal de douleurs musculaires chroniques qui reflète les observations cliniques faites chez les patients souffrant de différentes pathologies musculaires. Ce projet fait suite à des expériences réalisées *in vitro* dans lesquelles nous avons récemment identifié, des lipides endogènes capables d'activer les canaux ioniques ASIC. Ces lipides endogènes, produits en cas d'inflammation, sont présents en grande quantité dans le plasma de patients souffrants de maladies chroniques musculaires. Les canaux ASICs constituent donc des nouvelles cibles dans la douleur musculaire, et il s'agit maintenant de valider leur implication et leur intérêt thérapeutique *in vivo*.

D'un point de vue pratique, ce projet consiste à injecter intra-plantairement ou intra-musculairement chez les rongeurs les lipides endogènes produits en condition inflammatoire, et nouvellement identifiés au laboratoire. Ces injections sont susceptibles de générer chez les animaux des douleurs aiguës ou des douleurs musculaires chroniques modérées à sévères qui miment celles ressenties

par les patients (hyperalgies/allodynies, douleurs posturales). Le projet est organisé en 4 grandes étapes avec 1) l'étude de l'effet douloureux aigu des nouveaux lipides et de la régulation des canaux ASICs, 2) la mise au point du nouveau modèle de douleur chronique musculaire et l'étude de l'implication des ASICs dans ces douleurs chroniques, 3) l'étude de l'effet des lipides endogènes sur la transmission du message douloureux au niveau spinal puis enfin 4) l'étude de régulateurs pharmacologiques sur l'activité spinale et la nociception en condition inflammatoire.

Ce projet sera réalisé sur un total de 2628 animaux (840 rats et 1788 souris) pour une durée de 5 ans et il est conçu de façon à respecter au maximum la règle des 3 R :

Remplacement => Toutes les expériences in vitro possibles ont été effectuées préalablement et il s'agit maintenant de valider in vivo et de façon ciblée les hypothèses scientifiques dans des modèles animaux incontournables en accord avec les observations cliniques. A notre connaissance, il n'existe pas de méthode alternative permettant de répondre à notre problématique.

Réduction => Les différentes procédures du projet ont été conçues de façon à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés (nombre minimal pour avoir une pertinence scientifique avec une puissance statistique de 90% et un risque alpha de 0.05) et éviter tout double emploi injustifié. De plus, les procédures sont pensées de manière successive, ce qui nous permet d'adapter le nombre d'animaux en fonction des résultats obtenus dans les procédures et conditions expérimentales précédentes. Ainsi, le nombre d'animaux sera réduit dès lors qu'une condition expérimentale sera jugée inutile.

Raffinement => Les animaux sont élevés en milieu enrichi, ils sont surveillés régulièrement (par les zootechniciens avant les différentes procédures), et des grilles de scores détaillées ont été établies pour chaque procédure. De plus, les procédures 3 et 4 sont réalisées sous anesthésie générale, ce qui limite la douleur/ souffrance de l'animal.

A terme, ce projet permettra de mieux comprendre la physiopathologie des douleurs musculaires, en utilisant des modèles animaux appropriés, dans le but d'étudier le rôle des lipides dans le développement des douleurs chroniques, et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement de ces douleurs.

19002 L'accident vasculaire cérébral (AVC) est une pathologie neurologique survenant après l'occlusion d'une artère irriguant le cerveau. Cette pathologie est la 3ème cause de mortalité et la première cause de handicap acquis chez l'adulte dans le monde. En France, cent trente mille nouveaux cas sont répertoriés par an. L'AVC pose donc un problème majeur tant dans le domaine de la santé publique que sur le plan humain. Actuellement, la prise en charge des patients à la phase aiguë de l'infarctus cérébral est réalisée par l'injection intraveineuse de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) associée ou non à la thrombectomie. Toutefois, le tPA n'a aucune efficacité sur un caillot riche en plaquettes. Ainsi, il paraît indispensable de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques innovantes visant à traiter efficacement cette pathologie.

L'objectif de ce projet est de tester quatre stratégies thérapeutiques antiagrégant plaquettaire afin d'étudier la diminution des volumes lésionnels ainsi que l'augmentation de la récupération fonctionnelle après un AVC thrombotique. Pour cela, ces stratégies thérapeutiques seront étudiées à l'aide d'un modèle d'infarctus cérébral qui reproduit au mieux la physiopathologie de l'AVC permettant une meilleure transposabilité des résultats obtenus vers la clinique. Ainsi, l'AVC sera induit sur des souris Swiss (*Mus musculus*) mâles âgées de 10 à 12 semaines, en utilisant le modèle d'AVC thrombotique pour lequel un caillot sanguin riche en plaquettes est induit par application locale de chlorure de fer sur la paroi endothéliale de l'artère cérébrale moyenne. Ce modèle est aujourd'hui très bien caractérisé chez la souris et toutes les procédures seront organisées afin de se conformer à la règle des 3Rs, ainsi toutes les manipulations douloureuses seront réalisées sous anesthésie générale avec couverture analgésique pour éviter toutes douleurs, souffrances et angoisses. De plus, les données de la littérature ainsi qu'une étude de puissance statistique en amont permettent de nous assurer que nous utiliserons le nombre minimal d'animaux pour pouvoir conclure d'un effet ou non de notre stratégie thérapeutique. Le suivi de la récupération fonctionnelle pour chaque

traitement sera réalisé sur 12 animaux (+10%) selon 3 doses fournis par l'industriel. Soit un total de 316 souris pour l'étude complète.

Cette étude, ayant recours à l'expérimentation animale, prend en compte le bien-être animal et les pratiques éthiques, et répond à la règle des 3 Rs. Ce projet correspond à l'étape de validation in vivo qui fait suite aux nombreuses validations réalisées in vitro, et ne nous permet pas d'utiliser d'autres moyens que de tester cette stratégie thérapeutique chez l'animal. L'ensemble des connaissances et des acquis dont nous disposons dans la littérature font que la souris est un modèle préférentiel pour mener à bien ce projet. En effet, la souris est une des espèces animales la plus étudiée dans le domaine de l'AVC ce qui permettra une analyse comparative et critique des résultats obtenus. Les expériences seront réalisées par du personnel qualifié en respectant les règles de bonnes pratiques de laboratoire pour le respect des animaux, tout en veillant à ne pas dépasser les points limites fixés au préalable. Le bien-être des animaux sera suivi bi-quotidiennement par du personnel qualifié 5j/7 et quotidiennement pendant les week-ends et jours fériés et cela pendant toute la durée du projet. Les animaux seront hébergés dans des cages standards répondant aux normes européennes actuelles (Directive 2010/63/UE). Pour éviter de stresser les animaux, les cages seront isolées de tout bruit extérieur et l'accès à l'eau et à la nourriture sera ad libitum. Enfin, une importance particulière sera apportée au bien-être des animaux. Tout sera mis en œuvre pour réduire l'angoisse, la souffrance et la douleur de chaque animal, pouvant être occasionnées pendant le projet. Les principes éthiques et les standards de raffinement seront utilisés jusqu'à la mise à mort de l'animal.

19003 Contexte : face à la complexité et aux résultats parfois décevants des procédures classiques de remplacement oesophagien, il y a un réel besoin de trouver une alternative à ces techniques. En effet, que ce soit pour des pathologies bénignes (sténoses caustiques, atrésie, . . .) ou malignes, les techniques de remplacement d'oesophage sont des interventions grevées d'une morbidité précoce de 30 à 60 %. A long terme, les résultats fonctionnels sont souvent imparfaits avec des complications pouvant nécessiter une ou plusieurs réinterventions. En cas d'échecs répétés de reconstruction, la seule solution est la nutrition définitive par sonde d'alimentation au niveau de l'intestin grêle. Ces modes de remplacement oesophagien font appel aux organes intra-abdominaux (estomac et plus rarement le côlon) et nécessitent le plus souvent le remplacement de l'ensemble de l'oesophage, même en cas d'atteinte courte. L'ingénierie tissulaire (IT) pourrait être une alternative crédible aux techniques habituelles de reconstruction oesophagienne. Elle permettrait de créer un substitut sur mesure autorisant à ne remplacer que le segment d'oesophage pathologique, sans sacrifice d'organe intra-abdominal. Nous nous intéressons à l'IT de l'oesophage depuis plus de 10 ans. Plusieurs substituts ont été évalués dans des modèles de remplacement oesophagien in vivo (aorte porcine, matrice SIS sans ou avec cellules d'intérêts telles que les cellules stromales mésenchymateuses) et ont permis l'obtention d'un remodelage tissulaire vers un phénotype oesophagien avec récupération aléatoire d'une autonomie nutritionnelle, du fait de sténoses de la zone de greffe secondaire à une réaction inflammatoire majeure, elle-même liée à la nature et au caractère incomplètement décellularisé des substituts. Il a été pressenti qu'un substitut spécifique d'organe serait plus adapté à un remplacement d'organe, du fait de propriétés intrinsèques plus favorables à un remodelage tissulaire, une meilleure biocompatibilité. Nous avons mis au point in vitro une matrice d'oesophage porcine décellularisée.

1) Remplacer : dans un modèle porcine de remplacement circonférentiel de l'oesophage, nous avons montré que l'utilisation de cette matrice oesophagienne décellularisée porcine a apporté des résultats positifs, avec l'obtention d'une colonisation à partir des berges du receveur vers un phénotype histologique oesophagien à 3 mois, la récupération d'une autonomie nutritionnelle avec une prise pondérale et une alimentation normale en l'absence de sténose.

Par un protocole proche du modèle porcine, nous avons développé in vitro une matrice d'oesophage décellularisée humaine (ODH) remplissant les critères de grade clinique. La mise au point d'un protocole de cryopréservation a permis de débiter la fabrication et la constitution d'une banque d'ODHs cryopréservés facilement mobilisables.

Les objectifs de cette étude sont de démontrer l'innocuité, la biocompatibilité et la faisabilité du remplacement de l'oesophage avec l'implantation d'un ODH cryopréservé dans un modèle porcin pour ensuite effectuer un transfert de la technologie de décellularisation à la Banque de Tissus Humain conformément à la réglementation. La qualification de l'ODH in vivo sera réalisée par une étude de faisabilité du remplacement oesophagien réalisée dans un modèle porcin sur une période de 6 mois (n=10). Le porc est un excellent modèle, fréquemment utilisé dans cette indication, du fait d'une anatomie et une physiologie proche de celle de l'homme. Seule l'expérimentation in vivo s'approchant au plus près des conditions cliniques de remplacement chez l'humain permettra de répondre à la question posée.

2) Réduire : il n'y aura qu'un seul groupe d'animaux constitué de 10 animaux chez lesquels un remplacement de 5cm d'oesophage thoracique sera réalisé par notre matrice cryopréservée d'oesophage décellularisé humain. Au vu des résultats précédents lors de notre projet de remplacement par la matrice porcine in vivo et s'agissant d'une étude de faisabilité pré-clinique, nous avons limité le nombre d'animaux à 10 sur une période d'étude de 6 mois. Le choix de remplacement de l'oesophage thoracique et non cervical est lié à un taux de sténose trop important après anastomose cervicale dans notre expérience et un taux de migration de prothèse trop important après remplacement de l'oesophage abdominal.

3) Raffiner: chaque étape de l'expérimentation sera réalisée sous anesthésie générale. Afin de réduire au maximum la souffrance de l'animal, des antalgiques seront systématiquement initiés en post opératoire. L'état général, l'apparence et le comportement de l'animal, révélateurs du niveau de douleurs, serviront à adapter secondairement la dose administrée. Par ailleurs, des points limites suffisamment prédictifs et précoces, motivant la mise à mort anticipée de l'animal, ont été définis.

Conclusion : à terme, ce projet permettra d'initier le premier essai clinique de phase I/II d'innocuité et de faisabilité de remplacement

oesophagien par ingénierie tissulaire chez l'Homme.

19004 Les micro-anophtalmies sont des anomalies malformatives qui peuvent survenir de façon isolée ou s'inclure dans des formes syndromiques. Elles sont caractérisées par une taille plus petite que la normale de l'œil, qui peut aller jusqu'à l'absence totale de globe oculaire visible (anophtalmie). Cette anomalie peut concerner un œil ou les deux et représente un handicap important puisqu'elle est responsable d'une cécité dès l'enfance. Ces micro-anophtalmies peuvent de plus être associées à des cataractes et des anomalies de la chambre antérieure de l'œil. De nombreux gènes et des modes de transmission divers ont été impliqués dans cette pathologie rendant le diagnostic génétique complexe, sans que toutefois la totalité des gènes responsables de cette maladie ait été mise en évidence.

Une mutation identifiée dans la séquence régulatrice (KI) d'un gène chez un malade pourrait correspondre à la seconde mutation du modèle récessif prédit en raison du phénotype oculaire sévère et d'une mutation à caractère récessif (FS) sur l'autre chromosome. La validation de l'effet délétère de cette nouvelle mutation, seule, sur les 2 chromosomes ou en parallèle avec l'autre mutation, comme chez le patient, permettrait de valider le rôle de cette mutation et de ce gène dans cette pathologie.

Deux lignées de souris ont été créées, la première (FS) portant la mutation de la séquence codante trouvée chez le malade, la seconde (KI) portant la mutation localisée dans la séquence régulatrice du même gène.

Du fait de l'absence d'échantillon biologique humain évidente et du fait de la complexité de l'œil comprenant de nombreux tissus, les analyses in vitro réalisées sur plusieurs modèles cellulaires ne suffisent pas en ce qui concerne les études moléculaires et surtout cliniques. De ce fait, il est nécessaire de créer et d'analyser un modèle animal adéquat qui permettra de comprendre les conséquences de cette nouvelle mutation suspectée pour être responsable de la pathologie.

Les souris génétiquement modifiées, indifféremment des deux sexes, seront croisées entre elles afin d'obtenir toutes les combinaisons entre les deux mutations et les anomalies oculaires présentes chez certaines d'entre elles seront alors étudiées sur le plan clinique (œil normal, petit ou non

visible) puis, après euthanasie, les structures oculaires seront étudiées par différentes techniques de biologie moléculaire et cellulaire afin de comprendre les anomalies du développement oculaire induites par ces mutations.

Dans le respect de la règle des 3 R, le Remplacement des animaux par des cellules en culture a permis d'effectuer les premières analyses d'expression qui doivent être maintenant validées et approfondies, permettant ainsi de Réduire le nombre des animaux.

Afin de réduire au maximum le stress des animaux, un enrichissement des cages a été mis en place (maisons en carton, bâtonnets à ronger ou cotons d'enrichissement). Dans une optique de meilleur raffinement, les animaux seront surveillés quotidiennement, des antalgiques seront administrés en cas de douleur et des points-limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

Le nombre d'animaux nécessaires à l'étude de ces lignées, prévue sur 5 ans, est évalué à 445 au maximum: des tests statistiques sont effectués afin de déterminer le nombre d'animaux nécessaire et suffisant pour la significativité des résultats.

Les résultats de ce projet permettront de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la micro-anophtalmies, et de montrer l'importance de rechercher des anomalies dans les séquences régulatrices pour les patients pour lesquels l'analyse des seules régions codantes n'a pas permis de mettre en évidence la ou les mutations responsables de la pathologie.

19005 L'amaurose congénitale de Leber (ACL) est une pathologie rétinienne sévère et précoce puisqu'elle est responsable d'une cécité ou d'une malvoyance profonde dans les premiers mois de vie. Cette maladie est hétérogène sur le plan génétique. Récemment, nous avons identifié un gène responsable d'ACL associé à une atteinte neurologique (troubles du comportement et de l'apprentissage). Notre équipe s'intéresse aux conséquences ophtalmologiques et neurologiques des mutations de ce gène qui code une protéine de régulation de la transcription dont le rôle n'est absolument pas connu. Or, il est difficile de récupérer du matériel oculaire adapté (rétine) chez l'humain. Les études in vitro réalisées sur plusieurs modèles cellulaires ne suffisent pas en ce qui concerne les analyses moléculaires et surtout phénotypiques.

Ce projet consiste à étudier un nouveau modèle murin mimant la pathologie humaine. Pour cela, une lignée de souris KI a été créée en introduisant une mutation identique à celle identifiée.

L'objectif de ce projet est :

- 1) Etablir une nouvelle lignée murine reproduisant la pathologie humaine
- 2) Analyser les signes ophtalmologiques chez ces souris par comparaison avec des souris saines,
- 3) Faire une étude du comportement et de l'apprentissage de ces souris.

Si, et seulement si, l'atteinte de la fonction rétinienne et des problèmes comportementaux sont avérés :

- 4) Analyser plus finement les tissus oculaires (en particulier la rétine) et le cerveau

Le but est de comprendre le rôle de cette protéine dans la rétine et le cerveau, d'appréhender la physiopathologie de cette maladie et d'obtenir un bon modèle animal permettant d'envisager des futurs protocoles thérapeutiques.

Ce projet a été développé en respectant la règle des 3R.

Réduire : Les enregistrements de la fonction visuelle par électrorétinogramme (ERG) qui consiste à enregistrer l'activité électrique de la rétine par stimulation lumineuse en posant des électrodes sur la cornée de l'animal, seront réalisés sous anesthésie générale pour éviter toute souffrance et éviter que les animaux bougent. Afin de Réduire le nombre d'animaux utilisés, la procédure d'enregistrement de l'électrorétinogramme est standardisée sur les deux yeux. Les mêmes animaux seront utilisés chaque mois (étude longitudinale) pour réaliser cette procédure et un nombre de 10 animaux sera suffisant pour obtenir des résultats statistiquement exploitables.

Remplacement : Il n'existe pas de modèle in vitro de Remplacement représentatif de la dégénérescence des photorécepteurs. La souris est un bon modèle de dégénérescence rétinienne

puisqu'elle possède une rétine ressemblant à celle de l'homme (cf publications de nombreux modèles pertinents). De plus, nous avons l'expertise pour étudier sa fonction (ERG) et sa composition cellulaire et moléculaire.

Raffinement : Les procédures mises en place pour réaliser le projet sont peu traumatiques, de courte durée, elles peuvent néanmoins engendrer du stress. Tout au long du projet les animaux seront observés régulièrement (tous les jours par les animaliers) afin de s'assurer de leur bien-être. Le Raffinement sera pris en considération par l'établissement des points limites afin de minimiser l'inconfort, la souffrance ou la détresse potentiels des animaux et de mettre en place la conduite à tenir.

Au total l'ensemble du projet nécessitera 60 souris sur 2 ans. Les bénéfices attendus de ce projet sont de comprendre le rôle de cette nouvelle protéine dans le fonctionnement rétinien et neurologique.

19006 L'objet de l'étude consiste à décrire et identifier les mécanismes de perception, d'attention, de mémorisation, de catégorisation, de raisonnement et de formation de concepts chez le babouin de Guinée.

Le protocole de recherche consiste à permettre à un deux groupes sociaux de babouins comptabilisant au maximum 30 individus au total de se tester librement dans des tâches cognitives à l'aide de stations de conditionnement opérant équipées d'écrans tactiles et de distributeurs de récompenses. Les babouins, qui vivent dans des groupes sociaux de tailles différentes (19 et 6 individus dont 13 et 4 femelles respectivement), peuvent, à tout moment et sans contrainte, quitter momentanément leur enclos ou leur volière pour interagir avec les écrans tactiles. L'expérimentation repose donc sur un principe de volontariat, sans capture de l'animal. Les groupes d'animaux sont maintenus dans des enclos ou dans des volières de grandes tailles enrichies d'objets permettant des comportements riches et variés.

Le projet présenté s'inscrit dans la règle des 3R.

- REMPLACEMENT

: Le recours à l'animal est indispensable dans ce cas, car l'animal est – de fait – l'objet de notre étude. Ici le singe n'est pas pris comme modèle, mais est étudié pour lui-même.

- RÉDUCTION

: Le nombre d'individus se justifie notamment par notre besoin de pouvoir constituer des classes d'âge relativement homogènes, pour pouvoir les comparer et mieux comprendre le développement et le maintien des capacités cognitives au cours du temps (environ 10 individus par classe d'âge, jeune, adultes, sujets plus âgés).

- RAFFINEMENT

: Ces animaux sont tous maintenus en groupe social, et la taille et la composition de ce groupe est proche de ce qui s'observe en nature.

Plusieurs années de recul avec cette approche, et publications de notre laboratoire, ont montré que l'utilisation des systèmes de test en libre accès atténue le stress de l'animal en expérimentation. Ce protocole constitue donc un raffinement (règle des 3Rs) favorable au bien-être de l'animal en expérimentation. Cette recherche apportera des informations sur la cognition du babouin, dans ses dimensions sociales et non sociales, et contribuera à démontrer l'intérêt des protocoles en libre accès dans le cadre de recherches comportementales sur le primate non humain. Cette recherche est également destinée à servir de cadre de référence pour les laboratoires de neurosciences désireux d'utiliser des protocoles en libre accès.

19007 Le mélanome et le carcinome rénal à cellules claires (CRCC) sont deux maladies agressives et malgré le développement de thérapies ciblées et d'immunothérapies, les patients diagnostiqués au stade métastatique ont toujours un mauvais pronostic. Il est donc urgent de trouver de nouvelles cibles pour les tests de diagnostic précoce et pour les traitements de la maladie métastatique. Les fonctions cellulaires ne sont pas uniquement réalisées par les protéines mais également par

certaines acides nucléaires simple brin dont l'expression est souvent spécifique d'un tissu. Plusieurs de ces molécules sont surexprimées dans les tissus cancéreux par rapport aux tissus normaux. Des mécanismes d'inactivation existent et pourraient permettre le développement de médicaments. Nous avons caractérisé un groupe de trois acides nucléaires qui sont déterminants pour la prolifération et la viabilité des mélanomes et des cellules de CRCC in vitro. Pour confirmer davantage leur potentiel en tant que cibles médicamenteuses, nous cherchons à tester les effets de leur surexpression ou de leur inhibition in vivo, par transplantation de lignées cellulaires humaines sur des souris Nude ou de lignées cellulaires murines sur des souris de la même souche.

REMPLACEMENT : nous avons effectué l'inactivation et la surexpression des 3 acides nucléaires dans des lignées cellulaires humaines in vitro, démontrant ainsi leur importance pour la prolifération et la survie des mélanomes et des CRCC. Toutefois, ce modèle a des limites et ne tient pas compte ni de la croissance dans des conditions tridimensionnelles, ni du rôle des autres cellules stromales qui entourent les cellules tumorales. Ces caractéristiques ne peuvent être récapitulées que par un modèle in vivo, c'est-à-dire par injection sur des souris immunodéficientes. En outre, l'injection de lignées cellulaires de CRCC et de mélanomes murins chez des souris immunocompétentes sera la seule méthode permettant de tester l'interaction entre les cellules tumorales et les cellules immunitaires.

REDUCTION : Le nombre total de souris expérimentales sera de 278. Cet effectif correspond au nombre d'animaux nécessaires afin que les résultats obtenus soient exploitables et reproductibles, soit statistiquement valides.

Par ailleurs, plusieurs expériences sont réalisées sur la même cohorte de souris afin de réduire le nombre total de souris nécessaires.

RAFFINEMENT : Nous mesurerons les différences de croissance tumorale dans les différentes conditions à 4 semaines (ou lorsque la tumeur aura atteint un volume maximal de 1cm³). En outre, toutes les lignées ayant été infectées avec un lentivirus permettant l'expression constitutive de la luciférase, elles émettront un signal luminescent, qui pourra être détecté par imagerie (IVIS Lumina) afin de monitorer la taille de la tumeur primaire et la progression métastatique des tumeurs. Nous suivrons journalièrement l'état des souris après injection des lignées tumorales afin de détecter tout effet dommageable. Les souris seront hébergées en cohorte afin de conserver l'interaction sociale. En cas de souffrance liée au phénotype, les animaux seront suivis régulièrement et des points limites appliqués le cas échéant.

19008 La dépression est une pathologie psychiatrique extrêmement répandue dont le facteur étiologique majeur est le stress. Cependant, la réponse au stress est variable entre les individus : si certains vont développer des pathologies psychiatriques, d'autres vont avoir la capacité de s'adapter en réponse au stress. C'est ce que l'on appelle la résilience, en opposition à la susceptibilité.

L'étude des substrats neurobiologiques de la résilience a permis de mettre en évidence un rôle clé du système noradrénergique. Par ailleurs, une protéine cérébrale, préférentiellement exprimée dans le système noradrénergique, a été associée aux pathologies psychiatriques. Cependant son rôle dans la résilience au stress reste à identifier. Des études préliminaires montrent que les niveaux d'expression de cette protéine dans le système noradrénergique sont différents entre animaux susceptible et résilient au stress de défaite sociale chez la souris.

Dans cette étude, nous voulons faire le lien entre les niveaux d'expression de SV2C, l'intégrité du système noradrénergique et la réponse comportementale à un stress chronique de défaite sociale. Pour cela nous utiliserons une approche comportementale dans le but d'étudier la vulnérabilité au stress chronique de défaite sociale, une approche pour manipuler les niveaux d'expression de la protéine d'intérêt ainsi que des techniques d'imagerie calcique, d'immunohistochimie et de biologie moléculaire pour étudier l'intégrité du système noradrénergique en fonction de la susceptibilité au stress. Ces études seront menées sur un total de 1265 souris sur une période de 5 ans.

L'objectif final de ce projet est de mettre en évidence de nouveaux biomarqueurs qui pourront servir de nouvelles cibles thérapeutiques pour la prévention et le traitement de pathologies psychiatriques telles que la dépression majeure, qui représente la première cause d'invalidité dans le monde.

Dans le respect de la règle des '3R', les différentes procédures expérimentales ont été consciencieusement pensées et élaborées. Réduire : Le nombre d'animaux par lot a été choisi de façon adéquate à celui généralement utilisé dans la littérature pour les mêmes paradigmes expérimentaux. Nous utiliserons le moins d'animaux possible, tout en permettant d'obtenir des résultats statistiquement satisfaisants. Raffiner : Afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux, des points limites ont été établies pour chaque procédure. Les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale et des protocoles analgésiques seront mis en place pour limiter la douleur des animaux. Remplacer : Seule l'expérimentation in vivo, permettant d'étudier les conséquences moléculaires et cellulaires du stress et mettre en évidence des comportements anxio-dépressifs, nous permettra de répondre à notre question. La dépression et l'anxiété sont des pathologies psychiatriques qui sont à l'origine de mécanismes physiopathologiques qui perturbent sélectivement certains aspects de l'organisation cérébrale et ces mécanismes par nature ne peuvent être modélisés et étudiés in vitro. L'objectif de ce projet de recherche étant d'étudier l'émergence de troubles psychiatriques en réponse au stress, les procédures expérimentales ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information.

19009 La carence alimentaire en vitamine A au cours de la période périnatale reste un enjeu majeur de santé publique dans les pays en voie de développement. En effet, l'acide rétinoïque (AR), métabolite actif de la vitamine A reste indispensable au développement cérébral du fœtus et du nouveau-né et joue un rôle important dans les processus cognitifs chez l'adulte. Ainsi, un apport insuffisant en vitamine A durant cette période peut conduire à des déficits cognitifs avec apparition de certaines pathologies neurodéveloppementales comme l'autisme chez le nouveau-né. Cependant les mécanismes neurobiologiques sous-jacents restent à élucider. Ce projet apportera des connaissances importantes sur le rôle de la vitamine A dans les fonctions cérébrales, et permettra d'ouvrir de nouvelles pistes thérapeutiques pour prévenir certaines pathologies neurodéveloppementales liées à des apports insuffisants en vitamine A et de mieux définir les programmes de supplémentation en vitamine A pendant cette période périnatale. Afin de valider le modèle de carence en vitamine A gestationnelle chez la souris, nous réaliserons dans un premier temps une expérience pilote qui nous permettra d'étudier l'effet de différents niveaux d'apports nutritionnels en vitamine A durant cette période sur le statut en vitamine A des souris femelles reproductrices et de leur descendance à l'âge adulte.

Nous utiliserons dans cette étude pilote 42 souris reproductrices générant une descendance mâle et femelle estimée à 90 animaux ce qui fait un total de 132 animaux.

Dans ce projet, nous veillerons à respecter la règle des 3R:

Remplacer : Le modèle de souris soumis à différents régimes de vitamine A permet l'étude intégrée de la nutrition sur des aspects du fonctionnement du système nerveux central qu'il n'est pas possible de remplacer par des approches cellulaires et par des simulations bio-informatiques.

Réduire : Tous les efforts seront faits pour réduire le nombre de groupes d'animaux. En minimisant le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir des résultats concluants et permettre des comparaisons statistiques fiables, nous estimons que 30 souris femelles et 10 souris mâles reproductrices seront nécessaires afin de mener à bien le projet.

Raffiner : Les souris seront hébergées tout au long de leur vie en cage collective avec un environnement enrichi dans une animalerie comportant une régulation de la température, de l'hygrométrie et du cycle jour/nuit. Les souris recevront de l'eau et de la nourriture à volonté, elles seront changées toutes les semaines et elles seront observées tous les jours par un personnel qualifié. Au cours de ces observations, si un animal présente des blessures, il sera immédiatement soigné et surveillé deux fois par jour. Si un animal présente un comportement anormal traduisant un état de mal être (perte de poids, poils hérissés, prostration...), il sera surveillé.

19010 Une carcinose péritonéale peut se développer consécutivement à un cancer primitif d'origine ovarienne, colique ou gastrique. Les cellules vont se disséminer pour former des foyers tumoraux (=nodules) sur le péritoine (membrane séreuse qui recouvre la paroi abdominale et les viscères).

La carcinose péritonéale correspond alors à un stade très avancé de la maladie, la médiane de survie des patients est de seulement quelques mois. Le traitement utilisé actuellement consiste à retirer par chirurgie l'ensemble des nodules visibles et à appliquer une chimiothérapie locale chauffée à 42°C dans la cavité abdominale au contact du péritoine. Ce traitement, permettant d'augmenter la survie des patients, induit cependant des taux de mortalité et de morbidité élevés. En effet, lors de l'exérèse des foyers tumoraux, le péritoine ainsi lésé permet la dissémination des cellules tumorales dans la paroi abdominale. Ainsi, les cellules sont libres d'adhérer à la cavité péritonéale et de proliférer pour y former de nombreux nodules.

L'objectif de ce projet est d'étudier un traitement préventif sous forme d'un gel inhibant l'adhésion des cellules tumorales et contenant un agent chimiothérapeutique. Des tests préliminaires sur des lignées cellulaires et sur les souris ont permis de montrer la validité de notre stratégie thérapeutique. Afin de pouvoir proposer cette alternative au patient, des tests complémentaires sur des gros animaux sont nécessaires.

Dans une première partie de l'étude, les animaux anesthésiés et sous ventilation contrôlée recevront le gel par cœlioscopie. Le suivi de la distribution du gel ainsi que son innocuité seront évalués. Dans un second temps, une étude similaire sera réalisée après laparotomie pour estimer le risque de fistule consécutive au dépôt du gel. L'ensemble des expériences nécessitera 12 porcs femelles adultes et se déroulera sur 5 ans.

Nous mettrons tout en œuvre pour respecter le principe des 3R.

Remplacement :

Nous avons préalablement évalué par des expériences in vitro plusieurs gels afin de ne tester chez l'animal que celui qui s'est avéré le moins toxique. Ce modèle animal a été choisi car sa surface abdominale est comparable à celle de l'homme.

Réduction : Le nombre d'animaux est le plus limité possible pour ne pas conclure par hasard à un effet positif ou négatif.

L'implantation des cellules tumorales survient pendant la chirurgie, lors de la formation de fibrine et si les cellules ne se sont pas implantées dans les 4 jours suivant, il est postulé qu'elles seront éliminées par le système immunitaire du patient. Donc l'étude est limitée à 4 jours pour voir si le gel est resté bien réparti sur les premiers jours post opératoire. Cela permet de réduire la durée de l'expérience.

Raffinement : Pour réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse des porcs, un enrichissement du milieu sera ajouté. Toutes les procédures sont réalisées en utilisant des protocoles antalgiques et anesthésiques adaptés. Les porcs seront observés tous les jours par la personne responsable du bien-être des animaux et des points limites ont été spécifiquement développés pour chaque procédure. La fréquence d'observation de ces points limites est réalisée deux fois par jour par l'animalier.

Durant toute la durée du projet, les animaux seront hébergés en respectant les besoins de leur espèce, et manipulés par un personnel qualifié afin de leur assurer un bien être optimum.

Ainsi, une étude complète de l'innocuité du gel et de sa localisation permettra le transfert de cette stratégie thérapeutique chez l'homme.

Les indications potentielles de cette chimiothérapie préventive seraient chez l'homme : 1/ mise en place du gel en cas de tumeur perforée pendant la chirurgie que la perforation soit spontanée ou induite par la prise en charge (stent colique ou geste chirurgical) 2/ mise en place du gel en cas de carcinose probable dans les suites comme après exérèse d'une toute petite carcinose d'un cancer du côlon, ou de métastases ovariennes d'un cancer du côlon ou de l'estomac 3/ mise en place du gel en cas d'exérèse d'une tumeur volumineuse T4 pouvant évoluer vers une carcinose d'un cancer du côlon ou de l'estomac ; 4/ mise en place du gel en cas d'exérèse d'une tumeur ovarienne avec ou sans carcinose synchrone.

19011 Les traumatismes de la moelle épinière (contusion médullaire) sont fréquents et graves, et leurs conséquences sont lourdes. Il n'existe pas pour le moment de traitement permettant aux patients

traumatisés de récupérer totalement des déficits fonctionnels engendrés par la lésion spinale. Plusieurs travaux récents chez l'animal ont montré que les cellules souches pouvaient entraîner des récupérations fonctionnelles. Toutefois, dans le cadre des lésions médullaires, l'intérêt thérapeutique de la fraction vasculaire stromale (FVS) issue de la graisse (tissu adipeux) connue pour son potentiel thérapeutique dans de nombreux domaines n'a pas été reporté. L'objectif de cette étude vise donc à évaluer par imagerie par résonance magnétique (IRM) les effets protecteurs et réparateurs de la FVS dans les premiers jours suivants une contusion médullaire.

Pour cela, 24 rats de 250 grammes d'un modèle de contusion médullaire validé et fourni par notre collaborateur seront nécessaires pour mener à bien ce projet. Ces 24 rats seront repartis en 4 groupes : 6 rats sans contusion, 6 rats avec contusion 6 rats avec contusion et injectés avec le solvant de la FVS, 6 rats avec contusion et injectés avec la FVS. Ce nombre a été jugé suffisant pour faire la preuve de concept afin de proposer lors de la prise en charge des blessés médullaires une thérapie limitant les déficits post-traumatiques. Les rats seront imagés par IRM sous anesthésie générale, une compresse humide et du gel oculaire (Ocrygel) seront appliqués sur les yeux pour protéger les cornées de l'animal. Il s'agit d'une procédure légère, qui sera répétée trois fois (J1, J7 et J21 après la contusion médullaire). Ce protocole d'imagerie s'inscrit dans une démarche de réduction du nombre d'animaux et de raffinement (imagerie). Les rats seront hébergés dans un milieu adapté avec enrichissement, des antalgiques seront utilisés en pré- et post-chirurgie, les animaux seront suivis au quotidien par un personnel formé compétent. La lésion médullaire, ainsi que le traitement par l'injection FVS autologue reste un modèle très complexe pour lequel les modèles *in vitro* actuels ne permettent pas de prendre en compte tous les paramètres.

Ce projet a pour but de mieux caractériser le modèle de contusion médullaire *in vivo* par imagerie IRM du petit animal, gold standard utilisé en imagerie humaine pour la caractérisation d'une lésion médullaire. In fine, nous souhaitons faire la preuve de concept d'une thérapie limitant les déficits post-traumatiques, pouvant être proposée lors de la prise en charge des blessés médullaires.

19012 Depuis le début des années 1980, le développement des biotechnologies a permis la construction génétique de bactéries qui peuvent ainsi exprimer différents gènes. Parmi ces bactéries, *Pseudomonas aeruginosa* semble représenter un bon candidat, de par ses propriétés métaboliques bien connues et son génome de grande taille qui reste un des mieux annotés du monde microbien. Cette dernière caractéristique représente un avantage considérable pour la modification génétique et l'optimisation de cette souche comme plateforme biologique pour la production de protéines recombinantes.

En raison de son appartenance au niveau 2 de sécurité microbiologique, ce microorganisme ne peut donc pas être utilisé à des fins biotechnologiques comme tel, ou limite son utilisation aux laboratoires équipés en conséquence.

Afin de rendre cette bactérie inoffensive, une société s'est lancée dans la construction d'une souche atténuée nommée SM54 (« bactérie verte »), dérivée de la souche de référence de *P. aeruginosa* PAO1, afin de la proposer sur le marché de la bio-production. Ainsi, les principaux gènes de virulence ont été supprimés du génome de PAO1 par des techniques de biologie moléculaire. De la même manière, l'essentiel des gènes pouvant conférer de la résistance aux antibiotiques a été éliminé. Toutes ces délétions ont rendu la souche « verte » hypersensible aux antibiotiques utilisés en clinique et 82 % moins cytotoxique.

Des premiers tests de virulence *in vivo* sur le modèle *Galleria mellonella* ont été effectués et ont montré une diminution de 50 % de la pathogénicité du mutant SM54 par rapport à PAO1, après 24 h d'infection. Ce modèle de larve est un bon indicateur de la virulence, mais il ne possède cependant qu'une immunité innée. Pour se rapprocher au mieux de la réaction immunitaire observée chez l'Homme (immunité innée et adaptative), les tests de virulence sur le modèle murin sont envisagés afin d'étudier l'impact du mutant SM54 sur le système immunitaire, en comparaison avec la souche parentale PAO1. Pour cela, les deux souches seront testées dans un modèle de sepsis et 50 souris CD1 seront nécessaires pour la mise en œuvre de ce projet.

Il se découpera en deux phases :

- Phase pilote permettant de définir la DL100 de la souche parentale PA01, permettant d'obtenir 100 % de mortalité sur 48h.
- La deuxième phase permettant de comparer la souche mutante SM54 à la souche parentale PA01 avec l'inoculum défini dans la phase pilote.

Dans le cadre de cette étude, une attention particulière sera portée au respect à la règle des 3R. Le nombre d'animaux nécessaires pour répondre aux hypothèses et permettre une analyse statistique robuste a été réduit à 5 pour 2 groupe de la phase pilote (au lieu de 10) grâce aux résultats acquis lors des études précédentes. Des analyses in vitro et même in vivo, sur une larve ont déjà été réalisées, toutefois ces études ne permettent pas de conclure sur la pathogénicité du mutant SM54 ne pouvant être que caractérisé sur des modèles pré-cliniques murins (possédant un système immunitaire très proche de celui de l'Homme) ; c'est pourquoi aucune stratégie de remplacement ne peut être envisagée. Enfin, un enrichissement du milieu (jouets en plastique, igloos en carton) sera utilisé et une surveillance accrue sera également réalisée pour cette étude (raffinement).

19013 L'objectif du présent projet est de déterminer si l'administration intranasale de dérivés de la Créatine permet de ralentir ou de stopper la souffrance et la mort neuronale dans le contexte pathologique de la maladie de Parkinson.

L'altération des mitochondries (unités de production énergétique sous forme d'ATP) dans les neurones est une caractéristique de la maladie de Parkinson, une maladie neurodégénérative caractérisée par la perte préférentielle de neurones dopaminergiques dans la substance noire pars compacta conduisant à une déplétion striatale de la dopamine et à une altération fonctionnelle des réseaux neuronaux impliqués dans le contrôle du comportement moteur. Pour lutter contre l'altération mitochondriale et le déficit énergétique des neurones à des fins thérapeutiques, plusieurs stratégies ont été envisagées dont celles visant à apporter une source complémentaire d'ATP sous la forme de Phospho-Créatine produite à partir d'une supplémentation en Créatine monohydrate administrée par voie orale.

Des études précliniques antérieures menées sur des modèles animaux de la maladie de Parkinson ont montré que la supplémentation en Créatine par voie orale pouvait être neuroprotectrice en améliorant le taux de production d'ATP dans les neurones sujets à une altération mitochondriale. Toutefois, les essais cliniques chez les patients atteints de maladie de Parkinson qui ont découlé de ces études ont été plutôt décevants, montrant peu ou pas d'amélioration de la maladie sous traitement à la Créatine par voie orale. Une explication plausible de cet échec est la faible disponibilité cérébrale à des doses saturantes de la forme classique monohydratée de la Créatine dans ces essais.

De nouveaux dérivés ou pro-drogues de la Créatine ont été synthétisés (en particulier l'ester dodécyl de créatine ; DCE) et montrent de meilleures performances pharmacocinétiques globales. Le DCE en particulier présente une meilleure disponibilité cérébrale notamment en administration intranasale. Nous proposons donc d'évaluer l'efficacité de neuroprotection et de neurorestauration de ces nouveaux dérivés dans des modèles expérimentaux de la maladie de Parkinson chez la souris.

A travers ce projet, nous espérons obtenir des résultats expérimentaux qui permettront de valider ou non l'utilisation de ces nouvelles molécules dans des essais cliniques chez l'homme.

Type d'animaux :

Souris mâles adultes (10-12 semaines)

Nombre d'animaux :

Nous estimons utiliser 480 souris.

Respect de la règle des 3R (Remplacement-Réduction-Raffinement) :

Remplacement:

Le projet que nous souhaitons mener repose sur diverses approches expérimentales complémentaires. En outre, l'identification, le développement et la validation des méthodes

permettant de tester l'engagement de la cible sera réalisée à l'aide de modèles in vitro de cellules en culture. Ces modèles in vitro constituent un axe important du projet et leur étude apporteront des éléments précieux qui permettront de réduire au maximum l'utilisation d'animaux. Toutefois, l'un des objectifs importants du projet est de tester si l'administration intranasale des molécules thérapeutiques permettra une meilleure disponibilité cérébrale de ces molécules. La complexité anatomique des voies de communication entre le compartiment nasal et le cerveau est difficilement modélisable in vitro. Nous devons donc avoir recours à des systèmes intégrés afin de tester et valider nos hypothèses.

Réduction: Nous utiliserons le nombre minimum d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Compte tenu des données de la littérature (variabilité attendue) et des effets espérés, un test de puissance statistique a été utilisé pour déterminer le nombre minimum d'animaux nécessaire pour cette étude.

(Utilisation d'un logiciel en accès libre pour de calcul de puissance statistique).

Raffinement: Toutes les mesures pour réduire la douleur et la souffrance des animaux seront prises lorsque les impératifs scientifiques le permettront (chirurgie en condition aseptiques strictes et sous anesthésie, antalgiques pré- et post-opératoires, hébergement contrôlé et enrichi aux maximum des possibilités, temps d'acclimatation et de récupération respectés).

19014 Les parodontites sont des maladies inflammatoires d'origine infectieuse conduisant à la destruction irréversible du parodonte, c'est-à-dire de l'ensemble des tissus de soutien des dents dont les principaux constituants sont la gencive et l'os alvéolaire. Ces maladies sont très fréquentes et peuvent affecter tous les individus, quel que soit leur âge. En France, on estime que 80 % des adultes entre 35 et 44 ans souffrent de maladies parodontales. Beaucoup estiment à tort cette situation inéluctable et se résignent à porter vers 60 ans un "dentier".

Des études récentes mettent en évidence les rapports entre parodontite et santé générale. Ainsi, les patients atteints de parodontite ont un risque d'atteinte cardiovasculaire accru de 25 % lié à l'oblitération des artères par modification des parois vasculaires (phénomène nommé athérosclérose). Les complications liées à l'athérosclérose telles que l'infarctus du myocarde et les accidents vasculaires cérébraux (AVC) représentent la principale cause de mortalité dans le monde. Jusqu'à très récemment, la prévention s'est focalisée sur la prise en charge de facteurs de risque classiques tels que l'hypertension artérielle, le diabète et l'hypercholestérolémie et en négligeant d'autres facteurs de comorbidités comme la santé bucco-dentaire et parodontale en particulier.

De nombreuses études pré-cliniques et cliniques ont pu mettre en évidence le lien entre parodontite et AVC, cependant aucun lien causal n'a pu être démontré. Alors que les mécanismes d'action restent méconnus, il est accepté de façon consensuelle que les germes parodontaux et en particulier *Porphyromonas gingivalis*, la principale bactérie parodontale, peuvent passer dans la circulation sanguine. Ce passage de bactérie dans le sang, nommé bactériémie, est silencieuse, transitoire et se produit de façon répétée principalement au cours des traitements bucco-dentaires mais aussi lors de gestes de la vie courante (mastication, lavage de dents...). De plus, la parodontite est associée à une inflammation systémique de faible intensité qui entraîne l'augmentation de protéines de l'inflammation diffusées dans le sang et cruciales sur le développement d'évènements cardiovasculaires.

Notre hypothèse est que la parodontite via l'inflammation et les bactériémies chroniques auxquelles elle est associée serait un facteur de risque de la sévérité d'un AVC et de sa récupération.

Notre objectif est d'étudier i) l'impact d'une parodontite expérimentale avec infection à *Porphyromonas gingivalis* sur l'aggravation des dommages tissulaires lors d'un AVC via son effet sur la rupture de la barrière hémato-encéphalique (vaisseaux cérébraux imperméables qui séparent le tissu cérébral de la circulation sanguine) ou la réponse inflammatoire et ii) l'effet potentiel de la parodontite sur la récupération du cerveau post-AVC.

Pour ce, nous souhaitons développer une recherche sur modèle expérimental chez le petit animal, car c'est le seul moyen à l'heure actuelle pour étudier les différents aspects de notre projet. Il n'existe pas d'autres méthodes alternatives (in vitro, in silico) pour l'étude des parodontites et de ses liens

avec l'AVC, et la souris est l'espèce la plus couramment utilisée pour l'étude de cette maladie. La parodontite expérimentale sera développée pendant 15 jours avant de réaliser le modèle d'AVC. Pour induire la parodontite expérimentale, nous allons insérer un fil imprégné de la bactérie *Porphyromonas gingivalis* entre la dent (les quatre molaires) et la gencive chez l'animal anesthésié. Le fil irrite la paroi interne de la gencive et favorise la pénétration des bactéries buccales et l'inflammation chronique du parodonte. Un suivi longitudinal de la perte osseuse induite sera réalisé par imagerie. Les animaux seront anesthésiés pour éviter toute souffrance. Des antalgiques sont prévus et des points limites ont été établis entraînant la mise à mort anticipée si nécessaire. Le nombre de souris a été réduit au minimum.

Ce projet va se dérouler pendant 1 an, requiert 40 animaux et prendra en compte la règle des 3R :

Remplacement : nous développons une recherche sur modèle expérimental chez le petit animal, car c'est le seul moyen à l'heure actuelle d'étudier les différents aspects de notre projet. Il n'existe pas d'autres méthodes alternatives (in vitro, in silico) pour l'étude des parodontites et de ses liens avec l'AVC, et la souris est l'espèce la plus couramment utilisée pour l'étude de cette maladie.

Réduction : le nombre d'animaux estimé et les tests statistiques sont basés sur notre expérience pour ce type d'étude. Ce nombre minimum nous permettra d'être certains de répondre aux questions scientifiques de ce projet et de mettre en évidence des différences significatives entre les groupes.

Raffinement : cette procédure est réalisée sur des souris ne présentant pas d'altération évidente. Le suivi quotidien des animaux et la mise en place de points limites permettront d'identifier et de limiter toute souffrance et douleur, d'abord par des antalgiques et par une mise à mort anticipée selon les méthodes réglementaires, si nécessaire. Les animaux seront hébergés en groupe en milieu enrichi pour minimiser leur stress.

La mise en place de ce projet chez la souris pourrait à moyen et long terme permettre la mise en place de nouvelles recommandations visant à améliorer la prise en charge de la maladie parodontale chez les patients qui ont un AVC et plus largement chez les patients à haut risque cardiovasculaire.

19015 Il arrive que le système immunitaire réagisse contre l'organisme lui-même, entraînant des réactions inflammatoires chroniques pouvant mener à des dommages d'organes pouvant être mortels. On parle alors de maladie auto-immune. Le lupus érythémateux systémique est une maladie auto-immune rare qui affecte principalement des femmes jeunes. Sans être formellement identifiés, les facteurs menant au développement de la maladie sont d'origines hormonales (surtout les femmes), génétiques (prédisposition) et environnementales (pollution, infections virales et exposition au soleil). Dans le lupus, des anticorps dirigés contre l'organisme du patient (autoanticorps) forment des complexes qui vont initier les réactions inflammatoires chroniques dans les organes ciblés pouvant aboutir à la perte de leur fonction. Le lupus peut atteindre différents organes tels que la peau, les articulations, le système nerveux central ou encore les reins. L'atteinte rénale est appelée néphropathie lupique (NL), touche 30 à 50% des patients et peut être mortelle si elle n'est pas traitée. Aucun traitement spécifique n'existe et les poussées de la maladie sont maîtrisées par des traitements immunosuppresseurs lourds qui ont des effets secondaires importants. Il y a un réel besoin de développer de nouvelles approches thérapeutiques empêchant le développement des atteintes d'organes graves de cette maladie.

Les basophiles sont des cellules du système immunitaire connues pour leur rôle dans les infections parasitaires et les allergies. Les basophiles amplifient la production des autoanticorps dans le lupus en soutenant les cellules responsables de leur production (les lymphocytes B). Pour pouvoir amplifier la synthèse des autoanticorps, les basophiles ont besoin de s'accumuler là où les lymphocytes B sont (dans les ganglions lymphatiques). Cette accumulation des basophiles dans les ganglions dépend des récepteurs à la prostaglandine D2 (ou PGD2). La PGD2 est une molécule lipidique produite au cours de l'inflammation qui peut avoir des effets à la fois pro-inflammatoires (en recrutant des cellules inflammatoires sur le site de l'inflammation) et anti-inflammatoires (en favorisant la cicatrisation par exemple). Deux récepteurs pour la PGD2 ont été décrits. Les

basophiles font partie des rares cellules exprimant ces deux récepteurs, et les basophiles des patients lupiques surexpriment ces deux récepteurs, favorisant leur accumulation dans les ganglions, et donc l'amplification de la maladie. Le blocage de ces deux récepteurs a été montré comme étant efficace pour diminuer la NL dans deux modèles distincts de lupus murin. Cette approche thérapeutique innovante dans le lupus pourrait mener à développer un traitement spécifique et dépourvu d'effet secondaire pour les patients lupiques. Il existe plusieurs molécules bloquant ces récepteurs (antagonistes) disponibles sur le marché dont, pour certains, l'utilisation est déjà approuvée chez l'humain dans d'autres indications (allergies).

Avant de pouvoir développer cette approche dans le lupus au cours d'essais cliniques chez l'humain, il est nécessaire d'identifier quelles combinaisons d'antagonistes sont les plus prometteuses, et ce dans un modèle murin reproduisant au mieux les caractéristiques de la maladie humaine.

Le but du projet est de comparer les effets thérapeutiques d'un double antagoniste (qui bloque en même temps les deux récepteurs de la PGD2) et deux combinaisons d'antagonistes simples des deux récepteurs à la PGD2. L'efficacité de ces approches seront comparées à un traitement connu pour fonctionner dans le modèle murin utilisé (cyclophosphamide). Ce dernier est efficace et utilisé chez l'humain mais entraîne une ménopause précoce à fortes doses ce qui est très problématique puisque 90 % des patients sont des femmes en âge d'enfanter.

Le modèle génétique de lupus utilisé ici entraîne le développement du lupus rénal chez les souris spontanément aux alentours de 15 semaines d'âge. Une fois la maladie rénale installée, les souris seront traitées avec les traitements candidats et l'évolution rénale des souris au bout de 10 jours sera évaluée.

Les interventions sur les animaux concernés se limiteront aux actes suivants :

- Un seul prélèvement sanguin sur animaux anesthésiés par voie rétro-orbitale, et collecte d'urines avant le début du traitement sera réalisé.
- administration des composés thérapeutiques par injection intrapéritonéale aux souris vigiles (4 injections réparties sur 10 jours) ou par voie orale par gavage (une fois par jour pendant 10 jours) sur souris vigiles également.

Le projet respecte la règle des 3R.

Remplacement des modèles animaux : De par la complexité de la maladie autoimmune étudiée, il n'existe aucune alternative à l'utilisation de modèles animaux développant eux-mêmes la maladie. Le modèle animal utilisé permettra de valider les nouvelles approches thérapeutiques identifiées afin de transférer nos découvertes aux patients.

Réduction du nombre d'animaux : L'étude de cellules humaines ex vivo et l'analyse des échantillons de patients a permis de réduire les hypothèses de travail et ainsi de limiter le recours aux modèles animaux. Sur un plan statistique, afin de pouvoir conclure, 5 animaux par groupe expérimental/contrôle sont utilisés. Si, et seulement si, une tendance justifiant d'être confirmée sur un nombre plus important d'individus est constatée, alors le nombre d'animaux par groupe pourra être amené à 10 maximum. Si la significativité statistique est atteinte avec 5 animaux par groupe, nous ne serons pas amenés à augmenter ce nombre.

Notre projet aura une durée de 2 ans et utilisera un maximum de 60 animaux répartis dans 6 groupes (souris contrôles non traitées ; souris malades non traitées ; souris malades traitées avec le double antagoniste ; souris malades traitées avec le cyclophosphamide ; et deux groupes traités avec des combinaisons différentes d'antagonistes simples). Le but des études chez la souris est de pouvoir conclure sur la validité de nos approches thérapeutiques et d'identifier les composés les plus adaptés pour la pathologie humaine.

Raffinement : Tous les animaux seront observés quotidiennement par le personnel compétent de l'animalerie. L'état général des animaux sera suivi sur une grille de score permettant de déterminer l'atteinte ou non de points limites correspondant à une altération trop marquée des animaux. En cas d'atteinte de ces points limites, les animaux concernés seraient euthanasiés immédiatement.

Les animaux sont élevés en conditions standardisées en accord avec la réglementation en vigueur. L'enrichissement de l'environnement des souris dans les cages (cotons de nidification ou tunnels en plastiques...) permet d'optimiser le bien-être des animaux. Les procédures dureront 16 semaines maximum (souris âgées de 16 semaines au maximum en fin de procédure). Tous les animaux seront euthanasiés en fin de procédure pour analyse des paramètres des pathologies.

19016 Chez le poulet, les réserves énergétiques sont essentielles au bon fonctionnement du muscle et à la qualité de la viande. Au niveau du muscle du filet, elles sont essentiellement constituées par le stock de glycogène utilisé pendant la vie de l'animal, puis dégradé au cours des quelques heures après la mort en acide lactique. Le stock de glycogène disponible *in vivo* conditionne ainsi l'acidité finale de la viande (évaluée par le pH ultime) et sa qualité technologique. Le contenu en glycogène musculaire et le pH ultime de la viande de poulet sont génétiquement fortement reliés et des voies métaboliques ainsi que des gènes candidats contrôlant ces paramètres ont d'ores et déjà été identifiés au niveau musculaire. Des travaux récents menés chez la souris ont par ailleurs montré qu'une élimination du microbiote, perturbant la digestion des aliments, diminuait les réserves du muscle en glycogène et sa résistance à l'effort. Des premiers mécanismes liés à la digestion ou à l'absorption des sucres et des lipides ont été mis à jour dans cette espèce modèle. Nous souhaitons donc mieux comprendre le rôle du métabolisme digestif dans l'élaboration des réserves en glycogène musculaire et la qualité de la viande chez le poulet. Ces travaux s'appuieront sur l'étude de deux lignées de poulet présentant des niveaux de glycogène musculaire contrastés. Ils pourraient ouvrir la voie à de nouvelles approches visant à améliorer l'assimilation des nutriments pour une meilleure intégrité musculaire et qualité de la viande. L'approche expérimentale s'appuiera sur la caractérisation de phénotypes musculaires, digestifs et sanguins dans les deux lignées et l'étude à haut-débit des gènes et voies métaboliques impliqués dans les différences observées. Elle implique une prise de sang (procédure expérimentale 1) pour le dosage de métabolites (sucre, acides aminés, lipides. . .), afin de faire le lien entre les processus de digestion/absorption et l'utilisation métabolique des nutriments. 60 animaux seront utilisés pour le projet.

REMPACEMENT : Compte-tenu de l'objectif scientifique du projet qui vise à une meilleure compréhension du rôle du métabolisme digestif dans l'élaboration des réserves en glycogène musculaire, le modèle animal ne peut être substitué par des modèles d'étude *in vitro* qui ne permettraient pas de prendre en compte les réponses sur l'animal entier. Outre leurs conséquences sur la qualité de la viande, les réserves énergétiques peuvent avoir un impact sur la robustesse de l'animal, leur diminution dégradant notamment la qualité du poussin. La compréhension de la mise en place de ces réserves chez l'animal peut donc avoir des retombées positives sur la qualité du produit mais également sur la gestion par l'éleveur de phases critiques telles que le démarrage.

REDUCTION : Un relativement faible nombre d'animaux sera considéré (30 animaux par lignée). Nous le jugeons suffisant pour la caractérisation phénotypique des lignées (incluant les volets digestif, sanguin et musculaire) et mettre en évidence les mécanismes impliqués grâce aux approches à haut-débit utilisées.

RAFFINEMENT : Les animaux seront élevés en faible densité en groupe et au sol, sur un lit de copeaux et auront accès à des perchoirs de type « Perch'up ® », composés de 3 plateaux empilables. Ces perchoirs disposent d'une faible hauteur qui permet aux poussins de se percher dès leur deuxième jour de vie et de constituer un véritable refuge. Les animaux auront la possibilité d'explorer l'ensemble de la zone d'élevage dès un jour. Au sein du parquet, la densité sera inférieure au maximum autorisé. Les conditions d'élevage (température, ventilation, hygrométrie...) seront adaptées et surveillées quotidiennement avec une alimentation et un abreuvement *ad libitum*.

19017 L'objectif de notre société est de proposer, à façon, la synthèse d'anticorps monoclonaux dirigés contre différents types de cibles, protéines, peptides, acides aminés et leurs métabolites, sucres, acides gras, etc. La synthèse d'anticorps rentre dans un cadre de prestation de service que nous proposerons à nos clients. Ces anticorps permettront de détecter et/ou quantifier une cible sur un élément biologique grâce à l'utilisation de méthodes d'immuno-détection. D'autre part, les anticorps représentent des outils thérapeutiques en pleine croissance ; notamment en immuno-oncologie.

Les expériences seront réalisées dans les meilleures conditions éthiques en respectant la règle des 3Rs (Réduire, raffiner, remplacer) et conformément à la législation en vigueur. Afin de limiter le nombre de souris, les groupes seront constitués de 10 individus pour obtenir des réponses immunitaires permettant d'aboutir au moins à 1 ou 2 animaux producteurs d'anticorps, évitant ainsi de réitérer une étude.

A la fin de l'immunisation, la rate des souris sera prélevée pour collecter les lymphocytes et générer une lignée cellulaire hybride productrice d'anticorps. Celle-ci sera amplifiée, congelée et conservée. Elle constituera alors une source infinie d'anticorps. La réduction et le remplacement dans le cas des anticorps monoclonaux, représentent une réalité, car avec une souris positive nous créerons une lignée cellulaire et travaillerons ensuite in vitro pour la production des anticorps.

Afin de limiter leur stress, les souris seront hébergées en cages de 5 individus sur une litière de peuplier dans des conditions veillant au respect de leur bien-être et avec un milieu enrichi par de la frisure de peuplier. Ils seront suivis quotidiennement afin de détecter tout inconfort ou souffrance. Une étroite collaboration entre le personnel de l'animalerie et notre équipe d'expérimentateurs permettra d'intervenir immédiatement sur les animaux en cas de nécessité.

10 études par an utilisant chacune 10 souris sont envisagées, ce qui représente un total de 500 animaux pour une durée de 5 ans.

19018 Le cadre général de notre étude est l'évaluation de nouveaux outils pharmacologiques pour combattre l'obésité et ses complications métaboliques, en particulier le diabète non-insulinodépendant. Les cibles choisies sont les récepteurs MC4R et MC3R. Ces deux récepteurs sont exprimés dans l'hypothalamus, une région cerveau qui contrôle la faim et la dépense énergétique. Leur activation par leur ligand endogène joue un rôle crucial dans l'homéostasie énergétique et le contrôle du poids corporel. Chez l'homme, les mutations entraînant une perte de fonction de MC4R sont présentes chez environ 6 % des sujets porteurs d'obésité monogénique.

L'objectif de l'étude est d'évaluer l'effet anti-obésité d'anticorps de camélidé (sdAb « single domain antibody ») ayant la capacité d'activer les récepteurs MC4R et MC3R dans des modèles murins d'obésité. Compte tenu des rôles bien établis de MC4R et MC3R dans le contrôle du métabolisme énergétique, l'évaluation phénotypique des souris se concentrera sur l'évaluation de la prise alimentaire, du poids corporel et de la masse grasse et de l'homéostasie glucidique.

Vis à vis de la règle des 3R, les modèles « in vivo » sont requis pour permettre l'étude de l'effet de composés pharmacologiques dans les processus physiologiques et physiopathologiques (prise de poids, prise alimentaire, homéostasie glucidique) liés à l'obésité et au diabète de type 2 et sa résolution. Pour chaque expérience, nous utiliserons 20 souris réparties en 3 groupes. Pour l'ensemble du projet, nous prévoyons de réaliser 4 expériences, ce qui nécessitera 80 souris. Par rapport à la réduction du nombre d'animaux, ce protocole expérimental correspond au nombre minimal de groupes et de souris nécessaires pour obtenir des résultats scientifiquement pertinents et statistiquement fiables. 6 à 7 souris par groupe est un nombre minimal, compte tenu de la variabilité interindividuelle des paramètres mesurés. Les souris sont réparties en 6 cages comportant 3 et 4 souris pour permettre une interaction sociale et hébergées en conditions contrôlées (cycle jour/nuit de 12h/12h, température de 23°C, cage ventilée). L'eau et la nourriture sont en libre accès tout au long de l'expérience, sauf pour les tests d'homéostasie glucidique pour lesquels les souris seront mises à jeun pendant 6 h. Afin d'enrichir le milieu, les souris disposent d'une maison et de fils de cartons afin de pouvoir se cacher et faire un nid.

Deux modèles murins d'obésité bien caractérisés dans l'équipe seront utilisés : 1) des souris lep/lep porteuses d'une mutation dans le gène de la leptine apparue spontanément dans les élevages dans les années 60 et conservée depuis. Cette mutation entraîne un phénotype d'obésité sévère, sans altération notable du comportement à l'exception d'une hyperphagie. 2) des souris nourries avec un régime hyperlipidique visant à induire une obésité nutritionnelle. Ce type de régime est bien toléré chez les rongeurs et induit une obésité de sévérité variable, avec altération de l'homéostasie glucidique.

En ce qui concerne le raffinement du protocole, l'ensemble des manipulations seront effectuées à l'aide d'un matériel et de procédures adéquates, par techniciens expérimentés. Un suivi quotidien de prise alimentaire et du poids sera réalisé, ce qui permet, en plus d'obtenir des données expérimentales, de s'assurer du bon état de santé des animaux ainsi que de les habituer aux manipulations et ainsi de générer moins de stress lors des procédures ultérieures (tests de tolérance au glucose et de sensibilité à l'insuline). De plus, un laps de temps de minimum 5 jours entre ces procédures de classe modérée sera respecté afin de laisser un temps de récupération aux animaux.

19019 La formation au métier de chirurgien, tant en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire requiert, à la différence de nombreuses disciplines médicales, un enseignement technique nécessaire à l'accomplissement des interventions chirurgicales. L'avènement des nouvelles techniques de communications et les progrès des ressources audiovisuelles ont permis de grands progrès éducatifs. Cependant, la chirurgie reste un domaine technique où aucun apprentissage théorique ne pourra remplacer l'apprentissage technique.

En médecine humaine, la chirurgie du rachis représente une difficulté majeure étant donné la présence de nombreux organes vitaux et sensibles tels que la moelle épinière, les terminaisons nerveuses ou l'aorte. Pour le traitement des scolioses, des fractures, des hernies ou de beaucoup d'autres pathologies rachidiennes, des forages sont effectués dans les pédicules des vertèbres afin d'y implanter des vis pour corriger ou stabiliser la colonne. Les dispositifs que nous mettons au point et distribuons permettent notamment de sécuriser le geste du chirurgien en le guidant lors du forage dans les vertèbres.

L'utilisation de ces dispositifs pour la pratique de la chirurgie du rachis nécessite un apprentissage spécifique qui doit se faire en dehors de l'exercice clinique quotidien sur les patients pour la sécurité de ceux-ci et la mise en place d'un enseignement structuré en dehors du bloc opératoire est donc une nécessité. L'état actuel des connaissances indique que la formation chirurgicale sur animal des chirurgiens reste à l'heure actuelle la plus performante des techniques d'apprentissage.

La chirurgie sur l'animal est en effet un exercice plus proche de la réalité. Son but est de permettre la réalisation d'interventions chirurgicales dans des conditions d'autonomie opératoire. De plus, ceci stimule la réflexion sur la gestuelle et les stratégies opératoires.

La mise au point de nos dispositifs et les évolutions de la technologie nécessitent également un modèle réaliste et représentatif des conditions réelles d'utilisation chez l'humain afin d'effectuer des tests de vérification ou de validation des différents choix techniques sélectionnés.

Depuis quelques années des simulateurs chirurgicaux se sont développés ; cependant pour des raisons inhérentes à leur disponibilité, leur coût, et l'incompatibilité technique avec nos dispositifs, les rendent peu adaptés. En effet, les simulateurs ne reproduisent pas la vascularisation et la conductivité électrique des tissus, qui est la base de notre technologie. L'expérimentation clinique sur animal est le seul moyen d'évaluer de manière précise, et dans des conditions réalistes les performances de ces dispositifs au cours de leur développement.

L'entraînement et l'expérimentation sur animal restent la référence.

Pour la formation, deux chirurgiens par animal est la situation optimale. Nous envisageons de former 6x2 chirurgiens par an environ, soit un nombre de 6 cochons sur l'année concernée par le présent projet. En parallèle, pour les expérimentations scientifiques impliquant à la fois des chercheurs et des chirurgiens, 4 sessions sont envisagées, avec 1 cochon par session soit un nombre total de 4 cochons sur l'année concernée par le présent projet. Afin de réduire le nombre d'animaux, il est envisageable d'utiliser les animaux utilisés lors des formations pour les expériences scientifiques si le calendrier le permet.

Le total sur une année s'élève donc à 10 cochons, mais ces chiffres sont amenés à être ré-évalués au cours de l'année, plus probablement à la baisse, en fonction du nombre de chirurgiens inscrits aux formations et en fonction de l'avancement des projets de recherche.

Le but du projet est donc de proposer un enseignement spécialisé de chirurgie rachidienne sur animal vivant (cochon) afin de pouvoir proposer une formation permettant d'éviter l'apprentissage sur le patient, et des chirurgies exploratoires à visée scientifique afin de tester ou valider de

nouveaux dispositifs ou des évolutions techniques des produits. Une attention particulière sera prise au respect de la règle des 3R:

- Remplacement : l'entraînement final sur animal vivant car aucun protocole in vitro ou ex vivo ne permet de reproduire correctement les conditions rencontrées en cours de chirurgie. En particulier, la nature des tissus vivants et des flux sanguins. L'anatomie du cochon, notamment au niveau de son squelette de sa colonne vertébrale sont plus proches de ceux rencontrés chez l'homme que ce qui est observé chez des modèles petits animaux type rongeurs ou lagomorphe.

- Raffinement : Une formation théorique aux bonnes pratiques chirurgicales et d'essai sur animaux vivants sera réalisée avant la formation ou l'expérimentation pratique. Les essais proposés ne requièrent pas de suivi postopératoire ni que les animaux soient en état éveillé. Les animaux seraient donc endormis pendant les essais en chirurgie ouverte et mis à mort sans réveil. En dehors de cette phase très technique, ils seront maintenus dans les conditions de confort les plus adaptées à leur espèce.

- Réduction : Afin de limiter le nombre d'animaux tout en permettant un bon apprentissage pratique, un cochon pour 2 participants sera envisagé.

19020 Le virus respiratoire syncytial (VRS) est le principal agent impliqué dans les broncho-pneumonies qui touchent les jeunes bovins. Il s'agit d'une affection particulièrement contagieuse qui touche la presque totalité des jeunes bovins de moins de 1 ans et qui favorise la survenue d'infections bactériennes ce qui conduit fréquemment à l'usage d'antibiotiques en élevage. Il existe déjà des vaccins commercialisés contre le VRS bovin mais leur efficacité est limitée chez le veau à la naissance et ils n'empêchent pas la dissémination du virus au sein du troupeau. Un enjeu majeur de la vaccination contre le VRS chez le veau est d'induire une immunité protectrice dans les premières semaines de vie, en présence des anticorps d'origine maternelle (acquis par la buvée du colostrum).

Depuis plusieurs années nous développons un nouveau vaccin utilisant une protéine virale de surface, la protéine F. De tels candidats vaccins sont appelés « sous-unitaire » car ils reposent sur un élément du virus pour conduire à une réponse protectrice. Nous avons démontré l'efficacité de ce vaccin en une seule administration par voie intramusculaire avec un adjuvant vétérinaire classique pour protéger les veaux contre une infection expérimentale. Malgré son efficacité, son coût de production en cellules de mammifère reste trop élevé pour un développement industriel. Pour pouvoir utiliser des systèmes de production en bactérie plus robustes et moins coûteux, il faut réduire cette protéine F à des éléments plus petits, en étant capable d'identifier les parties de F qui seront les plus efficaces pour protéger le veau à la naissance.

Il est connu que les réponses immunitaires des hommes et des animaux évoluent avec l'âge. C'est pourquoi, pour protéger efficacement le veau à la naissance nous devons identifier les sous parties de la protéine F qui sont les mieux reconnues par le système immunitaire à cet âge et surtout qui ne seront pas masquées par les anticorps d'origine maternelle qui circulent chez le veau pendant les premières semaines de vie.

Notre projet a pour premier objectif d'identifier les motifs de notre candidat vaccin F qui sont les mieux reconnus chez les veaux de 2-3 semaines par comparaison avec des bovins plus âgés (6-9 mois). Notre deuxième objectif est de concevoir un nouveau candidat vaccin ne comportant que ces motifs reconnus par les défenses immunitaires en période néonatale puis de l'évaluer chez des veaux de 1 mois pour son efficacité meilleure en présence des anticorps d'origine maternelle. Ce projet nécessitera l'utilisation au maximum de 30 bovins dans le respect de la règle des 3R.

Pour le premier objectif, 5 génisses âgées de 6-9 mois et 5 veaux âgés de 2-3 semaines seront vaccinés par voie intramusculaire avec le vaccin preF. Des prises de sang seront effectuées au moment de la vaccination, 2 semaines et 4 semaines après la vaccination. Les lymphocytes B seront isolés du sang et des ganglions lymphatiques (collectés post-mortem) pour caractériser le répertoire antigénique des anticorps produits. Pour le second objectif, des veaux de 2-3 semaines seront vaccinés avec (1) le nouveau vaccin optimisé, (2) le vaccin preF ou (3) non vaccinés

(adjuvant seul). Des prises de sang et des écouvillonnages nasaux seront réalisés pendant un mois pour suivre la réponse anticorps à la vaccination.

La taille des groupes (n=5) a été définie sur la base de nos essais antérieurs pour obtenir des résultats statistiquement significatifs.

- Remplacement : Il n'y a pas de modèles in vitro alternatifs pour évaluer la réponse vaccinale.
- Réduction : Le nombre d'animaux est calculé au plus juste à l'aide d'outils statistiques garantissant une puissance de test de 80% minimum en s'appuyant sur les données de la littérature et l'expérience des différents partenaires de ce projet.
- Raffinement : Les bovins sont hébergés en groupe dans une animalerie conventionnelle fermée, avec un environnement enrichi (pierre de sel, brosse, paille, aire d'exercice). Les bovins seront suivis tout au long de l'expérience, avec une attention particulière à la qualité de leur alimentation à partir de la naissance (prise de colostrum et de lait maternel avant passage à du lait en poudre et des granulés). Les animaux sont suivis plusieurs fois par jour (enrichissement social) pour détecter les signes cliniques précoces et afin de prendre une décision rapide en cas d'atteinte des points limites. Les bovins pourront être traités avec des anti-inflammatoires ou des antalgiques en cas de réaction à la vaccination.

19021 Il existe au sein du cœur un certain nombre de circuits neuronaux assurant la modulation de la fonction cardiaque. De récentes découvertes supportent le concept qu'un remodelage de ces structures, suite à une atteinte cardiaque (infarctus, insuffisance cardiaque), conduirait à l'émergence de troubles du rythme. Pour autant, il n'existe encore que très peu d'études fonctionnelles portant sur les neurones intracardiaques. Une difficulté pour de telles études est de pouvoir cibler spécifiquement l'activité de certains neurones cardiaques pour comprendre leur rôle. L'objectif de ce projet est d'étudier spécifiquement l'influence de ces neurones sur l'activité cardiaque. Grâce à l'expression ciblée de protéines photosensibles dans les neurones cardiaques, il est possible de stimuler ou d'inhiber leur activité par des flashes lumineux. En comprenant le rôle de ces neurones dans le fonctionnement normal et pathologique du cœur, on peut évaluer leur importance en termes de futures cibles thérapeutiques.

Cette étude sera réalisée en deux parties : dans un premier temps, l'effet d'un neuropeptide excrété par les neurones intracardiaques sera testé in vitro sur des cellules cardiaques isolées pour déterminer leurs effets sur le muscle cardiaque. Dans un second temps, l'activité de ces neurones sera modulée in vivo sur animal anesthésié par l'approche d'une fibre optique par la cavité abdominale et ex vivo après euthanasie de l'animal et prélèvement du cœur. Pour réaliser ces expériences, 305 souris seront nécessaires sur 5 ans.

La règle des 3R sera mise en application de la façon suivante :

Remplacer : il n'est pas possible de remplacer les animaux par d'autres modèles in silico ou in vitro puisque l'objet de l'étude est de tester la commande in vivo du cœur par la stimulation lumineuse des neurones intracardiaques.

Réduire : le nombre d'animaux est réduit au minimum indispensable à l'obtention de résultats interprétables.

Raffiner : les animaux seront hébergés en groupe avec enrichissement du milieu (tunnel plastique, papier absorbant).

19022 Le purpura thrombotique thrombocytopénique acquis (PTT) est une maladie rare et grave, touchant le plus souvent l'adulte jeune. Les manifestations de cette pathologie sont une baisse du nombre de plaquettes, une baisse de l'hémoglobine et une souffrance brutale d'un ou plusieurs organes comme le cœur et le cerveau. Sans prise en charge adaptée, 90% des patients décèdent.

Cette maladie est secondaire à un déficit enzymatique qui conduit à une accumulation de facteur de von willebrand » (VWF). Sur ces « filaments collants » qui s'accumulent dans cette pathologie, les plaquettes circulantes viennent s'agréger, obturant ainsi les petits vaisseaux, ce qui conduit à un tissu mal oxygéné et à des lésions appelées lésions ischémiques. De récentes avancées

suggèrent que l'interleukine 1 (IL-1) joue un rôle important dans la genèse de ces lésions ischémiques. Or, il existe aujourd'hui un traitement capable de bloquer l'effet de cette IL-1, l'anakinra.

Notre projet de recherche vise à tester l'efficacité de l'anakinra pour protéger le coeur des lésions créées par le manque d'oxygène dans cette maladie. Nous utiliserons ainsi l'anakinra (ou un placebo) pour traiter des souris génétiquement modifiées (knock out ADAMTS13) chez qui nous aurons au préalable déclenché un PTT par une injection de VWF par voie intraveineuse. La sévérité de l'atteinte cardiaque sera appréciée sur des critères biologiques, histologiques (prélèvement des organes) et fonctionnels (échographies cardiaques et courbe de survie)

La règle des 3R sera respectée :

1) Remplacer : Seule une étude in vivo, c'est-à-dire incluant la complexité des mécanismes physiologiques mis en jeu lors du développement du PTT peut permettre d'atteindre l'objectif de ce projet. Aucune méthode de remplacement ne peut donc être employée.

2) Réduire : Le nombre de souris a été réduit au minimum pour démontrer l'efficacité de l'anakinra et a été évalué par des tests statistiques à 42 souris KO ADAMTS13 (test Mann-Whitney).

3) Raffiner : Les animaux ne subiront que très peu de contraintes et la douleur sera minimisée. Les cages seront enrichies (coton). De plus, la douleur et la souffrance seront évaluées lors des protocoles et durant toute la vie de l'animal de la naissance à la mort grâce à une grille d'évaluation de la douleur et nous agissons en conséquences : les injections de VWF, d'anakinra et les prises de sang se feront sous anesthésie générale; les animaux seront observés quotidiennement, l'état clinique et la souffrance seront évalués à partir d'une grille d'évaluation adaptée, avec notamment évaluation des critères physiques et comportementaux permettant d'instaurer et d'adapter les mesures à visée antidouleur.

19023 L'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) est aujourd'hui encore un problème majeur de santé publique. On estime à près de 250 millions le nombre de porteurs chroniques de ce virus dans le monde. L'infection chronique est associée à des lésions hépatiques d'intensité diverse, aboutissant à une hépatite chronique active. Cet état pathologique du foie peut induire une cirrhose qui dans environ 20% des cas conduit à un carcinome hépatocellulaire (CHC). Des données épidémiologiques ont d'ores et déjà permis de lier l'infection par le VHB à une probabilité accrue de développer un cancer hépatocellulaire. L'incidence de ces cancers est pour partie due à l'inflammation chronique induite par l'infection virale mais elle découle également d'un effet direct de certaines protéines virales sur le foie du patient infecté. Dans un modèle de souris transgénique, nous avons montré que l'expression d'une protéine virale module la réponse immunitaire de l'hôte, impactant sur la pathogenèse hépatique.

Notre projet de recherche a pour objectif de mieux comprendre comment l'impact de cette protéine virale sur la réponse immunitaire modifie la pathogenèse hépatique.

Nos précédents travaux ont montré un impact sur l'inflammation et la fibrose hépatique chronique et nous poursuivons l'exploration sur la carcinogenèse hépatique. Cette demande est dans la poursuite de nos premiers travaux de recherche sur ses souris transgéniques.

A l'aide de nos souris transgéniques, mais également de souris invalidées pour un récepteur de chimiokine, nous allons explorer l'impact de protéine du VHB sur la carcinogenèse hépatique et d'en déterminer les mécanismes d'action.

Une meilleure compréhension des mécanismes d'action de cette protéine virale pourrait permettre le développement d'une nouvelle stratégie thérapeutique de la maladie hépatique associée à l'infection par le VHB.

Remplacement: l'utilisation de ces modèles animaux, est l'approche la plus appropriée pour répondre à cette question. Malgré nos efforts actuels pour le développement de modèles in vitro de culture cellulaire en 3D, l'utilisation de méthode substitutive ne permet pas de répondre aux objectifs spécifiques de notre projet, soulignant le caractère irremplaçable de nos modèles murins.

Réduction: pour la bonne réalisation de ce projet, nous avons tenu compte du nombre minimal de souris à inclure nécessaire à l'obtention d'une analyse statistique permettant de définir la présence ou non d'une différence significative. En effet, nos précédents travaux publiés ont souligné la variabilité inter-individuelle des souris. C'est pourquoi, nous avons évalué sur la base de notre expérience, à 10, le nombre minimum de souris /groupe.

De plus, les organes immunitaires majeurs seront prélevés en même temps que le foie pour caractériser l'impact systémique du transgène sur la réponse immunitaire afin de réduire à minima le nombre de souris inclus.

Nous détenons dès à présent la faisabilité technique et les compétences en expérimentation animale nécessaires à la réalisation des différentes procédures présentées dans ce dossier.

Pour cette étude, nous avons défini les modalités d'une surveillance de ces souris et les points limites à ne pas dépasser.

Raffinement: Nos travaux de recherche portent sur les étapes précoces de la carcinogenèse hépatique. Nos études précédentes ont mis en évidence une absence de phénotype dommageable pour les souris à ce stade précoce de la maladie. Les souris seront euthanasiées avant l'émergence d'un cancer à un stade avancé. Par ailleurs, les souris seront hébergées sur portoirs ventilés dans des cages enrichies (papier craft en lanière et litère adaptée). Pour prévenir une quelconque souffrance de l'animal, les procédures expérimentales seront réalisées sous anesthésie générale avant euthanasie. Pour rappel, les analyses prévues ne concernent que les temps précoces de la carcinogenèse hépatique avec un phénotype dommageable inapparent ou modéré et sans changement de comportement comme cela a été observé au cours de nos travaux préliminaires, après induction chimique.

Néanmoins, nous surveillerons les points limites définis dans chaque procédure.

Le nombre total d'animaux inclus dans cette étude sera donc de 420 souris.

19024 Différentes formes d'immunothérapies sont utilisées pour traiter des tumeurs qui récidivent et des métastases. Cependant, ces nouvelles thérapies ne sont efficaces que pour certains malades et certains types de cancers. Il est important de mieux comprendre comment des cellules tumorales développent de multiples stratégies pour neutraliser, modifier et utiliser le système immunitaire. Nous travaillons sur une sous-population de cellules de sarcome qui présentent des caractéristiques de cellules souches. Des données obtenues récemment ont mis en évidence une implication probable de ces cellules dans la régulation de la réponse immune anti-tumorale. Le but de notre étude est de mieux comprendre le rôle des cellules souches cancéreuses dans la résistance aux immunothérapies en nous intéressant particulièrement à la relation entre les métastases et les cellules immunes. La réponse immune met en jeu de nombreux types cellulaires et des régulations complexes et son étude requière l'utilisation de modèles animaux. Pour mimer l'installation des cellules d'ostéosarcome dans un site métastatique et étudier toutes les phases de recrutement des cellules immunes, nous voudrions utiliser le modèle de poche à air qui consiste à créer une cavité sous la peau des souris pour y injecter les cellules cancéreuses. Cette méthode a déjà été utilisée pour caractériser des tumeurs formées à partir de cellules de cancer du sein et tester de nouveaux traitements sur des ostéosarcomes. Elle est par ailleurs utilisée au laboratoire pour étudier des mécanismes inflammatoires de l'articulation. Elle permet de mettre en contact les cellules tumorales et un système immunitaire pour étudier les interactions et les médiateurs mis en jeu. Cette méthode entraîne moins de souffrance que l'induction de métastases pulmonaires chez les souris. Les mesures suivantes seront prises pour respecter la règle des 3R : Les procédures d'injection seront réalisées sous anesthésie. Les animaux seront suivis régulièrement durant l'expérience. Tout signe de souffrance entraînera l'injection d'analgésique puis la mise à mort si l'état ne s'améliore pas. Des points limite seront établis à l'avance. Les animaux seront mis à mort avant que la tumeur qui se développe n'entraîne par elle-même une altération des conditions de vie des animaux. Nos hypothèses sont basées sur de nombreux travaux préalables, in vitro, dans des cultures cellulaires. Nous avons optimisé les analyses effectuées ex-vivo pour utiliser le minimum d'animaux. Nous pensons utiliser au maximum 182 souris sur 3 ans pour l'ensemble de ce programme.

19025 Le diabète de type 2 (DT2) et la dépression constituent des problèmes de santé publique majeurs. Ces 2 pathologies présentent une forte co-morbidité et un lien bidirectionnel. En effet, d'une part, le DT2, caractérisé par une hyperglycémie et une résistance de l'organisme à l'insuline, est associé à une prévalence élevée de développer une dépression et d'autre part, la dépression constitue un facteur de risque aux troubles métaboliques et au DT2. Cependant les processus physiopathologiques sous-tendant ce lien bidirectionnel restent mal connus et sont difficilement étudiables chez l'homme.

Outre les altérations métaboliques, sur le plan physiopathologique, le DT2 est associé à des altérations de la sphère gastro-intestinale. En effet, le DT2 est associé à des altérations de la composition du microbiote intestinal (dysbiose) et à une augmentation de la perméabilité intestinale.

Par ailleurs, le lien entre altérations intestinales et la symptomatologie neuropsychiatrique a déjà été établi dans la littérature chez des modèles pré-cliniques de dépression. Ainsi, une hypothèse récente impliquant le dysfonctionnement de l'axe intestin-cerveau dans l'émergence des troubles émotionnels chez les sujets DT2 a été proposée.

La plupart des modèles animaux DT2 sont associés à l'obésité, qui constitue un facteur confondant dans la compréhension du rôle du DT2 sur l'émergence d'altérations cérébrales. Étant donné que tous les patients atteints de DT2 ne sont pas en surpoids, il est nécessaire d'étudier un modèle animal diabétique maigre pour une meilleure représentation de la maladie. Les rats Goto-Kakizaki (GK) sont une lignée de rats non obèses présentant un DT2 spontané et stable, obtenue par croisements répétés de rats Wistar normo-glycémiques présentant une faible tolérance au glucose.

L'objectif de notre étude est d'explorer le rôle de la perméabilité intestinale dans les altérations émotionnelles (troubles dépressifs et anxieux) associées au DT2 chez le modèle de rat GK.

Ce projet nécessitera l'utilisation de 144 animaux sur une durée de 3 années.

La règle des 3Rs sera respectée dans ce projet. L'étude de comportements anxieux-dépressifs ne peut être réalisée que sur animaux vivants ce qui rend impossible le remplacement de ceux-ci par des modèles in vitro. Le nombre d'animaux sera réduit au mieux grâce à l'utilisation de tests statistiques montrant la différence entre plusieurs groupes. Toutes les précautions possibles (analgésie, enrichissement des cages d'hébergement) seront prises afin de raffiner nos procédures et réduire au mieux l'inconfort des animaux.

19026 **Les oligodendrogliomes font partie des tumeurs cérébrales primitives les plus fréquentes et sont souvent associées à un mauvais pronostic. Ces tumeurs sont toutes mutées sur le gène IDH1 et nous avons récemment mis en évidence des mutations sur les gènes CIC et TCF12 dans une partie de ces tumeurs. Notre projet a pour but d'étudier l'impact de ces altérations individuellement ou en association pour déterminer la combinaison minimale nécessaire à la formation d'oligodendrogliomes. A l'aide de lignées de souris transgéniques, nous déterminerons les fonctions des gènes CIC et TCF12 dans les cellules souches neurales et les précurseurs d'oligodendrocytes, qui représentent les cellules d'origine des oligodendrogliomes. Notre projet devrait permettre l'établissement de nouveaux modèles murins d'oligodendrogliomes très proches de ceux observés chez les patients.

La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée : 1) remplacement, les études in vitro et sur animaux invertébrés ne permettent pas l'étude de comportements complexes ; le rongeur est donc une des espèces les plus appropriées pour ce type d'étude. 2) réduction, le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum pour nous permettre de générer des données statistiques solides ; 3) raffinement : la qualité du réveil sera appréciée pour détecter toute anomalie potentielle de la procédure anesthésique. Les animaux seront surveillés quotidiennement et euthanasiés dès que des points limites détaillés infra sont atteints. Le nombre d'animaux par cage respectera la législation sur la protection des animaux de laboratoire ; Nous utiliserons un nombre total de 800 souris pour ce projet. **.

19027 Des études chez l'Homme ont montré que les patients dépressifs pouvaient présenter des troubles de l'olfaction. Parmi les différentes dimensions de la perception olfactive (altérations du seuil de

perception, de la discrimination, de l'identification), celle qui semble le plus robustement touchée chez l'homme dans la dépression est le jugement de la valeur hédonique, le caractère plaisant d'une odeur. Cette dimension hédonique des odeurs est un paramètre dominant de la perception olfactive puisqu'elle guide notre comportement d'approche ou de retrait. Une altération de la dimension hédonique positive (anhédonie) des odeurs provoque des troubles de la prise alimentaire ou de l'humeur, ce qui a un impact fort sur la dégradation de la qualité de vie. Dans ce projet, il va s'agir de comprendre les mécanismes neuronaux impliqués dans les altérations de la perception des odeurs lors de la dépression.

Nous allons étudier la réponse hédonique aux odeurs à l'âge adulte dans deux modèles animaux complémentaires de la dépression, le stress chronique léger imprédictible et le stress précoce. La majorité des études sur le stress chronique chez l'animal ont utilisé des mâles alors que deux fois plus de femmes que d'hommes sont touchées par la dépression ce qui suggère un effet genre important dans la pathophysiologie de la maladie que nous proposons de prendre en compte. Nous analyserons également l'effet de l'enrichissement avec des odeurs sur le niveau d'anxiété, de dépression et d'anhédonie des souris grâce à des tests comportementaux standards. Les réseaux neuronaux impliqués dans le traitement des odeurs seront analysés et pourront être manipulés.

D'un point de vue fondamental, ces résultats apporteront des éléments déterminants pour la compréhension des mécanismes de codage de la valeur hédonique de l'odeur et ses altérations lors de la pathologie. Il s'agit d'un pan entier de la physiologie olfactive dont les processus fondamentaux restent très méconnus. Ce travail, d'un point de vu plus appliqué, devrait fournir de nouvelles pistes thérapeutiques pour promouvoir le bien être par les odeurs. Ainsi, ce projet permet d'envisager des bénéfices fondamentaux et cliniques évidents.

L'étude des processus physiologiques et plus particulièrement l'étude des bases neuronales du comportement nécessite l'utilisation d'animaux vivants et ne peut s'envisager sur modèles strictement in vitro. La très grande majorité des études sur les bases neurales de la perception olfactive a été menée chez la souris C57Bl6J adulte. C'est donc sur ce même modèle que notre projet sera mené. 720 souris sur une période de 5 ans seront nécessaires à ce projet.

La signature neurale de l'altération de la perception des odeurs lors de la dépression sont étudiés principalement post mortem à l'échelle cellulaire et moléculaire. Nous modulerons également l'activité des circuits neuronaux pendant le comportement de l'animal. Nous resterons très attentifs au bien-être animal et une surveillance accrue (mesure du poids, administration d'antalgique, observation de l'animal. . .) sera effectuée lors des chirurgies.

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

- « Remplacer » les modèles animaux : Notre projet se focalise sur un modèle expérimental nécessitant l'utilisation d'un modèle animal. Il n'existe pas de modèle cellulaire reproduisant nos procédures expérimentales.

- « Réduire » le nombre d'animaux en expérimentation : Pour nos expérimentations, nous avons prévu le nombre nécessaire et suffisant d'animaux, pour garder une puissance statistique dans le traitement des résultats. De plus, afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, nous corrélons (grâce à des statistiques adaptées) le comportement et les paramètres cellulaires sur les mêmes animaux et poursuivrons le développement d'un modèle bio-informatique.

Toutes les manipulations le nécessitant seront réalisées sous anesthésie générale et locale et des traitements préventifs (antalgiques) seront utilisés afin de réduire les risques de douleur. Le poids et l'apparence physique des souris seront vérifiés pendant toutes la durée du protocole. Le comportement et la posture des souris seront également observés afin d'évaluer le degré de bien-être ou de douleur. Le modèle murin de dépression est un outil pertinent pour étudier l'impact de cette pathologie sur la perception des odeurs et donc à plus long terme sur la prise alimentaire et les interactions sociales et pourra aussi être utilisé afin de tester de nouvelles pistes de remédiation. Les procédures de niveaux faibles à modérées prennent en compte au mieux le bien-être des animaux par un suivi régulier des animaux et par une mise à mort la plus éthique possible (Raffinement).

19028 Les cellules du sang assurent l'oxygénation des tissus et orchestrent la défense immunitaire. Elles se développent continuellement dans la moelle osseuse (MO) à partir de cellules souches hématopoïétiques (CSH) tout au long de la vie des individus. Les mécanismes biologiques qui gouvernent le maintien de ces CSH et la différenciation de celles-ci ne sont pas encore totalement élucidés. La perturbation de ces mécanismes participe au développement de maladies auto-immunes et de leucémies. Une meilleure compréhension de ceux-ci permettra de développer des cibles et des stratégies thérapeutiques permettant de traiter les patients atteints de ces syndromes. Notre laboratoire s'intéresse à une famille de protéines appelées Ikaros et composée de 5 membres Ikaros, Helios, Aiolos, Eos et Pegasus. Ces protéines participent au contrôle de l'expression génique. De manière intéressante, les protéines Ikaros et Helios sont présentes en grande quantité dans les CSH suggérant que ces protéines ont une fonction dans la biologie de ces cellules. Il a été montré préalablement que des mutations génétiques conduisant à la perte de Ikaros conduit à un dysfonctionnement des CSH. Cependant, le rôle de Helios n'a pas encore été décrit pour les CSH et reste à être caractériser dans ces cellules.

Pour répondre à cette question notre laboratoire a généré une lignée de souris portant une mutation génétique qui entraîne la perte d'expression de Helios (souris He^{-/-}). De manière préliminaire, nous avons observé que le nombre de CSH augmente chez les souris He^{-/-} suggérant que ce facteur est important pour l'homéostasie de ces cellules. D'autre part, l'analyse des différentes cellules constituant le sang des souris présente des anomalies indiquant que Helios est nécessaire au bon développement des cellules sanguines. Nous chercherons à déterminer si ce facteur est également important dans l'homéostasie des cellules sanguines chez l'adulte en utilisant des souris inductibles pour l'inactivation du gène Helios.

Ce projet cherche à déterminer la fonction de la protéine Helios dans les CSH ainsi qu'au cours de la différenciation de ces cellules sanguines dans des conditions normales et infectieuses. Pour cela nous allons réaliser différentes expériences de transplantations de CSH issues de souris He^{-/-} dans des souris sauvages dépourvues de cellules sanguines par irradiation. Le sang des souris ainsi reconstituées sera analysé et permettra de déterminer le rôle de Helios dans les CSH. Nous analyserons aussi les CSH déficientes pour Helios en condition infectieuse.

Afin de respecter la règle des 3R, une réduction du nombre d'animaux utilisés a été décidée.

Pour répondre à cet objectif, et afin de pouvoir réaliser des tests statistiques (Student t-test), nous prévoyons d'analyser des groupes de 6 souris/ condition, soit 321 souris pour le projet global (voir procédures expérimentales).

Pour répondre à l'objectif de raffinement, les souris seront hébergées à plusieurs dans des cages de taille réglementaire, en ne dépassant pas le nombre maximal autorisé de souris par cage (souris rassemblées en groupes sociaux), et dans des cages comportant des enrichissements (nids). Enfin, les souris seront observées régulièrement et les dispositions adéquates seront appliquées si la souffrance des animaux devait atteindre les points limites. La règle du remplacement n'est pas applicable ici: en effet, nous devons avoir recours à un modèle in vivo afin d'étudier les cellules hématopoïétiques qui met en jeu des coopérations cellulaires multiples dans les organes hématopoïétiques tel que la moelle osseuse et le sang. Pour ces raisons, nous ne pouvons pas avoir recours à des modèles in vitro. En ce qui concerne les modèles in vivo, la souris est un modèle de choix pour l'analyse génétique et les expériences de transplantation de cellules.

19029 Depuis plus de 10 ans, le cancer est la première cause de mortalité en France. L'étude des différentes tumeurs a permis de mettre en évidence une molécule exprimée en plus grande quantité au niveau de celles-ci. C'est le cas notamment dans le cancer colorectal, le cancer ovarien ou le glioblastome (tumeur du cerveau). Le cancer colorectal est un des trois cancers les plus fréquents. Le cancer ovarien est la pathologie gynécologique associée à la plus forte mortalité dans les pays développés. Quant au glioblastome, il s'agit de la tumeur maligne cérébrale la plus fréquente chez l'homme. Mis à part dans le cadre du cancer colorectal où les dépistages permettent une prise en charge précoce dans le développement de la maladie, les patients atteints de glioblastome ou de cancer ovarien sont généralement diagnostiqués à un stade avancé de la maladie. Malgré les

avancées dans la prise en charge thérapeutique de ces différents cancers, il existe encore un besoin d'identifier de nouveaux agents thérapeutiques permettant de prolonger la survie des patients et d'outrepasser les résistances. Dans l'optique du développement de telles molécules, les modèles expérimentaux chez la souris permettent d'étudier la biologie de la tumeur en réponse à de nouveaux traitements.

L'objectif de ce projet est d'évaluer le potentiel anti-tumoral d'un candidat médicament qui a déjà fait état de fortes propriétés anti-tumorales en laboratoire et qui est en développement préclinique réglementaire en vue de son utilisation en thérapie humaine.

Les capacités anti-tumorales du candidat médicament seront évaluées dans trois modèles de cancer ovarien, ainsi que dans deux modèles de cancer colorectal et un modèle de cancer cérébral. Ces trois types de cancer sont en effet décrits pour exprimer fortement la protéine ciblée, qui constitue un facteur de mauvais pronostic dans ces indications.

La réalisation d'une étude pilote, suivi d'une première série d'expériences, l'aspect séquentiel des procédures ainsi qu'une étude approfondie de la littérature sont autant d'efforts mis en œuvre pour réduire le nombre d'animaux utilisés dans la présente étude. L'absence d'effet anti-tumoral des candidats médicaments durant la phase pilote impliquera l'arrêt de la procédure. Dans un souci de raffinement, nous veillerons à améliorer le bien-être des animaux utilisés (suivi quotidien, éléments placés dans la cage pour favoriser la motricité, etc...) et à réduire les contraintes appliquées à l'animal. Ce modèle permet de recréer le microenvironnement tumoral ainsi que la réponse immunitaire et ne pourrait être remplacé par un autre modèle d'étude. De plus, la réalisation d'une première série d'expériences suivie d'une analyse statistique permettra de réduire tant que possible le nombre d'animaux utilisés qui sera limité à 20 animaux par condition expérimentale dans la limite de 2700 souris.

Ces expérimentations, dont le bénéfice attendu est une diminution significative du volume tumoral constituent un prérequis indispensable afin de consolider la preuve de l'efficacité du candidat médicament avant d'envisager son utilisation dans le cadre d'essais cliniques.

Les effets attendus du produit sont supposés se restreindre à l'environnement tumoral, au sein duquel la molécule ciblée est exprimée en plus grande quantité. Cependant, un suivi quotidien des animaux sera assuré par le comité en charge du suivi du bien être animal afin de limiter toute souffrance. Ainsi, toute modification du comportement (isolement, anxiété, troubles de l'équilibre et/ou diminution de la réponse aux stimuli, animal prostré) sera une indication pour la prise en charge des animaux pouvant mener à l'euthanasie si jugée nécessaire, en accord avec le comité en charge du suivi du bien être animal. Il en est de même pour tout gain ou perte important(e) de masse corporelle (15% de la masse des animaux), ou encore en cas de développement tumoral trop important.

19030 La leucémie aiguë myéloïde (LAM) est un cancer lié à la multiplication de cellules anormales dans la moelle osseuse. La LAM est la conséquence d'anomalies du génome des cellules leucémiques mais aussi de modifications de leur microenvironnement. L'objectif de ce projet est de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques impliquées dans le dialogue entre les cellules leucémiques et leur microenvironnement.

Pour reproduire les conditions de développement des cellules leucémiques dans leur environnement, nous utilisons un modèle de niche humanisée développé chez la souris. En pratique, des échantillons de cellules leucémiques de patients seront injectés au sein de structures en « 3D » construites in vitro qui seront implantées en sous cutané chez la souris anesthésiée. Parallèlement, des cellules leucémiques provenant des mêmes patients seront injectées dans la veine de la queue d'un autre lot de souris, après irradiation afin de permettre la prise de greffe. La prise de greffe sera suivie de façon hebdomadaire grâce à des prélèvements sanguins (réalisés sur souris éveillées) et une fois par mois grâce à des prélèvements de moelle osseuse (2 prélèvements de moelle osseuse au maximum pour chaque souris, réalisés sous anesthésie et analgésie). Grâce à ce modèle et à une méthode de criblage génétique nous identifierons de nouvelles cibles thérapeutiques impliquées dans le microenvironnement tumoral puis nous mettrons en évidence les

meilleures combinaisons thérapeutiques. Plusieurs traitements seront administrés aux souris par voie orale (gavage) ou intra-péritonéale selon les modalités d'administration recommandées pour chaque molécule. Ces traitements seront débutés une fois la prise de greffe leucémique confirmée et pour une durée totale maximale de 28 jours. En fin de procédure, après euthanasie de l'animal, une analyse histologique est prévue.

Nous appliquerons la « règle des 3R » (remplacement, réduction, raffinement).

Nous réaliserons le plus possible d'expériences avec des modèles *in vitro*. Cependant l'étude des mécanismes de développement tumoral et de résistance aux traitements nécessite un organisme vivant afin de reproduire le plus fidèlement possible ce qui se passe chez l'Homme. Seules les expériences absolument indispensables seront réalisées *in vivo*.

Nous avons réduit le nombre de souris utilisés au minimum nécessaire et suffisant pour valider scientifiquement notre étude du point de vue statistique. Notre expérience avec ces modèles, la multiplicité des paramètres mesurés, et l'utilisation des méthodes statistiques adaptées nous permettront une exploitation maximale des données afin de réduire le nombre d'animaux (3432 souris pour les 5ans). Le premier axe nécessitera 240 souris pour obtenir des modèles murins correspondants à l'implantation sous-cutanée dans des structures « 3D » de cellules provenant de 20 patients (20 lots de 12 souris). 240 autres souris seront nécessaires pour obtenir des modèles murins correspondants à ces 20 patients obtenus par injection des cellules leucémiques par la veine de la queue des souris (20 lots de 12 souris). Deux échantillons de patients parmi les 20 étudiés seront validés en implantation sous-cutanée et en injection par la veine de la queue. Ceci nécessite le traitement des souris dans 4 lots avec un solvant, une molécule privant les cellules de leur interaction avec le microenvironnement, une molécule ciblant les cellules leucémiques ou la combinaison de ces deux molécules administrées en sous cutané. Au total 192 souris seront nécessaires (2 patients, 2 méthodes d'injection des cellules leucémiques, 4 lots de traitement, lots de 12 souris). Ce premier axe nécessitera au total 672 souris.

Notre criblage génétique sera réalisé sur un échantillon de patient sélectionné grâce aux expériences du premier axe. Le deuxième axe nécessitera 360 souris pour répondre aux exigences statistiques. Une première stratégie de criblage nécessitera 120 souris réparties en 2 lots de 60 souris (un lot contrôle, un lot où les gènes d'intérêt sont inhibés). Deux autres cribles seront réalisés afin d'identifier les cibles thérapeutiques les plus pertinentes et les moins toxiques. Ils nécessitent 120 souris chacun soit 240 souris au total réparties en 8 lots de 30 souris (deux lots contrôles implanté en sous cutané, un lot contrôle injecté par la veine de la queue, deux lots implantés en sous cutané où les gènes d'intérêt sont inhibés, un lot injectés par la veine de la queue où les gènes d'intérêt sont inhibés, un lot contrôle implantés avec des cellules hématopoïétiques normales en sous cutané, un lot implantés avec des cellules hématopoïétiques normales en sous cutané où les gènes d'intérêt sont inhibés). Enfin la validation préclinique des cibles les plus prometteuses (10 cibles) lors du troisième axe nécessitera 2400 souris. Dix gènes d'intérêt seront validés par une approche génétique qui nécessitera 720 souris (2 échantillons de patients, 10 gènes à valider, 3 lots de 12 souris par gène et par patient avec un lot contrôle et deux lots avec inhibition du gène d'intérêt). La toxicité sur cellules hématopoïétiques normales sera également évaluée ce qui nécessitera 720 souris (2 échantillons de cellules hématopoïétiques, 10 gènes à valider, 3 lots de 12 souris par gène et par patient avec un lot contrôle et deux lots avec une inhibition du gène d'intérêt). Le potentiel thérapeutique de l'inhibition des gènes d'intérêt en combinaison avec les traitements de la LAM sera évaluée. Cette approche pharmacologique nécessitera 960 souris (2 patients, 10 composés ciblant les dix gènes à valider, 4 lots de 12 souris par gène et par patient avec un lot contrôle, un lot traité avec l'inhibiteur du gène d'intérêt, un lot traité avec le traitement standard et un lot traité avec la combinaison).

Nous aurons recours à des techniques d'imagerie non invasive sur souris anesthésiées pour le suivi des animaux pour réduire le nombre de souris et privilégier leur bien-être. Une attention particulière sera portée sur le bien-être des animaux par une surveillance journalière (personnel de l'animalerie et expérimentateurs). Les souris seront hébergées selon les règles en vigueur avec un enrichissement adapté. Nous veillerons à réduire au minimum l'intensité et la durée des souffrances ressenties par les animaux, en utilisant une grille d'évaluation prenant en compte l'apparence

physique, le poids et le comportement. Les souris présentant des souffrances (atteinte du point limite) seront euthanasiées selon la méthode réglementaire. A l'issue d'une période maximale de 10 mois, tous les animaux seront euthanasiés.

19031 L'effet incrétine correspond à une augmentation plus marquée de l'insuline circulante à la suite d'un repas par rapport à celle consécutive à l'administration veineuse d'une quantité identique de glucose. Des données récentes montrent que cet effet est réduit chez le patient diabétique. Le rôle central de l'effet incrétine dans le contrôle de la glycémie conduit à rechercher une espèce modèle qui présente une réponse quantitative proche de celle de l'homme. Les essais préliminaires chez le chien et les rongeurs de laboratoire menés en Allemagne par notre partenaire ont été infructueux. Le porc pourrait être un modèle alternatif et le but de notre projet est donc d'évaluer la pertinence de ce modèle en conditions physiologiques avant de confirmer la suppression de l'effet incrétine chez le porc diabétique.

Sachant que l'objectif final du projet est de disposer d'un modèle animal de l'effet incrétine humain, il est essentiel de réaliser les mesures de sécrétion d'insuline dans des conditions identiques à celles décrites chez l'homme et notamment au travers du suivi de la sécrétion d'un peptide co-sécrété avec l'insuline et qui sert de marqueur à cette dernière. Nous nous proposons donc d'évaluer la sécrétion d'insuline avec la méthode dite des «trois jours» qui correspond à ce jour au standard international pour la mesure quantitative de l'activité incrétine chez l'homme. Cette méthode suppose (i) la mesure de la sécrétion d'insuline au cours d'un repas glucose et (ii) durant une perfusion intraveineuse isoglycémique de glucose puis (iii) l'évaluation de la cinétique plasmatique du peptide co-sécrété afin par d'obtenir la sécrétion d'insuline. Le projet prévoit l'utilisation de 6 porcs miniatures adultes. Une première étape consiste à placer chez ces animaux par voie chirurgicale des cathéters veineux, artériels et digestifs afin de permettre d'une part l'administration de glucose et d'autre part pour assurer les prélèvements de sang artériel. Une seconde étape vise à réaliser les mesures elles-mêmes sur trois journées expérimentales par animal. Le projet est conçu pour appliquer la règle des 3 R. La réduction du nombre d'animaux est obtenue par l'application a priori d'un calcul statistique basé sur des données déjà publiées par notre partenaire étranger. Le remplacement du modèle par un système in vitro ou in silicon n'est pas envisageable au même titre que la réalisation de l'expérience chez l'animal anesthésié du fait de la participation du système nerveux central dans la régulation de la glycémie. Le critère de raffinement est consubstantiel de la méthode de mesure qui est actuellement considérée internationalement comme le «gold standart». De plus, la réduction de la douleur instrumentale est réalisée en plaçant de façon chronique en amont de l'expérimentation proprement dite les accès veineux, artériels et digestifs au cours d'une intervention chirurgicale. La douleur au cours et dans les jours qui suivent cette dernière est en permanence suivi à l'aide de grille subjective et objective pour moduler l'administration des substances antidouleur. Ce projet fait l'objet d'un travail collaboratif entre la France et l'Allemagne.

19032 Les infections bactériennes couplées à l'émergence de la résistance aux antibiotiques est un problème majeur de santé publique. Plusieurs types de bactéries, difficiles à traiter, sont responsables de ces infections: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Enterococcus faecium*. Notre laboratoire travaille depuis plus de 15 ans sur la virulence des bactéries c'est à dire sur leur capacité à provoquer des infections plus ou moins graves. A la suite de ces nombreux travaux, nous avons découvert une nouvelle molécule, un petit peptide capable d'inhiber la croissance, in vitro, des souches de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Enterococcus faecium*. Afin d'améliorer son efficacité contre les bactéries, ce peptide synthétisé naturellement par *Staphylococcus aureus* a été ensuite généré chimiquement pour lui apporter des modifications structurales. 4 nouveaux peptides ont ainsi été synthétisés. Tous ont une activité antibiotique contre les 4 souches citées précédemment. Nous avons pu, en effet, déterminer pour chacun d'eux une concentration minimale inhibant la croissance de ces 4 souches en condition de culture in vitro. Ces résultats très encourageants ont fait l'objet d'un brevet qui intéresse fortement les industries pharmaceutiques. En effet, la commercialisation d'une nouvelle

molécule type antibiotique permettrait de faire une avancée majeure dans la résolution du problème de résistance aux antibiotiques. Le but de cette étude est donc de démontrer, in vivo, sur un modèle murin, l'efficacité de ces peptides lors d'une septicémie provoquée par ces 4 souches bactériennes. L'expérimentation consistera à injecter par la veine caudale de la souris une solution calibrée de bactéries diluées dans du sérum physiologique, et de provoquer ainsi une septicémie. Dans un second temps, une injection de peptides sera réalisée à 2 doses prédéterminées et à 4 temps différents une fois la septicémie provoquée (injection du peptide 1h, 10h, pendant 3 jours ou pendant 4 jours après celle des bactéries). Une courbe de survie pour chaque condition étudiée sera réalisée sur une durée de 7 ou 14 jours. La comparaison entre un lot de souris "contrôle" (sans injection de peptides) et un lot "test" (avec injection de peptide) permettra de mesurer la capacité de ces nouvelles molécules à éradiquer une infection bactérienne.

Pour confirmer l'efficacité de ces peptides, nous avons besoin d'utiliser d'autres modèles animaux : une septicémie provoquée par injection en intrapéritonéale et un modèle d'abcès sous-cutané. L'expérimentation consistera à injecter soit par intrapéritonéale soit en sous cutané une solution calibrée de bactéries diluées dans du sérum physiologique et de provoquer ainsi une septicémie ou un abcès. Dans un second temps, une injection de peptides sera réalisée à 2 doses prédéterminées et à 2 temps différents en intraveineuse, par la veine caudale de la souris (injection du peptide 3h ou 15h après celle des bactéries). Une courbe de survie pour chaque condition étudiée sera réalisée sur une durée de 14 jours dans les mêmes conditions que précédemment.

Le modèle animal choisi est la souris, le laboratoire possède déjà l'expertise technique nécessaire à cette étude et un nombre de 2260 souris sera suffisant pour une étude comparative.

En ce qui concerne la règle des 3R :

- Réduire : Le nombre d'animaux a été réduit au maximum tout en gardant un effectif correct pour une étude statistique fiable.
- Raffiner : Les animaux seront élevés dans des conditions favorables à leur bien-être, dans des cages de taille appropriée pour des lots de 5 animaux. L'alimentation est contrôlée et les soins quotidiens sont apportés par du personnel qualifié. Pour chaque procédure, les animaux seront surveillés quotidiennement avec évaluation de leur aspect physique, de leur comportement, de leur température corporelle et de leur poids.
- Remplacer : Il n'existe actuellement aucune méthode alternative à l'expérimentation animale permettant d'étudier l'effet in vivo de nouvelles molécules thérapeutiques.

Ces données obtenues sur modèle murin sont essentielles pour la mise au point d'une ou plusieurs nouvelles molécules à action antibiotique sur plusieurs bactéries, responsables d'un nombre important d'infections chez l'Homme et qui s'avèrent très souvent mortelles.

19033 Le système immunitaire a un rôle prépondérant dans l'élimination des cellules cancéreuses mais c'est aussi en partie lui le responsable de l'échappement tumoral. Ces dernières années, la compréhension des différents acteurs d'une réponse inflammatoire que ce soit dans le cas d'auto-immunité, de rejet d'organes, ou de réponse anti-tumorale a mis en évidence l'équilibre entre l'activation et l'inhibition de cette réponse. Cet équilibre est maintenu par des populations effectrices telles que les lymphocytes T, les lymphocytes B ou encore les NK et des populations régulatrices telles que les lymphocytes régulateurs ou les cellules myéloïdes suppressives, principaux médiateurs du développement tumoral et de la rechute dans le cas du cancer. Les traitements d'immunothérapie actuels visent à contrebalancer cet équilibre. Dans le cas du cancer, les thérapies cherchent à améliorer l'action des cellules T effectrices tout en inhibant la fonction des cellules régulatrices. La voie PD-1/PD-L1 joue un rôle majeur dans l'inhibition de la réponse des lymphocytes T. Des anticorps ciblant cette voie PD1/PD-L1 (Nivolumab, Pembrolizumab, Avelumab) ont été générés pour réactiver la réponse T antitumorale et ont démontré des effets bénéfiques considérables dans le traitement de divers cancers. Ces essais cliniques ont été rendus possibles grâce à la preuve de concept sur des modèles précliniques murins. Aujourd'hui, ces anticorps anti-PD-1/PD-L1 sont approuvés comme agents thérapeutiques de première ligne pour certains cancers du poumon et de la peau. Cependant il est estimé que seulement une partie des

patients (15-60% selon le cancer) répond à la thérapie et que plusieurs rechutes sont observées après traitement. Il est donc essentiel de chercher d'autres molécules et combinaisons thérapeutiques. Dans ce projet, nous proposons de tester in vivo de nouvelles thérapies combinatoires ciblant le récepteur inhibiteur PD-1 et de nouvelles molécules du système immunitaire dans le but d'induire une réponse T anti-tumorale efficace et durable. Nous avons généré de nouveaux formats d'anticorps dit « bi-spécifiques » capables d'interagir avec 2 molécules en même temps, nous supposons que ce format améliorera l'effet de la monothérapie anti-PD-1. Des tests in vitro sur cellules humaines apportent déjà des résultats encourageants, et avant le lancement en essai clinique, il est nécessaire d'avoir recours aux expérimentations chez la souris. En premier lieu, nous devons étudier la pharmacocinétique (PK) de ces nouveaux anticorps afin d'évaluer leurs paramètres de biodistribution et d'élimination in vivo. De plus, cette étude permettra d'établir la relation dose/temps de demi-vie, le profil linéaire, la dose efficace ainsi que le mode d'administration (intraveineux, sous cutané ou intrapéritonéal) de la molécule chez la souris. Ces résultats pourront entrer dans la justification des premières doses pharmacologiquement actives chez l'homme. L'efficacité thérapeutique de ces anticorps pourra dans un autre temps être évaluée dans des modèles de cancer chez la souris ainsi que des études de pharmacocinétique chez le singe avant le lancement en essai clinique chez l'homme.

Le nombre maximum d'animaux utilisé au cours de cette étude complémentaire sera de 342. Dans un souci de respect de la règle des 3R, le suivi des animaux sera respecté en fonction de la sévérité du protocole, ici ne nécessitant pas une fréquence quotidienne, et la gestion de la douleur maîtrisée le plus adéquatement possible afin d'apporter les soins nécessaires le plus rapidement aux animaux. Dans le but de respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux par groupe a été calculé pour limiter la quantité d'animaux utilisé tout en conservant un nombre suffisant pour une évaluation statistique fiable. De plus, le nombre d'animaux demandé étant une estimation haute, ce nombre pourra être réduit dans les phases 2 et 3 si certaines molécules ne montrent pas d'intérêts in vitro. Les animaux sont maintenus dans un cycle jour/nuit de 12h/12h avec un accès à l'eau et à la nourriture à volonté. Le nombre d'animaux par cage est de 5 pour limiter le stress de la surpopulation. Des brindilles de papier sont placées dans la cage pour permettre aux souris de s'enfouir et se cacher. Si un mâle se retrouve dominant et attaque ses congénères, il sera isolé dans une cage individuelle. Après prélèvement et injection, les animaux sont surveillés jusqu'à leur réveil complet. L'étude statistique choisie sera le test de Mann-Whitney ou celui de Kruskal-Wallis, respectivement si le nombre de groupes à comparer est de deux ou plus de deux. Ces tests reposent sur l'analyse de données non paramétriques déterminée quand le nombre de sujet est inférieur à 30. Ces tests nous permettent d'analyser nos données en combinant un test statistique fiable et un nombre d'animaux très réduit (de plus, de part des études antérieures, nous savons que les données obtenues chez la souris dans ce type d'expérience sont très reproductibles). Ayant des animaux dans deux animaleries différentes, nous devons demander une autorisation pour chaque animalerie. Les expériences seront réalisées dans l'une ou l'autre en fonction de nos expériences déjà en cours au moment afin de ne pas faire d'allers-retours entre les deux animaleries.

19034 Au niveau mondial, le cancer du poumon représente le type de cancer avec la plus forte mortalité. Parmi les sous-types de cancer du poumon, le cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules (ou CPNPC) représente 87% des cas de cancer du poumon avec un pronostic des plus sombres parmi tous les cas de cancers pulmonaires. La majorité des patients avec ce type de cancer sont malheureusement diagnostiqués à un stade avancé, voire très avancé.

Concernant le traitement, l'association de plusieurs chimiothérapies reste le traitement de référence. Récemment, la prise en charge des patients a pu être améliorée grâce à l'avènement de thérapies ciblées et notamment grâce aux inhibiteurs du récepteur à l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) comme le géfitinib ou l'erlotinib. Pourtant, cette amélioration reste modeste avec un taux de survie inférieur à 16%. De plus, le traitement avec la chimiothérapie conventionnelle devient de plus en plus inefficace en raison de l'émergence de résistance et l'apparition d'effets secondaires importants.

Dans ce projet, nous nous proposons d'étudier l'intérêt d'un nouveau type de traitement contre ce type de cancer. Ce nouveau traitement est à base d'acides nucléiques transportés (ou vectorisés) par des systèmes de toute petite taille que l'on nomme "nanovecteurs". Ces nanovecteurs sont de petits systèmes de transport qui expriment des composés reconnaissant spécifiquement la protéine EGFR surexprimée dans le cas de ce cancer. L'ensemble nanovecteurs/acide nucléique (correspondant au couple transporteur/traitement thérapeutique) constitue ce qu'on appelle, sous un terme générique, une "nanomédecine" (NM). Ainsi les nanomédecines (NM) ciblées n'iront tuer que les cellules malades épargnant donc les cellules saines.

La cible EGFR est pertinente dans le cancer du poumon car elle est exprimée dans de nombreux cas (85% des cas de CPNPC). Enfin, les NM ciblées possèdent également des fonctionnalités d'agents d'imagerie, ce qui va nous permettre de les suivre par imagerie non invasive in vivo dans un modèle de cancer pulmonaire chez la souris.

Les objectifs du projet sont :

- de s'assurer que la NM n'est pas détruite in vivo,
- de s'assurer que la NM est capable de cibler la protéine EGFR,
- de s'assurer que l'acide nucléique et son transporteur atteignent ensemble la cible tumorale.

A l'issue de chaque étape le projet pourra être stoppé si l'objectif n'est pas atteint.

Pour le premier objectif, l'étude sera réalisée sur des souris Balbc nude non porteuses de tumeurs.

Pour les objectifs 2 et 3, les études seront réalisées sur souris Balbc nude porteuse de tumeur pulmonaire. Le suivi de la croissance tumorale sera réalisé par imagerie de bioluminescence (1 imagerie sous anesthésie gazeuse par semaine pendant 6 semaines) et permettra d'évaluer l'efficacité de cette approche thérapeutique en temps réel, tout en limitant la souffrance des animaux. Nous estimons une durée de 15 jours pour l'établissement d'une tumeur et réaliserons notre étude sur une durée de 60 jours maximum. Les dommages escomptés sont liés au développement d'une tumeur dans le poumon (impact sur la respiration, perte de poids).

Des grilles de suivi pertinentes permettront d'anticiper tout stress ou souffrance provoqués chez l'animal. Des points limites pertinents ont été définis et sont décrits dans le document.

Cette étude nécessitera donc l'utilisation de 144 souris Balb/c nude.

Les explorations seront réalisées sous anesthésie générale, par des méthodes d'imagerie in vivo. Le projet sera réalisé en tenant compte de la règle des 3R.

Réduire : l'imagerie nous permettra d'identifier et de caractériser au fil du temps l'activité in vivo de nouvelles thérapies anticancéreuses, ainsi que la visualisation ou la quantification des événements au sein du même animal (ce qu'on appelle le suivi longitudinal puisque réalisé au fil du temps chez un unique animal).

Raffiner : Comme ces examens sont non-invasifs et réalisés sous anesthésie, il y a peu de stress induit chez les animaux. La croissance tumorale peut être mesurée à plusieurs reprises et longitudinalement chez le même animal, qui est son propre contrôle, augmentant ainsi la précision de l'expérience. Des points limites prédictifs ont été définis et sont décrits dans le document.

Remplacer : Cette étude ne peut être réalisée que chez l'animal puisque les tests in vitro ne peuvent tenir compte de l'aspect physiologique du processus de développement tumoral.

19035 Les composés alkyl perfluorés (PFC) sont des substances chimiques synthétiques utilisées depuis la fin des années 40, dans une large gamme de produits industriels et de biens de consommation courants. L'exposition humaine aux PFC a lieu via l'eau potable, l'alimentation, les produits de consommation, la poussière et l'air. En raison de la capacité très limitée d'élimination de ces composés, les PFC s'accumulent dans les organismes vivants dont l'homme.

Ces composés sont suspectés d'être à l'origine de troubles métaboliques chez l'homme, ce qui a conduit les autorités sanitaires européennes à les remplacer. Ainsi, plus de 4000 différents PFC sont utilisés dans des produits à usage commercial alors que leurs propriétés toxicologiques et leur devenir dans l'organisme sont peu connus. En raison des effets potentiels perturbateurs

métaboliques des PFC, la réduction de l'exposition humaine aux PFC est un véritable enjeu de santé publique.

Dans ce contexte, l'objectif de notre projet est d'identifier des stratégies pour augmenter l'élimination corporelle des PFC, réduire leur accumulation et prévenir ainsi leurs effets toxiques. Pour cela, il est nécessaire d'identifier les mécanismes d'élimination des PFC et de comprendre quels sont les facteurs limitant cette élimination. Les stratégies pour augmenter l'élimination corporelle des PFC et réduire leur accumulation font partie d'une autre partie du projet non décrite ici. L'étude décrite ici se focalise sur les mécanismes d'élimination rénale des PFC. En effet, les PFC sont éliminés majoritairement par le rein et il est donc essentiel de comprendre pourquoi l'élimination rénale des PFC est si faible.

Cette étude sera menée sur des souris invalidées pour les récepteurs nucléaires CAR (Constitutive Androstane Receptor) et PXR (Pregnane X Receptor) qui régulent les transporteurs des anions organiques dans différents organes et pourraient ainsi jouer un rôle critique dans les mécanismes d'élimination rénale des PFC. Il n'est pas possible de se passer d'animaux pour cette étude, car le devenir d'une molécule dans un organisme (pharmacocinétique) n'est pas prévisible par des études *in vitro* compte-tenu de la complexité des mécanismes (absorption, destruction par la flore intestinale, métabolisme hépatique, diffusion tissulaire, élimination rénale, ...). Nous utiliserons au total 135 souris qui seront hébergées dans un milieu enrichi: maisonnettes en acier et papier pour faire des nids. Excepté lors de l'hébergement en cage à métabolisme, les animaux seront hébergés en groupe.

Trois lots de 45 souris (sauvages, invalidées pour CAR, invalidées pour PXR) seront utilisés. Quarante-deux souris de chaque lot recevront une administration intraveineuse d'un mélange de 8 PFC. Vingt-quatre souris par lot seront utilisées pour déterminer la clairance plasmatique des PFC et 18 souris par lot seront utilisées pour déterminer les niveaux d'excrétion rénale et fécale des PFC. Trois souris par lot serviront d'animaux sentinelles pour l'étude. Cette approche cocktail, en administrant plusieurs molécules en même temps, permet de limiter le nombre d'animaux en n'ayant pas trois lots d'animaux par PFC tout en garantissant des résultats fiables.

Afin d'évaluer la clairance totale des PFC, un prélèvement de sang sera réalisé après l'administration sur 24 souris de chaque lot. En termes de raffinement, le recours à un modèle de pharmacocinétique dit de population, permettra d'analyser simultanément les données des cinétiques temporelles des concentrations en PFC dans le plasma à partir d'un nombre limité de prélèvements par souris (1 prélèvement seulement par animal au lieu de 8 prélèvements pour les 8 temps de la cinétique au total). Cette approche a aussi un impact sur le bien-être animal en permettant également de limiter le temps passé en cage à métabolisme par chacune des 18 souris par lot utilisées pour le recueil des urines et des fèces et la détermination des niveaux d'excrétion rénale ou fécale (24h seulement pour 6 souris par lot, soit à 1 jour, soit à 7 jours, soit à 14 jours après l'administration des PFC).

19036 Les maladies hépatiques chroniques telles que la fibrose du foie, le carcinome hépatocellulaire (CHC) et le cholangiocarcinome (CCA), les deux formes majeures de cancer du foie, sont des défis importants pour la santé mondiale. Le cancer du foie est en effet le 3ème cancer le plus meurtrier au monde. Les thérapies permettant le traitement de cette pathologie sont très limitées et les stratégies thérapeutiques visant à prévenir le CHC chez les patients à risque, infectés par le virus de l'hépatite B ou C (VHB, VHC), et/ou présentant une cirrhose hépatique ou une fibrose avancée sont inexistantes. Il a été montré que l'éradication du VHC n'éliminait pas le risque de développement de CHC lorsqu'une fibrose avancée est déjà présente. Cette absence d'option thérapeutique reflète notre méconnaissance des mécanismes moléculaires impliqués dans la progression des maladies hépatiques. Nos approches *in vitro* notamment issues de cellules de patients nous fournissent chaque jour plus d'indications quant aux facteurs génétiques impliqués dans l'évolution de la maladie hépatique. Ces études que nous menons devraient nous permettre d'identifier des facteurs clés importants pour la compréhension de la pathogenèse hépatique et plus particulièrement les gènes liés à la progression de la fibrose au cancer. Afin de valider ces facteurs de risque génétiques identifiés *in vitro*, nous souhaitons utiliser la récemment nobélisée technologie

CRISPR-Cas9, permettant l'invalidation spécifique de gènes in vivo. Cette technologie que nous emploierons chez la souris doit nous permettre d'éteindre l'expression d'un ou plusieurs gènes clés afin de récapituler in vivo le développement de la maladie hépatique conduisant au CHC. Nous forcerons également l'expression de ces gènes clés afin de mieux comprendre leur rôle dans la maladie en cas de surexpression. Pour cette étude, nous envisageons d'utiliser 800 souris sur une période de 5 ans afin de valider un minimum de 5 gènes cibles identifiés in vitro.

Remplacer : dès que cela est possible nous utilisons des approches in vitro, notamment sur des cellules issues de patients. Seuls les gènes validés in vitro seront étudiés in vivo.

Réduire : afin de réduire au maximum le nombre d'animaux nous nous appuyerons sur notre expérience passée avec ces modèles d'étude afin de réduire les groupes au minimum requis pour obtenir des données statistiquement interprétables.

Raffiner : Afin de raffiner au mieux notre méthodologie, le protocole expérimental est planifié en amont, l'environnement des animaux est enrichi, des points limites que sont la perte de poids, une modification de l'activité des animaux, une posture prostrée et un dos voussé, l'apparition de signes de mal être et de douleur sont appliqués, et une méthode de mise à mort appropriée est utilisée. Les données obtenues grâce aux animaux de ce projet seront analysées avec des tests statistiques classiques.

19037 Les traitements pharmaceutiques pour les troubles psychiatriques tels que la dépression, les troubles de stress post-traumatiques et anxieux sont suboptimaux : les anxiolytiques n'ont qu'un effet palliatif et les antidépresseurs nécessitent des semaines, voire des mois pour induire leurs effets bénéfiques et laissent une grande proportion (jusqu'à 50%) de patients insensibles à leurs effets. En dépit de plusieurs décennies d'investissements dans la découverte de nouveaux traitements, aucun concept ou cible radicalement nouveau n'ont émergé au cours des 60 dernières années. Toutes les nouvelles stratégies développées, s'ils ont pu montrer une réduction de certains effets indésirables, ont tous échoué à améliorer de manière significative l'efficacité des traitements. Ces troubles sont la cause principale d'invalidité et de coûts liés à la santé dans le monde, il est donc urgent de reconsidérer les approches scientifiques et méthodologiques dans la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques en neuropsychiatrie.

Au-delà des effets biologiques et cellulaires des antidépresseurs, il reste à caractériser comment le traitement de l'information reçue par le cerveau et les neurones est modifié par les antidépresseurs et laquelle de ces modifications permet in fine de générer la guérison.

Ainsi, nous avons pour but dans ce projet d'étudier de quelle manière un traitement antidépresseur peut modifier le traitement de l'information et les codes générés par les neurones (défini comme « propriétés computationnelles » dans le titre). Pour cela, nous nous concentrerons sur une structure cérébrale particulière l'hippocampe. En effet, il a été montré que les antidépresseurs pouvaient modifier certains processus cellulaires dans l'hippocampe, sans jamais avoir identifié quelle répercussion cela pouvait avoir sur le traitement de l'information et l'activité des neurones de l'hippocampe.

Dans ce but, nous utiliserons un système d'imagerie calcique ultra miniaturisé et portable permettant de visualiser chez la souris l'activité de neurones de cette structure quand celle-ci sera en train d'explorer de nouveaux environnements, et que de nouvelles informations parviendront aux cerveaux et donc à l'hippocampe. Ces expériences permettront de tester la capacité de ces neurones de l'hippocampe à différencier diverses expériences, une capacité considérée comme cruciale pour s'adapter au stress et guérir de la dépression.

Des souris seront donc traitées avec un antidépresseur ou un placebo pendant quatre semaines et habituées à explorer un environnement. Ensuite à la fin du traitement, ces souris seront soumises à de nouveaux environnements qui offriront des variations plus ou moins grandes entre eux de manière à analyser comment ces variations environnementales sont traitées et encodées par les neurones de l'hippocampe en fonction du traitement reçu (antidépresseurs ou placebo).

Ces résultats serviront de base à la compréhension des effets des antidépresseurs dans l'hippocampe et comment ils peuvent sous-tendre une meilleure adaptation au stress.

Cette étude nécessitera un total de 104 souris adultes maximum (mâles et femelles en nombre égal).

Cette étude respectera les 3R :

Raffinement : Les conditions d'élevage des animaux seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu (cabanes en plexiglass et/ou carton, tubes). Les injections/implantations intracérébrales se feront sous anesthésie générale par des chercheurs formés et expérimentés. Les animaux recevront un traitement analgésique avant l'intervention chirurgicale, un traitement anti-inflammatoire après l'intervention et 24 heures après. Si nécessaire un traitement antibiotique sera administré. Chaque animal est placé sur une couverture thermorégulée pour éviter toute hypothermie. Les cornées sont protégées de la déshydratation. L'anesthésie gazeuse est ici privilégiée pour mieux contrôler la profondeur d'anesthésie et pour une meilleure récupération post-opératoire. Une surveillance post-opératoire d'une semaine est réalisée pour suivre chaque souris et intervenir si nécessaire.

Remplacement : aucune méthode alternative in vitro n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée.

Réduction : Les effectifs sont calculés de manière à permettre une réduction des effectifs optimisée permettant de suivre les recommandations éthiques d'obtenir une puissance statistique de 0.8 avec un minimum d'animaux. Le nombre d'animaux pourra être réduit en fonction des résultats et notamment de l'efficacité de l'implantation (maximum 104 souris avec un taux de succès attendu de 50% d'après la société du système et notre expérience ; minimum 52 souris avec un taux de succès de 100%).

19038 Le "syndrome métabolique" désigne, chez l'homme, l'association d'un ensemble de troubles physiologiques (excès de poids, hypertension artérielle) et biochimiques (altérations plasmatiques glucidiques et lipidiques) qui augmentent le risque de diabète de type 2, de maladies cardiovasculaires et de cancers, contribuant à une morbidité et à une mortalité accrues. Ce syndrome concerne 15-25% de la population générale et 40% chez les plus de 50 ans. Il s'accompagne fréquemment d'une accumulation excessive de lipides dans le foie. Cette "stéatose" initiale peut évoluer vers une fibrose et l'apparition d'une cirrhose, regroupées sous le terme anglais de Non Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). L'apparition d'un syndrome métabolique et/ou d'une stéatose hépatique est influencée par plusieurs facteurs, dont la Nutrition Lipidique, au niveau quantitatif et qualitatif (composition en acides gras du régime), est une composante très majoritaire. La prévention nutritionnelle de ces pathologies est donc un enjeu majeur de santé publique.

Or, de nombreuses études épidémiologiques récentes ont montré une réduction du diabète de type 2 et du syndrome métabolique chez les consommateurs de produits laitiers. A l'inverse, une augmentation du risque de diabète de type 2 a été observée chez des sujets ayant supprimé les produits laitiers pour intolérance au lactose. Dans ces études, les acides gras mineurs très spécifiques du lait (acides gras impairs et acides gras monoinsaturés trans) sont utilisés comme marqueurs des apports alimentaires en produits laitiers. Ces différents acides gras sont donc désormais suspectés être d'intéressants modulateurs des fonctions physiologiques chez l'homme. Cependant, les études expérimentales manquent pour confirmer ces données épidémiologiques et décrire les mécanismes physiologiques régulés par ces acides gras.

L'objectif de cette étude expérimentale est donc de mieux comprendre les effets physiologiques des acides gras mineurs du lait sur l'apparition du syndrome métabolique et de la stéatose hépatique, dans un contexte de régime hyperénergétique. Plus précisément, les acides gras suivants seront supplémentés dans les régimes des souris : l'acide pentadécanoïque, l'acide heptadécanoïque et l'acide trans-palmitoléique, comparés à l'acide palmitique. Nous avons déjà réalisé précédemment en 2018 une étude pilote de l'acide trans-palmitoléique sur une période courte (7 semaines) qui a montré des résultats intéressants, mais qui nécessitent d'être confirmés sur une durée plus longue de régime.

Ce projet nécessitera au total l'utilisation de 96 souris. Ce projet a été réfléchi en respectant au mieux la règle des 3R, dans sa démarche éthique appliquée à l'expérimentation animale. Remplacement : ce modèle nutritionnel et expérimental in vivo du syndrome métabolique ne peut pas être remplacé par un modèle in vitro. En effet, le syndrome métabolique résulte de dysfonctionnements physiologiques, métaboliques et hormonaux complexes et globaux (corps entier), impliquant des interactions inter-organes et la sécrétion de nombreux facteurs métaboliques à différents niveaux de l'organisme. Il n'existe pas à ce jour de modèle in vitro reproduisant la complexité des interactions entre organes. Réduction : le nombre d'animaux a été réduit au strict minimum nécessaire pour pouvoir réaliser des analyses statistiques pertinentes et scientifiquement irréprochables, afin de valider les données analytiques obtenues à la fin de la procédure. Raffinement : les animaux seront hébergés dans une structure agréée, qui prend en compte l'éthique animale. L'hébergement se fera en groupes sociaux et les animaux bénéficieront d'un enrichissement adapté dans chaque cage, afin de minimiser le stress induit par l'hébergement. Le raffinement sera complété par une surveillance journalière des animaux, pour s'assurer que les conditions de bien-être sont respectées. De plus, le suivi hebdomadaire du poids des souris et de leur comportement constitueront les principaux points limites.

19039 La myopathie de Duchenne, ou Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD), est une maladie génétique provoquant une dégénérescence progressive de l'ensemble des muscles de l'organisme. Elle atteint 2500 personnes en France dont 99,9% de garçons (environ 200 garçons nouveaux-nés/an). Les symptômes peuvent apparaître à partir de l'âge de 3 ans et sont liés à une anomalie du gène DMD (situé sur le chromosome X), responsable de la production d'une protéine, appelée Dystrophine, impliquée dans le soutien de la fibre musculaire.

Un modèle de souris basé sur la mutation de ce gène a été créé qui reproduit fidèlement les symptômes humains.

Le projet consiste à évaluer dans ce modèle de souris, l'effet bénéfique de nouveaux candidats-médicaments sur la réversion des symptômes musculaires associés à cette myopathie tels que la faiblesse musculaire.

Pour ce projet, il est prévu un nombre maximal de 750 animaux sur 5 ans.

Règle des 3 R:

Remplacement: dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez la souris car il n'existe pas de méthode de substitution (in vitro ou in silico) pour étudier l'impact d'un gène sur un organisme dans sa globalité. A ce jour, la souris est l'espèce la plus adaptée à ce type de modèle d'étude.

Réduction : Un nombre minimal et suffisant d'animaux par groupe est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et d'effectuer des analyses statistiques.

Raffinement : Le raffinement sera obtenu par la mise au point de procédures rigoureuses, un suivi quotidien de l'état de santé des animaux, le suivi des signes cliniques et la détermination des points limites dont certains, spécifiques à ce modèle, prennent en considération l'atteinte musculaire, les difficultés respiratoires et la douleur.

Dans ce projet, le raffinement sera également obtenu par une surveillance accrue des animaux. Les mesures appropriées seront prises pour réduire tout inconfort ou toute douleur qui se développerait.

19040 Les plaquettes sanguines sont essentielles pour le maintien de l'intégrité vasculaire et l'arrêt des saignements. Les thrombopénies auto-immunes résultent de l'émergence d'anticorps anti-plaquettaires. La fixation de ces anticorps sur les plaquettes entraîne leur élimination dans la rate ou le foie, et en conséquence, une chute de leur numération sanguine. Une thrombopénie auto-immune sévère peut donc s'accompagner d'hémorragies graves. Le but du projet est de comprendre, d'une part, comment se forment ces auto-anticorps en tirant partie d'une mutation d'une protéine plaquettaire (protéine G6b-b, chez la souris, ou MPIG6B, chez l'homme) qui s'accompagne du développement d'autoanticorps. Cette déficience permet d'aborder la compréhension du développement des auto-anticorps antiplaquettaires sous un angle jamais

abordé jusqu'à présent. D'autre part, ce projet aura pour but de tester différentes approches afin de restaurer la numération plaquettaire observée dans ces souris déficientes.

Les animaux seront élevés dans des conditions normales, des prélèvements sanguins périodiques seront réalisés, à la fin de l'expérimentation, les souris seront sacrifiées pour une analyse des tissus. Plusieurs temps devront être analysés pour suivre dans la durée le développement des anticorps, leurs caractéristiques et spécificités.

Dans d'autres expériences, l'impact des anticorps anti-plaquettaires sur la durée de vie des plaquettes sera analysé. A cette fin, des plaquettes fluorescentes seront transfusées, puis leur devenir sera suivi pendant 4 jours par prélèvement sanguin journalier. Enfin, les souris seront traitées avec une molécule agissant indirectement sur le récepteur G6b-B afin d'essayer de corriger le défaut de numération plaquettaire.

Remplacement : Le développement d'une réaction auto-immune met en jeu des mécanismes cellulaires complexes qui se mettent en place sur des durées de plusieurs semaines, voire mois, que seules les expériences avec des animaux permettent de suivre. Néanmoins, en fonction des observations sur les prélèvements, des expériences complémentaires permettant l'analyse des mécanismes cellulaires immunologiques peuvent être conduites en utilisant des populations cellulaires définies obtenues à partir des animaux mis à mort.

Raffinement : Bien que les souris soient thrombopéniques et présentent un temps de saignement prolongé, en condition d'élevage normal, aucun inconfort ou pathologie ne semble associé à la mutation ; effectivement, les animaux, maintenus en groupe sociaux, ont déjà été élevés jusqu'à 24 mois sans qu'ait été observé d'anomalie particulière physiopathologique. Toutefois, l'attention sera apportée aux animaux quotidiennement afin de surveiller toute manifestation imprévue d'inconfort. Un point limite de souffrance au-delà duquel le protocole sera arrêté est défini. Tous les protocoles décrivant une injection ou un prélèvement se font sous anesthésie générale gazeuse. Les protocoles sont mis en oeuvre par des personnes compétentes et sont adaptés afin de minimiser la gêne pouvant être occasionnée aux animaux. Après les transfusions de plaquettes la cage des animaux est sur-enrichie de coton cardé pour leur permettre l'améliorer le confort de leur nid. De plus, pour les prélèvements à la queue, les souris seront traitées au moment de l'anesthésie avec un analgésique par voie sous cutanée.

Réduction : Le maximum de tests biologiques post-mortem sont prévus pour chaque animal. Le nombre prévu de souris pour le projet est réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement significatifs.

Ce projet nécessitera 268 souris au maximum

19041 Le Syndrome de Down (SD) ou Trisomie 21 (T21) est la première cause de retard mental d'origine génétique. Le SD est lié à la présence d'une copie supplémentaire du chromosome 21 et touche 1 naissance sur 700. Il se caractérise par des déficiences intellectuelles : les personnes atteintes de SD ayant des difficultés d'apprentissage et de mémorisation qui sont liées à des défauts dans le développement et le fonctionnement du cerveau. L'amélioration des soins apportés aux personnes atteintes du SD a permis d'augmenter considérablement leur espérance de vie. Cette augmentation a mis en évidence chez ces personnes un risque accru de développer, de façon précoce, une maladie d'Alzheimer (MA). En effet, il a été constaté que près de 100% des personnes atteintes de SD présentent les caractéristiques de la MA à 40 ans.

Afin de pouvoir étudier les mécanismes physiopathologiques du SD et des pathologies qui lui sont associées, différents modèles de rat ont été créés. En effet, le rat est physiologiquement et génétiquement proche de l'Homme. Ainsi, chez le rat, les régions homologues au chromosome 21 humain se trouvent sur 2 chromosomes différents : le chromosome 11 et le chromosome 20. Nous avons ainsi généré différents modèles de rats présentant une trisomie de l'une ou des 2 régions homologues au chromosome 21 humain ou de gènes spécifiques, présents dans ces régions et qui semblent jouer un rôle important dans le développement du SD. Le but de ces modèles est de nous permettre de mieux comprendre le rôle de ces régions/gènes dans le développement du SD et des pathologies associées telle que la MA. Pour cela nous réalisons chez ces modèles des études de

comportement afin de mettre en évidence de potentiel déficit d'apprentissage ou de mémoire mais également des analyses moléculaires/cellulaires au niveau du cerveau. Ces dernières ont pour but de mettre en évidence de possibles anomalies structurales/cellulaires dans le cerveau. Par ailleurs, nous réalisons également des études de vieillissement chez certains de nos modèles. En effet, le SD et la MA sont des maladies évolutives. Il nous semble donc indispensable d'étudier les effets des modifications génétiques de nos modèles au cours du temps. Une fois ces modèles caractérisés, de potentiels traitements peuvent être testés afin de voir s'ils permettent d'atténuer ou de faire disparaître les éventuels déficits observés dans nos modèles.

Les premières études réalisées chez nos modèles ont mis en évidence chez 5 d'entre eux des phénotypes dommageables. L'un de nos modèles, présentant une délétion d'un gène qui joue un rôle clé dans le développement du SD, peut présenter des crises épileptiques qui restent cependant rares. Les 4 autres modèles qui présentent une duplication de la région du chromosome 11 rat homologue au chromosome 21 humain ont tendances à développer des lésions cutanées du fait d'une sensibilité à une bactérie. Par ailleurs, chez les animaux gardés en vieillissement, d'autres phénotypes peuvent être observés. Il s'agit ici de symptômes classiquement observés chez les vieux rats tels que les insuffisances rénales, les tumeurs mammaires, le diabète, les détresses respiratoires ou cardiaques.

Dans le cadre de notre projet, nous souhaitons maintenir ces lignées afin d'étudier le SD et la MA dans un contexte de SD. En effet, la caractérisation de ces modèles pourrait nous apporter des éléments clés pour une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques du SD ou de la MA dans un contexte de SD. Par ailleurs, l'étude de ces modèles combinée à la caractérisation des autres modèles que nous avons (ne présentant pas de phénotype dommageable) pourrait nous permettre de déterminer quel région/gène est impliqué dans tel ou tel déficit. Enfin, ces modèles pourraient constituer des modèles de choix pour tester de potentiels nouveaux traitements. Par ailleurs, concernant l'aspect vieillissement, même s'il entraîne l'apparition de nouveaux phénotypes dommageables, il nous semble indispensable. En effet, cela nous permet de suivre au cours du temps l'effet des modifications génétiques réalisées dans nos modèles. Cela permet donc une meilleure caractérisation de nos modèles et donc par conséquent un meilleur suivi de l'évolution de la pathologie et une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents. Il nous semble donc indispensable de maintenir ces lignées afin de les caractériser dans leur globalité aussi bien au niveau comportemental qu'à des niveaux moléculaires/cellulaires avec des analyses réalisées au niveau du cerveau.

Réduction : Dans le cadre de ce projet, nous avons estimé à 7030 le nombre d'animaux à phénotypes dommageables qui seront produits au cours des 5 prochaines années. Cela inclut les animaux nécessaires au maintien des lignées, les 2 sexes pouvant être utilisés, ainsi que les animaux qui seront utilisés dans le cadre d'études comportementales/cellulaires/moléculaires. Dans le cadre de ces études, afin d'utiliser l'ensemble des animaux produits et de prendre en compte une éventuelle variabilité sexuelle, nous utiliserons des mâles et des femelles.

Raffinement : Du fait de leurs phénotypes dommageables, ces animaux font l'objet d'une attention particulière afin de pouvoir détecter le plus précocement possible tous problèmes pouvant altérer leur bien-être. Les animaux seront ainsi suivis quotidiennement tout au long de leur vie. Si un animal présente des signes de douleur ou de mal être, il sera présenté au vétérinaire puis, si un traitement est envisageable, il sera mis en place. A noter que le traitement utilisé devra être adapté au cas par cas en fonction des symptômes rencontrés. Si aucun traitement n'est envisageable, l'animal sera mis à mort. Par ailleurs, tout au long de leur vie, les animaux seront hébergés par 2 et disposeront d'un bâton à ronger comme enrichissement.

Remplacement : Il n'existe à l'heure actuelle pas d'alternative à l'utilisation des animaux pour les études concernant le cerveau. En effet, l'étude de déficits cognitifs nécessite un modèle vivant et suffisamment proche de l'Homme pour pouvoir être transposé à l'espèce humaine. Par ailleurs, il n'existe pas encore de modèle de cerveau in vitro ou autre permettant de réaliser de la recherche fondamentale dans ce domaine.

19042 La Leucémie Myéloïde Chronique (LMC) est un cancer du sang dû à l'apparition d'une anomalie dans la cellule souche sanguine, cellule à l'origine des différentes cellules du sang. Cette anomalie correspond à la fusion de deux chromosomes induisant la création d'un gène de fusion. La présence de ce gène de fusion entraîne une sur-production de globules blancs (un des premiers symptômes de la LMC). Dans les années 2000, des médicaments qui bloquent spécifiquement l'activité de la protéine produite par le gène de fusion ont été développés. Ils empêchent la sur-production de globules blancs. Ces traitements ont été révolutionnaires mais ils provoquent chez certains patients des effets secondaires tels que des nausées, des douleurs musculaires, des œdèmes ou des diarrhées. Des essais cliniques visant à arrêter le traitement après plusieurs années ont permis de montrer que 40% des patients restent sans traitement et sont donc guéris. Cependant, 60% des patients rechutent démontrant la persistance de cellules souches sanguines leucémiques dans leur moelle osseuse qui n'ont pas été éliminées par le traitement. Ce médicament seul ne suffit donc pas.

Notre projet est donc de caractériser le nouveau modèle de souris qui reproduira fidèlement la LMC humaine. Pour cela, les animaux recevront des traitements pour induire la maladie dont l'évolution sera suivie au cours du temps grâce à des prises de sang. L'étude de ce modèle nous permettra ensuite de caractériser les cellules souches leucémiques qui persistent lorsque l'on traitera nos souris avec les médicaments utilisés chez l'homme. Puis, nous essaierons de trouver de nouveaux médicaments qui pourraient éliminer ces cellules souches leucémiques résistantes. Pour cela, nous avons besoin de 1142 souris transgéniques sur 5 ans.

Dans le respect de la règle des 3R :

Remplacement : Ce type d'analyse nécessite l'utilisation d'animaux puisqu'à l'heure actuelle, aucun modèle *in vitro* n'est capable de représenter la complexité des mécanismes qui conduisent à la leucémie myéloïde chronique

Réduction et Raffinement : les lignées transgéniques utilisées comportent 1. des systèmes qui vont permettre à la fois d'induire l'expression du gène de fusion dans un tissu spécifique mais également à un temps donné et 2. des systèmes fluorescents qui vont permettre d'analyser finement et spécifiquement l'évolution des cellules leucémiques et ainsi permettre à la fois de diminuer le nombre d'animaux utilisés mais également de détecter l'apparition de cellules leucémiques très précocement ce qui permettra d'améliorer le bien-être animal par une prise en charge plus rapide. Le bien-être de nos animaux sera pris en compte de leur naissance à leur mort. Les animaux seront hébergés en groupe et l'enrichissement de leur milieu de vie sera systématique. Les animaux recevront une surveillance quotidienne et des soins adaptés (administration d'analgésiques et anesthésiques en pré et/ou postopératoire, mesure hebdomadaire, définition de points limites suffisamment précoces et mise en place de critères d'arrêt).

19043 L'imagerie par Résonance Magnétique (IRM) est une technique d'imagerie extrêmement avantageuse car elle permet d'obtenir des images avec de forts contrastes entre les organes, sans application d'ondes ionisantes, donc de pleine innocuité. Elle est la méthode de référence pour la détection de tumeurs. Elle permet de suivre l'efficacité de traitements anti-cancéreux.

De nos jours, l'hyperthermie d'un tissu tumoral a été reconnue comme traitement du cancer, en synergie avec une chimiothérapie ou une radiothérapie. En effet, il a été montré qu'une élévation de la température locale des tumeurs entraînait une diminution de la croissance du cancer à des températures supérieures à 42°C, alors que les tissus sains pouvaient tolérer ces températures élevées. L'hyperthermie peut être induite par l'application d'un champ radio-fréquence (RF) externe aux patients. L'avantage de cette méthode est sa non-invasivité, mais ce chauffage ne peut pas être localisé. Dans le but d'améliorer la précision du chauffage, l'hyperthermie peut s'accompagner d'une incorporation de particules d'oxydes de fer (IOP) dans le tissu tumoral. Ces particules peuvent détruire les cellules cancéreuses en chauffant localement sous l'action d'un champ magnétique radio-fréquence. De plus, ces particules sont d'excellents agents de contraste pour l'IRM. Le succès récent de l'hyperthermie magnétique dans le traitement anti-cancéreux est très prometteur, mais la méthode nécessite d'être améliorée, autant au niveau de la synthèse des particules de fer, de leur distribution au sein de la tumeur, ou du suivi de la température par IRM. Il a aussi été montré que

les particules de fer pouvaient améliorer le chauffage par ultra-sons focalisés (FUS) en réduisant les dommages aux tissus sains avoisinants et en réduisant leur durée d'application.

Afin de continuer les avancées sur la thermo-ablation, notre projet consiste à optimiser les conditions d'application du champ RF ou des FUS, et à suivre par IRM l'évolution de la tumeur primaire et la formation de métastases chez la souris.

Plus précisément, ce projet consistera à injecter des particules de fer en intra-tumoral, comme ce qui est réalisé chez l'humain, puis d'appliquer un champ radio-fréquence ou des FUS sur un modèle de tumeurs primaires du sein chez la souris. Cette efficacité thérapeutique de l'hyperthermie sera suivie par IRM (détection de la distribution des particules au sein de la tumeur, suivi du volume tumoral et de la présence de métastases).

Le nombre total d'animaux envisagé pour les expérimentations est de 160 souris pour 5 ans. Des expérimentations *in vitro* sur cellules et sphéroïdes seront préalablement réalisées pour prédéterminer les paramètres optimaux des deux thérapies (RF ou FUS). Cependant, pour pouvoir réaliser un suivi du développement métastatique, le passage au modèle animal est irremplaçable. Quatre groupes de souris seront soumis à la RF ou aux FUS (1 ou 3 sessions espacées de 24h). Un groupe contrôle ne subira pas de traitement par RF ou de FUS. Ces groupes seront dupliqués pour comprendre des souris injectées seulement avec des cellules tu-morales mais sans particules de fer pour vérifier la non-toxicité de l'application d'un champ RF ou des FUS ainsi que la validité des diagnostics IRM. Finalement, pour chacun de ces groupes, des exérèses de tumeurs primaires (1cm) pourront être pratiquées sur les animaux dont la tumeur primaire continue de se développer afin de pouvoir suivre l'apparition de métastases sur le long terme.

Chaque groupe contiendra 8 souris. Le nombre d'animaux utilisés est au plus bas, est strictement nécessaire pour le projet, tout en s'assurant que nous aurons suffisamment de données pour être valables statistiquement. Des analyses *in vitro* sur cellules et sphéroïdes seront réalisées au préalable pour déterminer les paramètres optimaux.

Afin de réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux, les mesures suivantes sont appliquées :

- Respect des normes d'hébergement (taille des cages, densité etc.)
- Application de conditions d'ambiance en accord avec l'âge et l'espèce (température, éclairage, hygrométrie) ;
- Fourniture d'eau et d'aliment sans restriction ;
- Manipulation des souris par du personnel qualifié ;
- Enrichissement de l'environnement (maisonnette, paille etc.)
- Mise en place d'un suivi clinique (fiche de suivi post-opératoire, grille d'évaluation de la douleur)
- protocole d'analgésie pré/post-opératoire

L'état de santé des animaux sera suivi quotidiennement pendant toute la durée du protocole.

Nous avons défini des points limites qui permettent d'évaluer l'arrêt du protocole pour limiter la souffrance.

19044 Certaines pathologies chez l'homme nécessitent des traitements médicaux à long terme (6 mois ou plus). Les études de cancérogenèse chez le rongeur ont été développées pour prédire le risque qu'un produit pharmaceutique/chimique induise des tumeurs chez l'homme lorsqu'il est exposé à ce produit sur de longues périodes. Elles sont réalisées lorsque les données *in vitro* de génotoxicité ne mettent pas en évidence un effet mutagène potentiel du composé ou lorsqu'il y a un doute sur l'effet cancérogène lié à la structure du produit à tester. Il n'existe pas d'alternative *in vitro* pour le moment.

Ce projet se résume en l'administration répétée (souvent quotidiennement) d'un produit pharmaceutique/chimique chez le rongeur pendant une durée allant de 6 mois (modèles spécifiques de souris transgéniques, Tg) à 18 (souris) ou 24 mois (rat ou souris non transgéniques). La voie

d'administration est celle utilisée chez l'homme (essentiellement orale, parfois en mélange avec la nourriture, par application dermale, sous cutanée, etc).

L'animal choisi est un mammifère rongeur, espèce recommandée dans les lignes directrices pour ce type d'étude car la durée de vie de cette espèce est compatible avec une exposition au produit sur une très longue période (environ 2 ans chez le rongeur), permettant d'évaluer l'effet possible du produit sur l'apparition de tumeurs sur un animal âgé. A ces fins environ une quarantaine d'organes et toutes les tumeurs observées sont examinées par un pathologiste expérimenté pour discriminer les tumeurs spontanées des tumeurs induites sur la base d'une comparaison avec les animaux contrôles, en utilisant des tests statistiques exigeant un nombre minimal d'animaux en fin d'étude, et de données historiques.

Le nombre d'animaux utilisés dans le cadre de ce projet peut être estimé à un total de 6000 rongeurs sur 5 années (3000 rats, 800 souris, 2200 souris Tg). Ce chiffre repose sur la nécessité d'obtenir des résultats représentatifs et exploitables statistiquement en procédant à toutes les analyses nécessaires sur un nombre d'animaux optimisé pour évaluer l'effet cancérigène d'un composé pharmaceutique ou chimique. Le nombre minimal permet d'identifier l'ensemble des organes par microscopie afin de détecter la survenue de cancers. A minima, trois groupes seront traités avec le produit en doses croissantes et seront comparés avec un groupe contrôle, chacun contenant généralement au moins 50 mâles et 50 femelles (études 18 ou 24 mois) ou 25 mâles et 25 femelles (études 6 mois Tg), comme recommandé par les lignes directrices internationales spécifiques à ce type d'études.

L'hébergement des animaux se fait conformément à la Directive 2010/63 avec enrichissement. Toutefois, l'hébergement individuel peut être retenu lorsque le schéma d'administration l'y oblige (risque de contamination des animaux par voie dermale ou souris CD-1 mâles par exemple).

Les animaux sont observés pendant toute la période de l'étude pour détecter l'apparition de masses. Des analyses hématologiques et biochimiques peuvent être réalisées en fin ou en cours d'étude (option). Des prélèvements sanguins sur des animaux satellites permettent d'établir un profil toxicocinétique afin de relier les effets chez l'animal avec les données d'exposition humaine obtenues dans les essais cliniques. Des examens ophtalmologiques peuvent aussi être réalisés.

En fin d'étude, les animaux sont euthanasiés selon une méthode éthiquement acceptée et un examen histopathologique qui représente la partie la plus importante de l'étude est fait pour détecter, identifier et comparer les lésions tumorales. Le développement de masses trop important (génant l'administration, la vie normale de l'animal, cas d'ulcération) ainsi que la dégradation clinique des animaux font partie des critères de sacrifice prématuré. La survie par groupe est sous surveillance fréquente car elle peut impacter sur la validité de l'étude (exemple: disposer entre 20 et 30 animaux/groupe entre les semaines 80-90).

Le design des études peut être soumis à l'examen d'autorités (FDA par exemple).

19045 Un sens de l'odorat fonctionnel est essentiel pour évaluer et apprécier les aliments, recevoir des informations sur les congénères détecter les menaces à l'aide de molécules odorantes transportées par l'air. Ainsi, un odorat défaillant est associé à une dégradation de la qualité de vie liée à une incidence plus élevée de troubles psychiques tels que la dépression et le sentiment d'insécurité sociale. Par ailleurs, il existe une population croissante de personnes âgées dont l'odorat est altéré par le vieillissement ainsi que par des traitements médicamenteux. Enfin, la perte d'odorat est un symptôme précoce des maladies dégénératives (Alzheimer, Parkinson) et des infections virales (COVID-19).

Notre projet a pour objectif d'étudier des enzymes (protéines) présentes dans les tissus olfactifs de la cavité nasale dont le double rôle est (i) d'éliminer les molécules odorantes après qu'elles aient été détectées afin d'éviter de saturer le système olfactif et (ii) de produire, à partir des molécules odorantes de nouvelles molécules odorantes pouvant également être détectées et donc intervenir dans la perception olfactive. Ce mécanisme est très innovant pour la compréhension du processus de l'olfaction, il peut expliquer les troubles olfactifs dont souffrent certaines personnes en particulier

lors de pathologies ou de leur traitement. Notre objectif est d'analyser la régulation des enzymes (expression et activité) après exposition des tissus olfactifs à des odorants.

Il est extrêmement difficile d'étudier ces enzymes chez l'homme pour des raisons de disponibilité en tissus olfactif. Le rat présente un système olfactif très proche de l'homme, nous avons mis en évidence la fonction de ces enzymes en travaillant sur des explants de tissus olfactif de rat. Concernant la règle des 3R :

- Remplacement : il n'est pas possible de se passer des tissus de rat pour l'objectif de l'étude. Compte tenu de la complexité de ce tissu épithélial, aucune culture cellulaire ne peut présenter les caractéristiques d'un prélèvement à partir du rat.

- Raffinement : les animaux sont hébergés en cage de 3 avec enrichissement de milieu, les animaux ne subissent aucun geste technique durant leur hébergement

- Réduction : un maximum de 5 tissus olfactifs de rats sont utilisés pour chaque condition expérimentale ainsi que le contrôle, permettant une exploitation statistique des résultats (Test T) et donc une Réduction du nombre d'animaux. De même, nous avons mis au point des analyses sur des homogénats de tissus olfactifs permettant de Réduire le nombre de rat, puisque 10 analyses peuvent être réalisées sur un homogénat issu d'un seul rat.

Nous travaillons uniquement à partir d'explants de tissus olfactifs après dissection post mortem. Notre projet nécessite l'utilisation régulière de tissus olfactifs de rat à raison de lots de 40 de rats tous les 5 à 6 mois pendant 3 ans (soit au total 240 rats).

19046 Le système d'horloge interne, ou rythme circadien, inhérent à chaque individu, permet de réguler finement de nombreux processus cellulaires et métaboliques. Chaque organe possède son propre rythme circadien et la dérégulation de celui-ci peut aboutir à l'apparition de pathologies. La fibrose hépatique est une atteinte du foie qui apparaît lors d'infections virales ou suite au développement de la maladie du foie gras, également appelée maladie du soda, lié à une alimentation déséquilibrée. Cette maladie est notamment responsable de l'apparition de fibrose aggravée voire de cirrhose (dernier stade de la fibrose) qui peuvent dégénérer en cancer du foie qui est actuellement le 3ème cancer le plus meurtrier au monde. Le contrôle du développement de la fibrose est donc un enjeu majeur de santé publique pour lequel il n'existe pas de traitement à l'heure actuelle. L'apparition de la fibrose hépatique semble en partie liée à la dérégulation du rythme circadien. Le foie est en effet un tissu présentant un rythme circadien où jusqu'à 20% des gènes sont régulés via un complexe de protéines spécifiques de ce cycle. Des travaux in vitro ont montré l'importance du cycle circadien dans l'activation de gènes impliqués dans le développement de la fibrose, et dont l'expression peut être régulée par des molécules modulatrice du rythme circadien.

Afin de valider cette approche de modulation du cycle circadien comme potentielle thérapie contre la fibrose hépatique, nous souhaitons utiliser 2 modèles de souris, dont un modèle au foie humanisé avec des cellules humaines, chez lesquels nous induirons le développement de la fibrose pendant 12 semaines grâce à une nourriture enrichie en gras. Les animaux seront ensuite traités quotidiennement pendant 4 semaines avec une molécule permettant de moduler l'expression des gènes impliqués dans le cycle circadien.

Remplacement : Afin de s'assurer de la nécessité de réaliser des tests sur animaux, de nombreuses expériences ont été réalisées en amont in vitro sur des modèles cellulaires et sur des cellules issues de patients.

Réduction : Un nombre de 94 animaux et 5 couples reproducteurs, soit 104 animaux, devraient être nécessaire afin de mener à bien ce projet. Afin de réduire au maximum ce nombre, nous n'utiliserons qu'un nombre minimum d'animaux afin d'obtenir des données scientifiques et statistiques interprétables.

Raffinement : Afin de raffiner aux mieux notre méthodologie le protocole expérimental est planifié en amont, l'environnement des animaux est enrichi, des points limites que sont appliqués et une méthode de mise à mort appropriée est utilisée. Des traitements appropriés (analgésiques, collyre) sont également utilisés. La molécule modulatrice du cycle circadien a déjà été utilisée dans les

modèles que nous proposons d'étudier et n'a pas montré de toxicité particulière. Les données obtenues sur les animaux seront analysées avec des tests statistiques classiques.

19047 Le cancer du sein et de l'ovaire sont des causes majeures de décès par cancer chez la femme dans le monde, et leur survenue représente un problème majeur de santé publique. Les formes les plus agressives et de mauvais pronostic que sont les tumeurs de sous-type triple-négatif pour le cancer du sein, et de haut grade séreux pour les cancers de l'ovaire, sont couramment traitées par chimiothérapie conventionnelle associant des taxanes (ciblant le cytosquelette de microtubules) et des agents ciblant l'ADN (anthracyclines et les sels de platine). Ces chimiothérapies cytotoxiques sont une source d'importants effets secondaires, cependant leur efficacité est limitée par des phénomènes de résistance qui conduisent à des récives souvent fatales pour les patientes.

Il est crucial aujourd'hui d'identifier des biomarqueurs de résistance à la chimiothérapie pour sélectionner les patientes les plus à risque de rechuter après traitement, afin de pouvoir assurer un suivi plus poussé de ces patientes, et concevoir pour elles de nouvelles approches thérapeutiques personnalisées.

L'objectif de ce projet vise à potentialiser l'efficacité des chimiothérapies actuelles et à évaluer l'effet anti-tumoral et anti-métastatique de nouveaux composés thérapeutiques dans plusieurs modèles de cancers du sein et de l'ovaire.

Ce projet implique l'induction de la formation de tumeurs et de métastases chez la souris afin de pouvoir suivre la diminution de la taille des nodules tumoraux et métastatiques après traitement.

Ce projet prévoit l'utilisation de 960 souris.

Les expériences sont préalablement réalisées *in vitro* afin de valider les hypothèses de travail et de sélectionner les meilleurs modèles cellulaires et les meilleurs candidats médicaments afin de réduire au maximum le nombre de souris nécessaires

Plusieurs modèles cellulaires de tumeurs du sein et de l'ovaire ont été mis au point à partir de cultures en 3-dimensions (sphéroïdes) en présence ou non de matrice extracellulaire et permettront de reproduire partiellement les conditions de croissance tumorale et d'invasion tumorale *in vitro*. Ces modèles représentent une première estimation pour l'analyse de la réponse au traitement avant l'utilisation des modèles *in vivo*.

Cependant, les expériences *in vitro* ne tiennent pas compte de l'environnement complexe de la tumeur intégrée dans un organisme entier ce qui peut modifier la réponse au traitement. Seules les expériences *in vivo* permettent de confirmer les résultats obtenus *in vitro* et de valider la réponse de la tumeur au traitement au sein d'un organisme entier. Ces expériences sont par ailleurs un prérequis au transfert vers la clinique.

Pour limiter le nombre de souris, la formation et croissance des métastases sera suivie par imagerie intravitale permettant de mesurer le développement d'une métastase au sein de la même souris au cours du temps. L'analyse des données de la littérature permettra de prédéterminer les doses optimales des différentes molécules à utiliser et d'éviter l'utilisation d'animaux supplémentaires pour définir ces doses.

Les expériences sont planifiées pour ne pas générer de souffrance des souris. L'utilisation de l'imagerie intravitale permet de suivre et de quantifier la formation de métastases de manière non invasive et non douloureuse. Le suivi régulier des souris permettra de détecter précocement une éventuelle souffrance des animaux et d'y remédier soit par administration d'analgésique soit par arrêt de la procédure.

19048 Dans un futur proche, le nombre et la durée des missions spatiales habitées devraient inexorablement augmenter. En effet, les agences spatiales ont comme projet d'envoyer à plus ou moins long terme des astronautes sur la Lune, Mars ainsi que sur des astéroïdes ; tandis que des compagnies privées souhaitent développer une exploitation commerciale de l'espace en proposant des services comme le tourisme spatial et les taxis de l'espace. Dans ce contexte, il est nécessaire de mieux connaître les effets de la microgravité sur la physiologie humaine. Notre équipe de recherche a récemment démontré chez l'homme et l'animal que l'hepcidine, une hormone hépatique

essentielle à la régulation du métabolisme du fer, était davantage synthétisée en réponse à la microgravité. Cette augmentation est à l'origine d'une redistribution du fer dans l'organisme en faveur d'une augmentation du stockage du fer, notamment dans la rate, associée à une diminution de la biodisponibilité en fer. La réduction de la biodisponibilité en fer participe à réduire la synthèse de globules rouges et donc favorise une anémie, alors que le stockage de fer au sein des organes pourrait promouvoir l'atrophie musculaire et l'ostéoporose. Bien qu'il y ait autant d'astronautes hommes et femmes, l'ensemble des connaissances sur le métabolisme du fer est cependant issu d'études réalisées uniquement chez l'homme. Dans le cadre d'une récente étude clinique, nous avons mis en évidence une différence de réponse de l'hepcidine chez des jeunes hommes et femmes exposés à la microgravité simulée (i. e. alitement prolongé). Dans ce contexte, notre projet a pour ambition de conduire une étude pré-clinique chez 24 rats mâles et 24 rats femelles soit 48 animaux exposés à la microgravité simulée visant à explorer les mécanismes biologiques sous-jacents permettant d'expliquer cette différence de réponses entre homme et femme. Une attention particulière sera portée sur les facteurs régulant l'hepcidine, parmi lesquels le statut hormonal. Les résultats obtenus permettront ainsi d'obtenir des connaissances permettant d'individualiser au mieux la prise en charge médicale et nutritionnelle des astronautes dans l'espace.

Ce projet de recherche a été pensé en respectant au mieux la règle des 3R. Par l'intermédiaire de ce protocole expérimental, nous pourrions déterminer les changements physiologiques au sein du foie, de la rate et de la moelle osseuse rouge donc seulement observables dans un modèle in vivo (Remplacement). Le nombre d'animaux est choisi en fonction de la quantité nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement exploitables et valider les données obtenues à la fin de la procédure (Réduction). Finalement, les animaux seront hébergés dans une structure agréée qui tient compte de l'éthique animal et assure le suivi quotidien. L'hébergement se fait dans des cages individuelles, accolées et transparentes, pour réduire la sensation d'isolement. De plus, les cages sont munies de jouets compatibles avec le modèle afin de minimiser le stress induit par le modèle expérimental. Le raffinement est complété par une double surveillance journalière des animaux pour s'assurer que les conditions de bien-être des animaux sont optimales (Raffinement).

19049 La leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) est un cancer du sang, ou hémopathie. Les leucémies sont les cancers les plus fréquents chez les enfants, et, bien que moins fréquentes, concernent un nombre de cas similaires chez l'adulte. Malgré les nombreux progrès thérapeutiques et le développement des immunothérapies, le pronostic reste sombre chez les enfants en rechute et la survie à long terme est inférieure à 50% chez l'adulte. Les traitements de type chimiothérapie sont associés à des toxicités importantes et l'ajout de cytotoxiques n'a pas été associé à un gain en survie. Par ailleurs, il a été démontré une forte dépendance des cellules leucémiques avec leur microenvironnement au sein de la moelle osseuse. Dans ce contexte, le développement de thérapies ciblées dirigées contre les cellules tumorales et les cellules du microenvironnement apparaît comme une approche séduisante.

L'expérimentation animale est rendue indispensable du fait de l'impossibilité de reproduire le microenvironnement tumoral in vitro et de mener ce type d'expérimentation chez l'Homme. L'objectif de cette demande est d'utiliser des modèles murins validés pour étudier les interactions entre les cellules leucémiques et les différents composants de la niche tumorale en particulier l'innervation et les cellules stromales. Ces modèles que nous souhaitons mettre en place, basés notamment sur la greffe de cellules leucémiques de patients à des souris immunodéficientes, sont largement décrits dans la littérature pour reproduire l'hétérogénéité génétique à l'origine de la maladie, récapituler les réponses aux traitements de la tumeur et enfin permettre d'évaluer la meilleure cible thérapeutique. Enfin, l'utilisation de souris transgéniques développant spontanément des leucémies murines permettra d'étudier les phases précoces du développement leucémique et l'implication des cellules du microenvironnement dans le développement et la résistance aux traitements des cellules leucémiques.

Le respect de la règle des 3 R dans ce projet se traduit par :

-Le Remplacement : le microenvironnement tumoral ne peut être reproduit in vitro du fait de sa complexité, des nombreux acteurs impliqués dans le développement tumoral et de la résistance

aux traitements. Il est par ailleurs impossible de conduire ce type d'expérimentation chez l'Homme rendant indispensable le recours à des modèles murins. Cependant, l'identification des cellules du microenvironnement soutenant le développement leucémique nous permettra d'envisager leur purification et leur mise en culture *in vitro*. La mise en place de systèmes de co-cultures avec les cellules leucémiques permettra ainsi par la suite de remplacer tant que possible les analyses *in vivo*.

-La Réduction : ces études sur l'animal sont réalisées après une étude bibliographique détaillée afin d'optimiser nos protocoles pour réduire au maximum le nombre d'animaux. Ainsi, le nombre maximal d'animaux utilisés pour ce projet sera de 768 souris et permettra d'étudier : 1) analyse du microenvironnement et de la niche leucémique, 2) impact de l'innervation et 3) étude de l'influence réciproque du microenvironnement et des cellules leucémiques ou pré-leucémiques. Les lots d'animaux ont été définis au mieux et de façon statistique afin d'atteindre ces objectifs, d'assurer la robustesse des résultats et de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés.

-Le Raffinement : les animaux seront élevés dans des conditions adaptées: locaux confinés, portoirs ventilés, eau et nourriture *ad libitum*. Les souris seront hébergées avec un maximum de 5 par cage et aucune souris ne sera hébergée seule afin de respecter leur instinct grégaire. L'utilisation d'analgésiques et d'anesthésiques permettra d'éviter toute souffrance aux animaux. De plus, l'évaluation quotidienne des animaux sans stresser l'animal, le suivi de leur poids et de leur comportement permettra d'avoir un contrôle continu sur leur état de santé. L'apparition de signes d'inconfort ou d'éventuelle souffrance nous conduira à choisir l'action appropriée à mener en fonction d'une grille de score de douleur spécifique de ces modèles de pathologies hématologiques.

19050 L'inflammation est la réaction du système immunitaire à une agression externe (infection, trauma, brûlure, allergie, etc) ou interne (cellules cancéreuses). C'est un processus universel qui concerne tous les tissus, faisant intervenir l'immunité innée et l'immunité adaptative.

L'inflammation est une réaction de défense généralement bénéfique mais qui pose parfois problème, par la douleur qu'elle engendre, lorsqu'elle perdure et devient chronique ou qu'elle se dérégule entraînant un syndrome d'inflammation systémique appelé sepsis.

Nous avons récemment découvert, lors d'études *in vitro*, que le blocage du transport intracellulaire peut déclencher le processus inflammatoire sans aucun autre stimulus habituellement nécessaire. (déclenchement spontané de l'inflammation)

Nous voulons vérifier si ce mécanisme est également présent *in vivo* en utilisant une approche génétique et une approche pharmacologique. L'approche génétique consiste en l'étude de souris génétiquement modifiées dans lesquelles une protéine cruciale pour le mécanisme du transport intracellulaire est absente dans des tissus spécifiques de l'inflammation.

L'approche pharmacologique consiste en l'injection d'un inhibiteur spécifique de notre protéine d'intérêt impliquée dans la voie du transport intracellulaire.

Différents groupes d'animaux seront soumis à 2 procédures expérimentales qui sont des modèles validés d'induction de l'inflammation: l'injection intrapéritonéale de Lipopolysaccharide (LPS) et la Ligature et Ponction Caecale (LPC).

Nous prévoyons d'utiliser 1296 souris au maximum.

Remplacement : Dans ce projet, nous utiliserons le modèle murin car nous voulons confirmer notre découverte, réalisée *in vitro*, dans un contexte physiologique où énormément d'interactions entre différents types cellulaires entrent en jeu. De plus, des lignées génétiquement modifiées, n'exprimant plus notre protéine d'intérêt sont disponibles.

Réduction: Ce projet nécessitera un total de 1296 souris. Ce nombre est nécessaire et suffisant pour une comparaison statistique fiable de la mortalité et des niveaux sanguins des différents marqueurs de l'inflammation.

Si aucune différence n'est observée entre les groupes au cours de la procédure du LPS, le projet sera alors arrêté et la procédure de ligature et perforation caecale (LPC) ne sera pas réalisée.

Raffinement: Certaines procédures entraînent une réponse inflammatoire sévère qui peut aboutir à la mort des animaux. Afin de limiter autant que possible leur souffrance, des traitements antalgiques puissants seront administrés préventivement et curativement aux animaux testés. Des points limites seront également fixés, au-delà desquels l'expérience sera arrêtée et les animaux sacrifiés. Par ailleurs, les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale par du personnel compétent.

19051 Les produits de santé (médicaments, dispositifs médicaux, etc.) constituent un élément clé dans la dispensation de soins de qualité aux patients. En effet, en alliant innovation et santé, la recherche et le développement de ces produits s'avèrent indispensables pour favoriser le progrès médical et l'accès aux meilleurs soins à tous.

Or, par nature, ils sont destinés à être mis en contact avec le corps humain et peuvent donc entraîner des effets secondaires au niveau du site d'implantation : des dégradations importantes des tissus environnants peuvent nécessiter une ré-intervention chirurgicale. Des séquelles fonctionnelles peuvent en résulter dans les cas les plus graves. L'innocuité des produits de santé doit donc être testée pour garantir le bon rétablissement des patients après chirurgie. Par ailleurs, tout produit de santé se doit d'être efficace lors de son utilisation clinique.

Il est donc impératif, comme le souligne la réglementation (ex : ISO 10993, ISO 16672, ISO 15798, ISO 11979, Pharmacopées Nationales, lignes directrices (OCDE), directive 2007/47/CE) de prouver l'efficacité des produits de santé et de réduire au minimum le risque que des réactions indésirables se manifestent avant de proposer un produit sur le marché. Notre société est fortement engagée dans le développement de méthodes alternatives in vitro : tests de cytotoxicité, test d'irritation in vitro, test de sensibilisation in vitro, modélisation sur cultures tissulaires et analyse mathématique du risque de toxicité. Cependant, les méthodes alternatives existantes à ce jour ne permettent ni de couvrir l'ensemble des risques toxiques incombant aux produits de santé ni d'en tester intégralement l'efficacité, en particulier en raison de la complexité des mécanismes de régulation d'un organisme vivant. L'utilisation d'animaux est alors obligatoire pour y parvenir.

Dans ce projet, il s'agit principalement d'évaluer la performance et la tolérance locale de produits de santé utilisés en ophtalmologie (ex : implants oculaires). Lorsque la législation et les normes en vigueur imposent de s'en assurer sur des modèles animaux, les lagomorphes et les porcins sont les modèles privilégiés étant donné leurs similitudes reconnues avec l'homme.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est basé sur les recommandations des textes de référence (ex : norme ISO 10993) et sur les contraintes scientifiques (ex : nombre suffisant d'animaux pour assurer la validation scientifique des études). Dès que cela n'impacte pas la santé ni le bien-être de l'animal, l'utilisation d'un même animal est optimisée de sorte à réduire le nombre total d'animaux utilisés (réutilisation d'un même animal après une période de repos ou optimisation du nombre de sites étudiés sur un même animal). Le nombre d'animaux utilisés dans le cadre de ce projet est estimé à 70 par an.

Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. Quelles que soient les études, la douleur est rigoureusement contrôlée et proscrite grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (ex : anesthésie/analgésie). Les porcins sont hébergés en groupes sociaux harmonieux sauf lorsque les contraintes de l'étude l'empêchent. Dans ce cas, l'hébergement individuel devra être justifié et validé par la structure du bien-être animal. Concernant les lagomorphes, des contacts visuels, olfactifs, auditifs voire tactiles entre congénères sont maintenus grâce à la structure des compartiments. Des enrichissements standards spécifiques à chaque espèce (jouets pour les porcins et chainette + bâton à ronger pour les lagomorphes) sont présents dans les hébergements. Enfin, de la musique est diffusée en salle d'hébergement.

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

19052 La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative caractérisée par des troubles cognitifs et psycho-comportementaux entraînant une perte d'autonomie. Avec le vieillissement de la population, cette maladie représente un véritable enjeu scientifique, humain, social et économique. Nous avons mis en évidence à partir des études sur la rétine un nouveau gène cible pour la maladie d'Alzheimer. Il semblerait non seulement être impliqué dans les mécanismes métaboliques à l'origine de la mémoire à long terme mais également jouer un rôle important pour une protéine centrale dans la MA. Nos recherches portent donc sur une nouvelle signalisation métabolique qui permettrait à terme de développer un traitement de cette maladie incurable. Notre projet utilise la transgénèse combinée à la thérapie génique par analyser chez la souris les effets sur le comportement, la fonction des cellules nerveuses dans le cerveau et leur métabolisme.

Au total 36 animaux seront nécessaires à ce projet. Pour réduire le nombre d'animaux et éviter tout doublon, les mêmes animaux seront utilisés pour réaliser les tests comportementaux et l'étude des structures cérébrales. Cette expérimentation animale est rendue nécessaire pour nos travaux en regard de la complexité de la physiologie du cerveau qui ne peut être recréée par des approches in vitro. Toutefois, nous gardons à l'esprit notre responsabilité de diminuer au maximum le nombre d'animaux expérimentés tout en garantissant la pertinence statistique. Nous prendrons en compte avec la plus grande attention le bien-être de nos animaux.

Le projet sera réalisé en respect du principe décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R » remplacement, réduction et raffinement.

Remplacement: : les tests de mémoire nécessaires pour cette étude ne permettent pas de remplacer l'utilisation des animaux par des méthodes in vitro.

Réduction: nous utiliserons des animaux en nombre minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé.

Raffinement : les expérimentations de ce projet seront réalisées par un personnel compétent effectuant couramment les différentes procédures et respectant l'ensemble des règles relatives au bien-être animal, limitant ainsi au maximum le stress de l'animal. Par ailleurs, les souris seront maintenues le plus souvent dans leur environnement habituel, excepté lors du test de l'étude de l'activité locomotrice, où les souris seront isolé pendant la durée de l'expérience. ils seront replacés dans leurs cages classiques (incluant litière et enrichissement).

Les procédures mises en oeuvre impliquent un suivi régulier, notamment une pesée hebdomadaire; en cas de souffrance d'un animal, l'avis du vétérinaire sera demandé.

19053 1) Contexte et objectifs

L'utilisation de vermifuges de manière systématique contre les petits strongles ou cyathostomes, principaux parasites digestifs des équidés, a conduit à l'émergence de populations de parasites résistants à ces vermifuges. Il est donc important de raisonner cette vermifugation. Aujourd'hui la seule technique disponible est de réaliser des coproscopies individuelles sur les équidés afin de déterminer le nombre d'œufs de strongles excrétés dans les crottins et ne vermifuger que les équidés qui excrètent des œufs au-delà d'un certain seuil. Malheureusement, cette technique de coproscopie reste imparfaite.

L'objectif de ce projet est de valider sur le terrain, chez des équidés, deux tests immunologiques (recherche d'anticorps dirigés contre ces strongles), le premier sérologique (dans le sérum), le second salivaire. Pour cela nous suivrons l'évolution conjointe des marqueurs immunologiques, des résultats de coproscopies. Des mesures sur les animaux pour rechercher des éventuelles conséquences zootechniques ou cliniques (amaigrissement, diarrhée...) de l'infestation par les petits strongles seront réalisées ainsi qu'un suivi de l'infestation des parcelles pâturées.

= pas de possibilité de REMPLACER

2) Description des mesures et prélèvements sur les animaux

3 lots de 15 équidés (45 équidés) seront suivis entre février 2021 et février 2022.

Nous avons besoin de suivre plusieurs lots d'équidés ayant des conduites variées de pâturage et ainsi des niveaux d'exposition et d'infestation différents. L'effet de cette variabilité sur la cinétique de ces marqueurs immunologiques permettra d'être exploré.

Les effectifs d'équidés par lot permettront la réalisation de tests statistiques non paramétriques intra-lot (ex : test de Wilcoxon Mann Whitney pour comparer des moyennes, etc.). Des effectifs plus faibles feraient diminuer la puissance de nos tests et la robustesse de nos conclusions.

La combinaison de l'ensemble des équidés permettra la réalisation de tests statistiques paramétriques ($n > 30$).

= REDUIRE

Concernant les prélèvements biologiques (féces, sang et salive), ils seront réalisés tous les deux mois sur chaque équidé placé au préalable dans une barre de contention adaptée et toujours avec un congénère à ses côtés (environnement connu, limitation du stress). Les prélèvements seront réalisés par une personne compétente. Un animalier qui a l'habitude de les manipuler sera positionné à leur tête et les tiendra en longe. En cas de difficulté éventuelle à faire rentrer une jument dans la barre ou si la jument présente des signes de stress dans la barre ou lors de prélèvements, la jument sera retirée de l'étude.

i) Prélèvement de crottins par voie trans-rectale pour analyse coproscopique :

La palpation transrectale sera réalisée à l'aide d'un gant de fouille préalablement lubrifié. Le prélèvement sera réalisé dans la partie la plus postérieure du rectum sauf dans le cas où celle-ci est vide. Dans ce cas, la fouille sera plus profonde.

Après chaque prélèvement, le gant de fouille sera visualisé avant d'être retiré afin de rechercher la présence éventuelle de sang, indicatrice d'une lacération rectale.

- En cas de présence de sang sur le gant de fouille, la jument sera placée dans un box pour permettre une surveillance clinique étroite pendant 1 semaine minimum et un traitement médical et/ou chirurgical sera réalisé si nécessaire.

- En cas de doute, (ex : jument qui a bougé lors du prélèvement), la jument sera relâchée au pré avec le reste du troupeau pour limiter son stress mais une surveillance accrue (3 fois par jour) sera réalisée par les animaliers : prise de température, observation de la couleur des muqueuses, recherche de sang dans les selles, évaluation du comportement (appétit, signes de coliques, isolement par rapport au reste du troupeau...). Un examen vétérinaire sera réalisé ainsi que des examens complémentaires si nécessaire.

- En l'absence de doute, les juments seront relâchées au pré et soumises à une surveillance routinière.

ii) Prélèvement de sang pour test sérologique :

Il sera réalisé en regard de la veine jugulaire. Le site de prélèvement sera préalablement nettoyé à l'aide d'une compresse imbibée d'alcool. Une compression de la veine sera réalisée et la perméabilité et la souplesse de la veine seront vérifiées puis le prélèvement sera réalisé à l'aide d'une aiguille stérile double à prélèvement de 0,9 mm de diamètre. Cet acte est fréquemment réalisé chez les équidés et est bien toléré.

iii) Prélèvement de salive pour test salivaire :

Le prélèvement salivaire consiste à introduire un coton hydrophile tenu par une pince à clamer à bouts ronds entre les mâchoire et lèvre supérieures gauches après ouverture légère de la bouche du cheval en introduisant le pouce en regard de la commissure des lèvres. Le coton sera ensuite inséré dans un tube Eppendorf de 2ml.

Ces deux derniers types de prélèvements (sang et salive) seront réalisés du côté gauche de l'équidé, côté duquel les chevaux sont classiquement manipulés. Au préalable, l'animalier cachera la vision latérale de l'œil gauche du cheval avec sa main et rassurera le cheval avec sa voix. Si nécessaire, un pli de peau sera réalisé sur l'encolure par l'animalier.

Les équidés seront également pesés par passage sur une balance et une note d'état corporel leur sera attribuée par palpation des zones d'intérêt de l'équidé. Le cheval sera tenu au licol par un animalier pendant ces manipulations.

19054 L'athérosclérose est un problème majeur de santé mondial dont les maladies cardiovasculaires associées sont responsables de plus de 30% de la mortalité humaine selon l'Organisation Mondiale de la Santé, constituant ainsi la première cause de décès au monde. Il s'agit d'une maladie inflammatoire chronique liée à l'âge et se caractérise par la formation de plaques de graisses dans la paroi interne des artères de gros et de moyens calibres. Ces plaques s'épaississent et rétrécissent la lumière de l'artère, ce qui induit une perturbation du flux sanguin. Dans la plupart des cas, elles restent stables et non symptomatiques mais dans certaines conditions, la réponse immunitaire mise en place après l'infiltration des lipides fragilise l'enveloppe de la plaque qui devient plus susceptible de se rompre. La rupture des plaques provoque la formation d'un caillot qui va ralentir puis bloquer totalement la circulation sanguine, induisant ainsi différentes maladies cardiovasculaires selon les artères touchées. Les plaques se développent essentiellement dans les régions des artères où le flux sanguin est lent et perturbé comme dans les zones de bifurcations. Afin de limiter les effets délétères de ces plaques, un stent est alors implanté dans la région endommagée permettant de rétablir le diamètre du vaisseau, c'est la technique d'angioplastie. Malheureusement ce geste n'est pas sans conséquence et peut provoquer le développement de complications artérielles responsable de la néoathérosclérose qui est le développement d'une nouvelle plaque intra-stent également susceptible de se rompre.

La plupart des facteurs de risques de l'athérosclérose, comme une alimentation riche en gras (augmentation du taux de cholestérol sanguin), la sédentarité ou le tabagisme sont modifiables par un changement d'hygiène de vie, mais deux facteurs importants dans le développement de la maladie ne le sont pas, il s'agit du sexe et de l'âge des individus. En effet, il a été montré que le risque de développer des maladies cardiovasculaires suite à la rupture d'une plaque augmente de façon croissante au fur et à mesure du vieillissement des individus, et il existe des différences tout au long du développement de la maladie entre les hommes et les femmes, que ce soit chez les personnes jeunes ou âgées. Etant donné que l'athérosclérose débute suite à un dysfonctionnement de la physiologie des cellules endothéliales artérielles (la couche de cellules tapissant l'intérieur des vaisseaux sanguins qui sont en contact direct avec le sang), le but de ce projet est de comprendre et de caractériser la structure et la fonction de ces cellules endothéliales dans la physiopathologie cardiovasculaire et de comparer ces caractéristiques suivant l'âge et le sexe. Des cibles thérapeutiques impliquées dans le développement de l'athérosclérose durant le vieillissement seront aussi recherchées. Ce projet entre dans le projet multisite INSPIRE qui vise à améliorer la qualité de vie et la santé des personnes âgées dans une population mondiale de plus en plus vieillissante.

Ainsi, ce projet utilisera des souris génétiquement modifiées mise sous régime gras et comprendra deux types d'interventions chirurgicales au niveau de l'artère carotidienne chez l'animal. Ces interventions ont le but de soit de mimer la pose d'un stent, soit de provoquer une perturbation du flux sanguin. Une attention toute particulière au bien-être des animaux sera portée par l'application stricte de la règle des 3R dont les objectifs sont de réduire au maximum le nombre d'animaux, de raffiner en supprimant ou soulageant l'inconfort, la détresse et l'angoisse subis par les animaux et de remplacer l'utilisation des animaux en travaillant sur des cellules ou des tissus. Dans le cadre du raffinement, une procédure de prise en charge de la douleur (utilisation d'anesthésiants et d'antalgiques) sera mise en place avant, pendant et après les opérations chirurgicales afin de limiter la douleur et le stress et permettant une récupération optimale des animaux (utilisation de lampe et de table chauffantes, observation quotidienne des animaux, application d'un gel ophtalmique analgésique). Des points limites seront fixés et particulièrement observés au cours du projet permettant d'euthanasier les animaux dès leur apparition. Ces points limites se manifestent par des signes de douleur tels que la prostration, un rythme cardiaque irrégulier, un isolement vis-à-vis de congénères, une mauvaise alimentation au travers de la surveillance de la prise de boisson et de nourriture. Enfin, les conditions d'hébergement incluront les mesures de raffinement adéquates afin

de limiter le stress des animaux (enrichissement du milieu de vie, respect de la sociologie et de leur vie en groupe, surveillance quotidienne).

Ce modèle d'étude animal ne peut par ailleurs pas être remplacé par un modèle in vitro car la compréhension de la physiopathologie des cellules endothéliales nécessite d'utiliser un organisme dans son entier. En effet, l'approche sur cellules ne renseignerait pas sur l'ensemble des mécanismes impliqués comme le flux sanguin ou les hormones sexuelles. De plus, il est impossible de mimer le vieillissement de cellules en culture étant donné la difficulté de maintenir ces cultures à très long terme. Le processus de formation de plaque d'athérome ne peut également pas être modélisé en boîte de pétri. Il n'y a donc pas d'alternative de remplacement.

Le nombre d'animaux a été réduit au maximum en respectant les contraintes de publication, sans compromettre les objectifs du projet et pour permettre de bonnes analyses statistiques et les expérimentations ont été optimisées pour être regroupées chez le même animal dès que possible. Les études statistiques antérieures ont montré que des groupes de 20 animaux sont en moyenne requis pour obtenir une distribution normale des mesures. Nous estimons utiliser au total 6560 animaux (328 groupes d'animaux comportant 20 animaux par groupes). En conclusion, ce projet, qui s'inscrit dans la plateforme de recherche INSPIRE, permettra à terme de proposer de nouvelles thérapies médicamenteuses afin de limiter l'apparition de complications cardiovasculaires lors du vieillissement des individus.

19055 Intitulé & durée du projet : Evaluation de la pluripotence des cellules souches de mammifères à l'aide d'embryons de souris (5 ans)

Mots- clés et finalité du projet : souris, embryons, cellules souches, recherche fondamentale

Objectifs :

Les cellules souches pluripotentes sont capables de former tous les types cellulaires spécialisés qui constituent l'organisme adulte. Cette propriété est appelée « pluripotence ». Ainsi lorsque les cellules souches pluripotentes de souris sont injectées dans un embryon, elles participent au développement de tous les organes. Cette technologie est utilisée chez la souris depuis 30 ans pour produire des modèles de maladies génétiques et étudier la fonction des gènes.

L'objectif à long terme de notre projet est de transférer cette technologie chez le lapin et le singe, dans le but ultime de fabriquer des modèles de maladies génétiques plus pertinents que les modèles souris actuellement disponibles. C'est dans ce but que nous fabriquons de nouvelles sortes de cellules souches dans ces espèces.

L'objectif à court terme est de vérifier que ces nouvelles cellules sont bien pluripotentes. Pour cela, nous devons tester leur capacité à participer aux premières étapes du développement embryonnaire en les injectant dans des embryons de souris. Nous utiliserons 1445 souris adultes maximum, âgés de 8 semaines minimum.

Nuisances prévues : Deux procédures expérimentales seront appliquées. La première permettant la production des embryons nécessite des injections d'hormones. La seconde permettant leur développement nécessite le transfert des embryons dans des souris porteuses. Ces procédures sont de sévérité "légère", les animaux pouvant présenter une légère augmentation de stress due aux actes techniques et aux manipulations. Ces procédures expérimentales seront répétées 2 fois par mois maximum.

Application de la règle des 3R :

(1) Remplacement : Les souris constituent un modèle de choix de par le fait qu'elles sont très prolifiques et peuvent produire des embryons en grand nombre. Dans l'état actuel de notre projet, elles ne peuvent pas être remplacées par un autre animal ou des expériences in vitro.

(2) Réduction : L'injection d'hormones permet d'augmenter le nombre d'embryons produits par souris ce qui permet de réduire le nombre de souris sacrifiées.

(3) Raffinement : Les souris ont à leur disposition différentes formes d'enrichissement afin de réduire l'ennui et le stress. La souffrance est contrôlée par une observation régulière de l'animal jusqu'à la

fin de l'étude. Les animaux présentant des signes de douleur sont pris en charge par le vétérinaire. En cas de douleur persistante malgré les traitements entrepris, l'animal est euthanasié.

19056 Le diabète dit sucré est une maladie liée à une défaillance des mécanismes biologiques de régulation de la glycémie. L'insulino-thérapie intensive est actuellement la meilleure thérapie permettant de maintenir la glycémie relativement stable. A ce jour, le développement d'hypoglycémies est la principale complication des traitements par insulino-thérapie intensive. La détection cérébrale d'une hypoglycémie stimule la prise alimentaire et déclenche des réponses neuro-endocrines regroupées sous le terme de contre-régulation à l'hypoglycémie. Ceci qui a pour conséquence de ré-augmenter progressivement la glycémie autour de sa valeur basale physiologique, permettant ainsi de maintenir un approvisionnement en glucose suffisant aux organes et en particulier au cerveau. Le système nerveux central joue un rôle clef dans la régulation de la prise alimentaire et de la contre-régulation. Il existe des neurones spécialisés sensibles au glucose impliqués dans la détection de la diminution de la glycémie et l'initiation des processus de contre-régulation et prise alimentaire. Cependant, les mécanismes de contre-régulation et de stimulation de la prise alimentaire sont altérés à la suite d'épisodes récurrents d'hypoglycémie. Au niveau du système nerveux central, les connexions entre les neurones sont plastiques. Le nombre de connexions synaptiques sur un neurone donné n'est pas figé et évolue en réponse aux stimuli. On parle de plasticité neuronale ou remodelage synaptique. Ainsi, le but du projet de recherche sera de déterminer : si des neurones sensibles au glucose subissent un remodelage synaptique après hypoglycémies récurrentes.

Ce projet appliquera la règle des 3Rs : le remplacement des animaux par des modèles cellulaires ou des simulations est difficile pour l'étude de la prise alimentaire et du métabolisme énergétique. Le nombre d'animaux sera réduit grâce à l'utilisation de tests statistiques. Toutes les mesures seront prises afin de raffiner les expérimentations : notamment l'utilisation d'anesthésiques, d'antalgiques et l'enrichissement des cages, l'habituation. Enfin les points limites ont été définis pour l'ensemble des expérimentations et transmis à tout le personnel impliqué dans ce projet. Un total de 60 souris NPY-GFP sera utilisé pour ce projet.

19057 Le spectre clinique des troubles de mémoire varie considérablement entre la déficience intellectuelle et les troubles du spectre autistique, et on estime qu'il touche 1 à 3 % de la population. Les preuves génétiques indiquent qu'un groupe majeur de protéines liées aux troubles de mémoire correspond aux protéines qui sont au niveau des parties de connexions entre les neurones.

Notre projet est basé sur la caractérisation des interactions entre les neurones et les cellules support (les astrocytes). Notre étude portera sur un gène dont les mutations sont associées à la déficience intellectuelle, aux troubles autistiques et à la schizophrénie. Notre gène d'intérêt code pour une protéine qui est exprimée non seulement dans les neurones, mais aussi dans les cellules support (astrocytes) au cours du développement et chez l'adulte. Notre objectif vise donc à déchiffrer la fonction de ce gène au niveau des cellules supports et des molécules impliquées, et à mettre en évidence les mécanismes moléculaires de la contribution des astrocytes aux troubles de mémoire. Pour ce faire, Nous utiliserons le modèle murin n'exprimant plus la protéine au niveau des astrocytes pour évaluer les effets des mutations par des tests comportementaux.

Grâce à l'étude complète, de la cellule à l'animal, nous espérons également découvrir de nouvelles approches pharmacologiques ciblant les cellules support des neurones afin d'améliorer les capacités d'apprentissage des patients atteints de déficiences intellectuelles.

Nous tendrons vers les objectifs préconisés de réduction du nombre d'animaux utilisés, de remplacement du modèle animal et du raffinement de la méthodologie utilisée de la manière suivante:

(1) REDUCTION: Le nombre d'animaux utilisé sera minimisé autant que possible grâce à l'étude de plusieurs paramètres chez le même animal. Ainsi 6 groupes de 12 souris seront utilisées soit 6 x 12 souris=72 souris.

(2) RAFFINEMENT: Nous réduirons au maximum les techniques douloureuses ou stressantes. Les animaux seront hébergés dans les meilleures conditions possibles dans un environnement contrôlé permettant une réduction du stress. Chaque animal sera suivi tout au long de l'expérience afin de détecter tout indicateur de souffrance et déterminer si besoin l'arrêt de l'expérimentation et son euthanasie. Les animaux seront pesés et observés toutes les semaines avec une grille de suivi du bien-être, en plus du suivi quotidien habituel.

(3) REMPLACEMENT: des études sur les cellules nerveuses sont en cours, mais l'approche animale se justifie par l'étude comportemental sur l'organisme entier pour compléter l'exploration de la cellule à l'animal, nous espérons également découvrir de nouvelles approches médicamenteuses ciblant les cellules afin d'améliorer les capacités d'apprentissage des patients.

19058 Le contrôle cérébral de la prise alimentaire est gouverné par 2 systèmes : le système homéostatique et le système de la récompense qui interagissent. De récentes études réalisées au laboratoire ont montré qu'une alimentation périnatale déséquilibrée altérait les préférences alimentaires pour le gras et le sucré. Ce phénotype était associé à des réorganisations importantes des circuits cérébraux contrôlant la prise alimentaire, notamment au niveau du Noyau Accumbens/striatum. Nous avons pu constater que chez ces animaux, le gène du récepteur à la cholécystokinine (CCK2R) était fortement surexprimé dans ce noyau. Est-ce que la CCK, par l'intermédiaire de ce récepteur spécifique, joue un rôle dans l'apparition du phénotype, dans la réorganisation des circuits cérébraux sous-tendant la prise de décision et la récompense, et quel est son rôle dans les phénomènes de plasticité cérébrale ? La CCK, en plus de son rôle bien connu d'hormone de la satiété sécrétée par l'intestin, aurait également, étant donné sa très forte présence au niveau central, un rôle majeur, largement inexploré, sur la plasticité synaptique et la mémoire comme le suggère un nombre croissant d'études. Des travaux préliminaires réalisés au laboratoire nous montrent qu'en situation ex-vivo, la CCK semble indispensable pour la réalisation de la plasticité. Sur la base de ces observations, nous souhaitons étudier ce phénomène en situation in-vivo, pour tenter de comprendre le rôle central de la signalisation CCKergique dans le fonctionnement et la plasticité synaptique à long terme (stockage d'informations) des systèmes corticaux-striataux. Ainsi, nous allons étudier l'impact d'une injection intra-péritonéale d'antagoniste CCKR2, mais aussi de CCK, sur les capacités motrices, la motivation et l'appréciation d'un individu. Par la suite, nous étudierons ces paramètres suite à une injection intracérébrale d'antagoniste CCKR2 et de CCK. En parallèle, des études électrophysiologiques nous permettront d'évaluer l'effet de la CCK et de l'antagoniste CCKR2 à l'échelle cellulaire sur le réseau cortico-striatal. Au final un maximum de 343 animaux seront utilisés dans ce projet (cf Annexe 2).

Application de la règle des 3R :

Réduire : Nous estimons à 12 le nombre d'individus par groupe dans les études de comportement, n=12 étant le minimum nécessaire afin d'obtenir des résultats statistiquement interprétables. Un même animal pourra réaliser tous les tests de motricité ou tous les tests d'appréciation/motivation. Pour cette étude nous prévoyons d'utiliser :

- Pour les tests comportementaux : 160 rats (dont 16 seront les mères qui ne subiront aucune procédure expérimentale mais seront présentent avec leur petits pour les nourrir).

- Pour la mise au point (étude pilote) et l'optimisation des coordonnées d'injection : 18 rats (dont 2 seront les mères qui ne subiront aucune procédure expérimentale mais seront présentent avec leur petits pour les nourrir).

- Pour les études en électrophysiologie, 165 rats sont prévus (dont 15 seront les mères qui ne subiront aucune procédure expérimentale mais seront présentent avec leur petits pour les nourrir).

Raffiner : Les animaux d'une même portée seront hébergés ensemble avec leur mère, jusqu'à avec comme enrichissement du milieu de la cellulose leur permettant de déchiqueter, de jouer et un tunnel. La majorité des protocoles ne devrait pas entraîner de souffrance pour les animaux, cependant ils feront l'objet d'une visite quotidienne, y compris le week-end. Les chirurgies stéréotaxiques, qui elles pourraient engendrer un inconfort les jours suivant, seront réalisées par un personnel formé dans le domaine de la neurochirurgie. Elles feront l'objet d'une attention

particulière, et l'usage d'analgésiques avant et après la chirurgie permettra de contrôler la douleur. L'espace de chirurgie respectera au maximum les recommandations d'asepsie nécessaire pour assurer des résultats reproductibles. Une grille comportementale pour chaque animal sera complétée avec des points limites à partir desquels les animaux seront pris en charges pour supprimer leur souffrance ou seront mis à mort si cette souffrance est trop importante.

Remplacer : Notre étude vise à comprendre l'influence de la CCK dans le comportement moteur, alimentaire et motivationnel ; phénomènes sous-tendus par des mécanismes de plasticité de la voie cortico-striatale. Hélas, il n'existe pas encore de méthode alternative permettant de rendre compte de la complexité des mécanismes physiologiques mis en place, comme des modélisations mathématiques ou des modèles in vitro.

19059 La protéine "Optic Atrophy 1" (OPA1) est une protéine ancrée dans la membrane interne de la mitochondrie. Elle permet la fusion lors de la dynamique mitochondriale et a également beaucoup d'autres fonctions, notamment dans le métabolisme énergétique, dans la prévention de l'apoptose et dans l'homéostasie calcique. Plus récemment, des études ont permis de prouver que OPA1 avait un rôle protecteur dans les maladies cardiovasculaires tels que l'hypertension ou le vieillissement vasculaire.

Notre hypothèse est que OPA1 pourrait aussi avoir un rôle dans la réponse de l'endothélium aux stress induit par des variations de flux. L'études des variations de flux peut se faire à différents niveaux :

- Lors de la phase précoce de l'athérosclérose, les lipides de basses densité (LDL) présent dans le sang s'accumulent dans l'intima des artères entraînant la formation de plaque d'athérome. La localisation de ces plaques est particulière intéressante. En effet, elles vont se former en réponse à un stress induit par des perturbations de flux sanguin en chronique notamment au niveau de la cross aortique, des bifurcations artérielles....

- Au niveau des artères de résistance en réponse aux flux en aigue. En effet ces artères ont la capacité de se dilater pour répondre à une modification de flux en chronique ou en aigue.

En diminuant l'expression de cette protéine dans toutes les cellules ou seulement dans l'endothélium, nous pourrons étudier si OPA1 a bien un rôle protecteur en réponse aux flux.

Au total 450 souris males et /ou femelles seront nécessaires pour ce projet prévu sur une durée de 5 ans. Nous avons calculé ce nombre au plus juste, en appliquant la règle des 3R :

- Nous ne pouvons pas remplacer ce modèle par un modèle in vitro, car les modèles physiopathologiques par définition étudient les conséquences pathologiques de la mutation sur l'ensemble de l'organisme. Les lignées cellulaires ne peuvent reproduire les mécanismes complexes d'adaptation physiologique à cette mutation de l'ADNmt.

- Nous réduisons au minimum le nombre d'animaux pour obtenir des résultats exploitables au niveau statistique. Si une très franche tendance se dégagait avec 20 souris mais que le seuil de significativité n'était pas atteint, nous souhaiterions augmenter le nombre d'animaux à un maximum de 25 souris par groupe. Nous utiliserons le test de student et des tests d'Anova deux voies avec post-test de Bonferroni.

- Nous raffinons nos conditions d'expérimentation et d'hébergement pour le bien-être de nos animaux avec le soutien de la structure de bien-être animal (SBEA). Les animaux sont observés quotidiennement afin de contrôler les éventuelles modifications de comportement, d'alimentation, la prostration, le toilettage ou tout autre signe de mal être. Certains animaux du projet seront injectés avec du tamoxifène 150 mg/kg/j pendant 5 jours. La molécule est diluée dans une huile de maïs neutre qui n'est pas irritante. Les injections en Intra Péritonéale sont faites par le même expérimentateur. De plus, une alternance du côté d'injection sera respectée et un massage de la zone d'injection sera réalisé après chaque injection. La solution est placée sur un tapis chauffant avant et pendant l'injection. Nous procéderons à un examen clinique de l'animal avant l'induction de l'anesthésie : si l'apparence générale de l'animal est anormale ou si des signes cliniques au niveau de la respiration, de la prise de poids ou une anomalie dans la coloration des muqueuses sont présents, les animaux seront exclus du protocole et sacrifié. Pour toutes les procédures

chirurgicales les instruments sont préalablement stérilisés. Les animaux sont : Anesthésiés sous isoflurane induction 5% puis maintien à 2% maintenus à 37°C avant, pendant et après la procédure opératoire grâce à un tapis chauffant puis en couveuse pédiatrique. Injectés 20 min avant et après la procédure opératoire par de la buprénorphine en sous cutanée avec une injection sous-cutanée de 0,05 mg/kg de buprénorphine. Cependant pendant les premières 48h, en cas de souffrance de l'animal (prostration, agressivité, anorexie,...) contrôlée par la grille d'évaluation de la douleur (annexe2) , une nouvelle injection d'antalgique est réalisée.

Les animaux sont hébergés dans des cages aux normes (au minimum par 2 et au maximum par 5) suivant l'âge et le poids des animaux et les cages sont enrichies par des jouets (copeaux, cabanes, sopalin). Nous raffinons nos expérimentations en utilisant les animaux de chaque groupe pour recueillir plusieurs types de données. Sur chaque animal, l'ensemble des organes et tissus pouvant être recueillis sont prélevés afin d'anticiper les expérimentations futures.

19060 Notre projet concerne l'étude d'un parasite gastro-intestinal nommé *Cryptosporidium* sp. qui infecte un grand nombre de vertébrés y compris l'homme. Il est à l'origine de plusieurs épidémies d'origine alimentaire et hydrique aussi bien dans les pays développés que dans les pays en développement. De plus, il a été rapporté que ce parasite est la seconde cause de mortalité par diarrhée chez les enfants en Afrique sub-saharienne et en Asie. Nous avons également pu montrer expérimentalement sur un modèle de souris SCID qu'une espèce en particulier, *Cryptosporidium parvum* (Cp), était capable d'induire le développement de néoplasie digestives invasives. Cette observation est consolidée par diverses études cliniques qui ont montré une association significative entre la pathologie cancéreuse colique et l'infection à *Cryptosporidium*. Malgré tous ces arguments, les recherches sur ce parasite ne nous ont pas permis de disposer d'un traitement efficace pour lutter contre cette infection. Le seul médicament autorisé par la FDA (US Food and Drug Administration) est la Nitazoxanide qui a une efficacité limitée surtout chez les patients immunodéprimés. C'est pourquoi, il est nécessaire d'explorer d'autres molécules à potentiel thérapeutique.

Nous allons tester in vivo des composés à potentiel thérapeutique pour lesquels des tests sur le parasite in vitro auront fourni des résultats prometteurs en termes d'index thérapeutique (rapport activité anti *Cryptosporidium*/toxicité). Pour ce faire, nous allons utiliser en deuxième approche le modèle animale d'étude de la cryptosporidiose ayant précédemment obtenu l'aval du comité d'éthique. . Nous avons veillé, dans le protocole que nous vous soumettons, à respecter la règle des 3R en utilisant le minimum de souris et à prendre en compte le bien-être des animaux. En effet, nous avons réduit le nombre de souris par groupe à 5 souris. De plus, nous allons, en tant que faire se peut, tester plusieurs composés en même temps pour réduire le nombre de groupes témoins. Enfin, des tests in vitro réalisés en amont, permettront de sélectionner les composés les plus efficaces et ainsi de réduire le nombre de groupes tests. Dans ce projet, le nombre total maximum de souris utilisées sur la période est de 1200 souris.

19061 Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) se caractérisent par une inflammation du tractus gastro-intestinal. Il existe deux pathologies : la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique. Ces pathologies touchent entre cinq et six personnes sur 100 000. Elles débutent généralement chez le jeune adulte et touchent indifféremment les deux sexes. Elles évoluent par phases de poussées caractérisées par différents symptômes : des diarrhées chroniques, hémorragiques ou non, d'importantes douleurs abdominales et des pertes de poids dues à une mauvaise absorption des nutriments. Ces poussées sont entrecoupées de phases de remissions. Ces pathologies chroniques engendrent un inconfort de vie. Les traitements disponibles aujourd'hui sont des traitements symptomatiques ou reposent sur des actes chirurgicaux. L'étiologie des MICI est encore mal connue.

Les modèles animaux sont devenus essentiels pour déterminer les mécanismes physiopathologiques et les processus immunologiques à l'origine de l'inflammation chronique des muqueuses. A ce jour il existe de nombreux modèles décrits dans la littérature, tous induisent chez l'animal (avec un degré de sévérité plus ou moins important), une perte de poids, un ramollissement

des fèces et diarrhées ainsi qu'une présence de sang dans les fèces. Cependant, le modèle à l'acide trinitrobenzène sulfonique (TNBS) se rapproche plus de la maladie de Crohn que les autres modèles animaux existants

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'efficacité de nouvelles molécules thérapeutiques pour les MICI chez le cobaye. Le modèle utilisé sera le modèle induit par l'administration intracolique de TNBS, chez le cobaye. Dès l'induction de la pathologie, les animaux seront suivis régulièrement au cours du temps (jusqu'à 7 jours) par des techniques non-invasives: suivi du poids, consistance des fèces et présence de sang dans les fèces évaluée par le test de sang dans les fèces. L'utilisation de ces techniques non-invasives permet d'observer au cours du temps un seul animal, là où l'information devait être obtenue par euthanasie et autopsie de multiples individus à chaque stade d'une seule étude, permettant ainsi de réduire sensiblement le nombre d'animaux. Dès leur arrivée dans la zone d'exploration fonctionnelle, les animaux seront hébergés dans des conditions définies par la directive européenne 2010/63/UE et un enrichissement adapté sera introduit dans l'hébergement des animaux afin de les stimuler (tel que des tunnels en polycarbonate). Lors de l'anesthésie des animaux, ces derniers seront placés sur des tapis chauffants afin de maintenir leur température corporelle en condition physiologique. Nous avons établi des points d'intervention afin de limiter la douleur à son minimum :

- Addition de tunnels en cas de bagarres entre animaux et séparation du dominant pendant quelques jours si nécessaire,
- Mesure du poids des animaux

Les animaux seront surveillés pendant toute la durée de l'expérimentation tous les jours afin de détecter l'apparition d'éventuels comportements atypiques tels que :

- altérations des fonctions normales (impossibilité d'uriner, de s'alimenter...),
- vocalisation, tremblements ... ,
- une perte de poids élevée (mais <20% du poids initial),
- posture anormale (voûtée ou déséquilibrée pour soulager une zone douloureuse, démarche anormale, diminution des mouvements, prostration)
- détection/présence d'une anomalie (plaie, pilo-érection, poils ternes ...).

Si l'état général de l'animal ne s'améliore pas et qu'aucune solution ne peut être apportée, ce dernier sera mis à mort.

Afin de répondre à cet objectif le nombre d'animaux utilisés sera de 1080 cobayes à raison de 3 études par an, 12 animaux par groupe et 6 groupes par étude. Les tests statistiques réalisés sur les données recueillies pendant l'expérimentation et lors du sacrifice seront fonction de la normalité et de la distribution des données (tests paramétriques ou non paramétriques...).

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

19062 Respirer l'oxygène de l'air est essentiel à la vie et le manque d'oxygène a des effets dramatiques sur les humains qui sont beaucoup plus rapides que le manque d'eau ou de nourriture. Le manque d'oxygène (ou l'hypoxie) entraîne une dégradation rapide du cerveau et d'autres organes tels que le cœur et les poumons, il est de même quand ce manque d'oxygène est dû à une infection pulmonaire par le SRAS-CoV2 ce qui est l'un des effets les plus mortels du virus lorsqu'une personne est atteinte de la Covid-19.

D'autres effets plus lents et aussi mortels de l'hypoxie comme ceux qui s'opèrent sur les cellules cancéreuses. En effet, le manque d'oxygène fait évoluer les cellules vers des formes qui peuvent migrer vers d'autres parties du corps et donc se développer causant le décès par cancer. Lorsque les niveaux d'oxygène chutent soudainement dans le corps, des interventions rapides sont

essentielles pour atténuer les dommages, et beaucoup de ces interventions ont été développées grâce aux connaissances que nous avons acquises par l'étude des effets dans des cellules et des animaux. Cependant, il existe encore d'importantes lacunes dans nos connaissances que nous devons combler pour améliorer nos interventions. Le but de notre projet est d'étudier l'une des protéines qui est un acteur important dans le processus qui régit la réponse des cellules de l'organisme au manque d'oxygène grâce notamment à des approches cellulaires dans notre laboratoire. Afin d'étudier les effets globaux de cette protéine sur le muscle cardiaque, les vaisseaux sanguins, les poumons et les cellules sanguines dans des conditions d'Hypoxie, nous avons besoin du modèle animal tel que la souris avec la mutation du gène codant pour la protéine d'intérêt, et nous prévoyons de mettre ces souris dans des conditions d'hypoxie relativement douces, qui n'affectent pas leurs bien-être.

Le nombre total de souris qui sera utilisé dans ce projet est de 40 souris.

RAFFINEMENT: La baisse de la concentration d'oxygène sera effectuée progressivement (3 heures) pour ne pas provoquer de gêne chez l'animal. L'exploration cardiaque et oculaire sont indolores, l'anesthésie n'est nécessaire chez la souris que pour empêcher les mouvements de l'animal.

REMPLACEMENT: Le rôle de la protéine d'intérêt dans le processus d'hypoxie a été étudié par des approches cellulaires dans notre laboratoire, mais pour analyser les effets globaux de cette protéine sur le muscle cardiaque, les vaisseaux sanguins, les poumons, le modèle souris nous semble nécessaire pour nous rapprocher au mieux de la pathologie humaine.

REDUCTION : au total, 40 souris seront nécessaires pour notre projet. Le nombre de souris utilisées dans cette étude a été calculé en tenant compte notamment de la variabilité inter-individus. Pour réduire le nombre d'animaux à utiliser, les mêmes animaux seront explorés sur le plan cardiaque et ophtalmologique.

19063 Un sous-type de globules blancs, appelés lymphocytes T régulateurs (Treg), joue un rôle central dans le maintien de l'intégrité de l'organisme par sa capacité unique à contrôler les réponses immunitaires. D'un point de vue thérapeutique, ces cellules préviennent et traitent de pathologies inflammatoires telles que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (maladie de Crohn et rectocolite hémorragique) mais aussi de pathologies autoimmunes telles que la sclérose en plaques ou le diabète de type I. En effet, plusieurs essais cliniques ont récemment révélé la sûreté et l'efficacité d'une thérapie cellulaire basée sur l'utilisation de Treg. Néanmoins, cette thérapie reste limitée par la grande quantité de Treg nécessaire à administrer.

Les Treg sont produits dans le thymus, organe essentiel à la génération d'un système immunitaire compétent. Par ailleurs, le vieillissement induit une dégénérescence du thymus aboutissant à une production et une capacité fonctionnelle altérées de ces cellules. Les objectifs de ce projet visent à étudier (1) le développement thymique, (2) la capacité suppressive et (3) la régénération des Treg au cours du vieillissement.

Pour répondre à ces questions, nous utiliserons des souris sauvages et transgéniques provenant d'établissements éleveurs, fournisseurs localisés et collaborateurs. La compréhension du développement, de la capacité suppressive et la régénération des Treg nécessitent de travailler sur un organisme entier. A défaut de remplacer le modèle animal, nous réduisons son utilisation au minimum en suivant la règle des 3R :

-Réduction: les souris étant sur fond génétique pur C57BL6/J, le nombre d'animaux sera réduit puisque la variabilité interindividuelle est moindre. Les mêmes souris seront analysées à la fois pour étudier le développement des Treg dans le thymus et leur fonction suppressive dans les organes périphériques, permettant de réduire le nombre de souris. Nous utiliserons des tests statistiques afin de nous assurer que le nombre minimum d'animaux est utilisé de manière à obtenir des résultats significatifs. Trois à cinq souris par groupe suffiront généralement par type d'expérience. Au total, un nombre de 654 souris est prévu pour faire aboutir ce projet.

-Raffinement: les souris sont élevées dans des animaleries exemptes d'organisme pathogène spécifique. Leurs conditions d'hébergement sont contrôlées (température, hygrométrie et

photopériode). Elles bénéficient d'au moins 100cm² de surface, de dômes protecteurs et de matériel pour la confection de nids. Les expériences utilisées engendreront une souffrance qui restera faible voire modérée grâce à la détection d'un point limite précoce.

-Remplacement: ce projet ne pourra être effectué qu'in vivo avec un modèle murin car les Treg se différencient in vitro. Le développement et la régénération des Treg a lieu dans le thymus, organe complexe composé de nombreuses cellules stromales arrangées en 3D. L'étude de leur capacité suppressive nécessite aussi un modèle vivant intégré, rendant impossible toute tentative de remplacer notre modèle d'étude. La souris présente l'avantage d'avoir une physiopathologie proche de l'homme qui permet d'améliorer nos connaissances sur les Treg, avec des applications cliniques potentielles.

Ce projet permettra de caractériser le développement, la régénération et la fonction des Treg, ce qui contribuera à terme à faciliter leur utilisation en clinique.

19064 Les neuroblastomes représentent la seconde cause de décès par cancer chez l'enfant et l'adolescent.

La prise en charge thérapeutique actuelle de ces patients est multimodale.

Elle commence par une chimiothérapie pré-opérative, suivie de l'intervention chirurgicale, puis d'une chimiothérapie et/ou d'une radiothérapie, d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques et d'une immunothérapie.

Ce traitement n'est efficace que pour un patient sur deux. Les patients survivants présentent des problèmes de toxicité liés aux traitements.

Afin d'améliorer la prise en charge thérapeutique et la qualité de vie de ces patients, il est urgent de concevoir de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Les objectifs du projet sont d'évaluer l'efficacité et la sécurité des combinaisons d'anticorps thérapeutiques dans des modèles de souris greffées avec des cellules de cancers pédiatriques.

Nous testerons également une drogue épigénétique qui permet d'augmenter l'expression de l'antigène cible au sein des cellules tumorales.

Cette propriété ouvre la possibilité à des traitement combinés à base d'anticorps et de drogues épigénétiques permettant une réponse thérapeutique et des rémissions plus importante chez les patients.

Un premier modèle de souris immunocompétentes sur lequel notre équipe a déjà testé des traitements et dont nous connaissons bien le développement, recevra des greffes intraveineuses d'une lignée de neuroblastome murin ce qui conduit à obtenir des métastases hépatiques.

Sur ce modèle, nous ferons d'abord des expériences de dose réponse pour déterminer la concentration d'Anticorps à utiliser pour traiter.

Nous effectuerons ensuite les traitements avec tous les contrôles nécessaires.

Un second modèle de souris immunodéprimées, greffées par voie sous cutanée avec des cellules de neuroblastome humain et des cellules de 4 cultures primaires, permettra d'évaluer l'efficacité de ce nouveau traitement sur la croissance tumorale.

Ces souris sont dépourvues de cellules du système immunitaire adaptatif (lymphocytes) mais disposent de macrophages opérationnels. Cette propriété nous permettra d'étudier leur implication dans le mode d'action des anticorps.

2640 souris seront nécessaires pour répondre à ces objectifs.

Ce nombre prend en compte la règle des 3R.

Il est clairement établi que les cellules tumorales se comportent différemment in vitro et in vivo en terme de croissance et de résistance au traitement, notamment aux immunothérapies qui implique le système immunitaire de l'hôte.

Le modèle animal reste donc indispensable et non substituable pour de telles études et un passage obligé avant de commencer les études chez les patients.

Règle des 3R

Réduire : le nombre d'animaux utilisés tiendra compte des contraintes statistiques et nous conserverons tous les prélèvements d'organes et tissus pour des analyses ultérieures.

Raffiner : nous assurerons une surveillance quotidienne des animaux par l'expérimentateur dès la période critique et nous fixerons des points limites stricts qui conduiront à la mise à mort dès leur apparition.

Nous assurerons aux souris un hébergement de qualité avec 5 souris par cage enrichie.

Ces études nécessitent impérativement un tissu tumoral en place dans un système physiologique pharmacodynamique et comprenant un réseau vasculaire capable de se remodeler à partir de toute cellule de l'organisme.

Il n'existe aucune procédure in vitro qui puisse remplacer ces expériences.

19065 La radiothérapie permet de traiter environ 200 000 patients chaque année en France, ce qui représente un patient sur deux atteint de cancer. L'utilisation de rayonnements ionisants (rayons X) pour traiter les tumeurs est très efficace, mais des effets indésirables peuvent survenir à court et à long terme. Comme les protocoles de traitement des cancers s'améliorent, la durée de vie des patients s'allonge, ce qui augmente le risque de voir apparaître des effets indésirables. Ces effets secondaires peuvent altérer durablement la qualité de vie et doivent être pris en compte dans les plans de traitement par radiothérapie. Ils sont causés par l'exposition inévitable des organes et tissus sains (non cancéreux) aux radiations ionisantes, l'irradiation étant délivrée quasiment systématiquement par une source externe. Cette irradiation peut altérer les tissus sains et occasionner, à long terme, des nécroses (destruction) et des fibroses (modification pathologique) d'une partie du tissu ou de l'organe, altérant sa fonction. Parmi les causes de ces dommages, un rôle prépondérant est attribué à l'altération du réseau vasculaire des organes irradiés ainsi qu'à l'infiltration de ces organes par les cellules immunitaires, le plus souvent de façon chronique. Nous souhaitons savoir s'il est possible de limiter ces effets indésirables en empêchant les cellules immunitaires de pénétrer dans les tissus irradiés. La paroi interne des vaisseaux sanguins, en contact direct avec le sang, constitue la porte d'entrée des cellules immunitaires dans les tissus lésés. Les cellules qui composent cette paroi interne, les cellules endothéliales, réagissent à l'irradiation et deviennent dysfonctionnelles. Elles sont alors capables d'attirer les cellules immunitaires pour les faire entrer dans le tissu lésé par l'irradiation.

L'objectif de ce projet est de mettre en évidence des mécanismes qui permettent l'entrée des cellules immunitaires (leucocytes) dans les tissus irradiés, ainsi que d'identifier des produits pharmacologiques susceptibles de bloquer l'entrée de ces leucocytes dans les tissus. Par de l'expérimentation in vitro, nos travaux ont déjà permis de mettre en évidence un mécanisme possible d'entrée des leucocytes. Les leucocytes adhèrent à la paroi interne des vaisseaux sanguins par l'intermédiaire de certaines molécules organiques (des sucres) présents au niveau des cellules de cette paroi en réponse à l'irradiation. Pour comprendre les mécanismes impliqués dans l'infiltration des tissus par les leucocytes, et ce que cela implique au niveau des lésions tissulaires, nous devons utiliser des modèles expérimentaux précliniques, comme la souris, afin de démontrer les phénomènes à l'échelle de l'organisme entier et de trouver des moyens pharmacologiques de réduire les effets indésirables. Un protocole a été déposé sur cette thématique en 2019 (P19-15). Il devait permettre d'identifier la meilleure porte d'entrée des leucocytes (sucre, CCR2 ou CX3CR1) grâce à une technique d'imagerie en temps réel (microscopie intravitale). L'avantage de cette technique repose sur sa rapidité et permet d'éviter que les animaux aient le temps de développer des lésions radio-induites douloureuses, l'étude étant réalisée 24 h après l'irradiation. Malgré plusieurs essais et mises au point technique dans un projet précédemment autorisé, nous n'avons pas pu atteindre notre but en raison de d'artefacts expérimentaux (adhésion des leucocytes à l'endothélium due à la manipulation de l'intestin et non à l'irradiation). Afin de limiter la perte de temps, nous avons alors décidé de modifier le protocole expérimental. Il s'agit de tester sur la souris l'effet du blocage de l'entrée des cellules du système immunitaire sur les dommages tissulaires 3 et 7 jours après irradiation abdominale en se basant sur les modèles animaux développés dans le

laboratoire. Les retombées possibles de ce projet sont l'identification de moyens thérapeutiques pour limiter les effets secondaires de la radiothérapie et ainsi améliorer à la fois le bénéfice thérapeutique de la radiothérapie et la qualité de vie des patients atteints de cancer.

Pour l'ensemble du projet, le nombre d'animaux (souris mâles âgées de 10 à 12 semaines) utilisé sera de 600 souris C57BL/6J pour les expériences de blocage de la porte d'entrée des leucocytes par les sucres de la paroi interne des vaisseaux. Il est demandé un nombre de 600 animaux au maximum pour ce projet pour pallier des imprévus. Le nombre de souris choisi pour ce protocole est nécessaire et suffisant pour exploiter d'un point de vue statistique les résultats obtenus. Dans le contexte du bien-être animal, le raffinement est assuré par le fait que ces animaux seront anesthésiés, injectés, prélevés et euthanasiés selon la réglementation en vigueur.

19066 Le projet concerne une action de formation d'une durée de deux jours en direction de personnes appelées à travailler sur le modèle poisson (étudiants, animaliers, techniciens, ingénieurs, enseignants, chercheurs). Elle s'adresse donc à des personnes souhaitant se former tout au long de leur vie (formation continue) ainsi qu'à des étudiants (formation initiale). L'objectif est de former les participants aux bonnes pratiques sur les poissons, dans le respect de la réglementation et de l'éthique, de façon à ce qu'ils mobilisent ces enseignements dans leurs activités professionnelles pouvant relever de domaines variés, comme la recherche, l'agronomie, l'écologie ou encore la toxicologie.

Il s'agit de maîtriser le modèle biologique en termes :

- d'exigences physiologiques et comportementales : maintien/manipulation des poissons (densité d'élevage, qualité de l'eau), bien-être des poissons (physiologie du stress et de la douleur).
- anatomiques (savoir réaliser les prélèvements des différents organes).

De façon plus détaillée, la formation comprend une partie théorique (réglementation, éthique, techniques de maintenance et d'élevage de poissons) et une partie pratique (manipulation des poissons, méthodes d'anesthésie, de mesures biométriques, de prélèvements, d'analyses d'hormones et de mise à mort).

Les objectifs sont de former les personnes à la réalisation de gestes pratiques et de projets scientifiques nécessitant l'utilisation de poissons (absence de méthodes alternatives, et donc remplacement des animaux non envisageable). Ils seront sensibilisés au respect de la réglementation en vigueur et aux règles éthiques, avec en particulier la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement) également appliquée dans le cadre de ce projet. Pour la partie pratique, afin de recourir au nombre de poissons juste nécessaire pour répondre aux objectifs pédagogiques de la formation (réduction), nous prévoyons de recourir au maximum à 296 poissons par an, soit au total 1480 poissons pour les cinq années du projet, avec un cycle annuel de formation (initiale et continue). Ce nombre de poissons correspond à l'effectif maximal de participants pouvant être formés et à l'effectif maximum de poissons (soit 37 personnes*2 espèces*4 poissons*5 années). Le nombre de poissons sera réparti en deux lots : un lot de poissons correspondant à une espèce carnivore (perche commune ou sandre, selon disponibilité) et un lot de poissons omnivores (gardon ou rotengle, selon disponibilité).

L'intérêt de recourir à ces deux catégories d'espèces est d'ordre pédagogique et réside dans les différences anatomiques de ces deux groupes (système digestif en particulier, en lien avec leur régime alimentaire).

Le projet comprend une seule procédure de classe modérée quant à son degré de sévérité. Cette procédure intéresse les techniques d'anesthésie des poissons (avec une comparaison de méthodes) et de prélèvement de sang. Ce sont des pratiques de base qu'il convient de maîtriser dans les différents domaines d'activités visés par la formation. Les différentes méthodes d'anesthésie seront décrites en fonction des contraintes expérimentales puis testées. Ne seront concernés par cette procédure que les poissons ne présentant aucun des points limites intéressant l'activité de nage, le comportement alimentaire ou encore l'apparition de tout signe de maladie. Les méthodes d'anesthésie testées sur les représentants d'une espèce de chaque lot sont :

- une anesthésie par le froid, engendrant un ralentissement du métabolisme du poisson. En effet, la température corporelle des poissons suit la température du milieu environnant.

- une anesthésie chimique. Nous aurons recours à deux substances anesthésiques (MS222 et huile de girofle avec l'eugénol comme principe actif) dans le cadre de cette procédure.

Nous mesurerons, en fonction des méthodes d'anesthésie et des espèces de poissons, les délais et durées de phase d'endormissement, jusqu'à la disparition des mouvements operculaires, correspondant au stade III de l'anesthésie, soit le stade d'endormissement le plus profond. C'est durant ce stade que nous formerons les participants au prélèvement de sang (prélèvement d'1 mL maximum, au niveau du pédoncule de la nageoire caudale). Les poissons seront ensuite placés dans une bassine dite de réveil ; lorsqu'ils auront retrouvé leur comportement pré-anesthésique (généralement en moins de 10 minutes), ils pourront alors être replacés dans leur bassin d'origine.

En termes de raffinement, toutes les manipulations et les gestes expérimentaux portés sur les animaux seront au préalable réalisés par un enseignant-chercheur compétent (niveau 1 du Diplôme Universitaire en expérimentation animale). Les participants seront ensuite guidés tout au long des différentes étapes à réaliser sur les poissons.

L'enseignant veillera au respect des consignes transmises (manipulation des animaux, contrôle des gestes, vérification des doses d'anesthésiant, du volume de sang prélevé).

Au terme de ce projet, les poissons ne seront pas gardés en vie. Nous formerons les participants aux différentes méthodes conformes à la réglementation en vigueur de mise à mort des poissons. Nous présenterons les différentes raisons qui peuvent nous amener à choisir une méthode en particulier. La formation se poursuivra par l'étude anatomique des poissons (dissection et prélèvements des différents organes) et des analyses d'indicateurs de stress à partir des échantillons de sang. Il s'agit de variables très classiquement étudiées en expérimentation sur le poisson et qu'il convient de parfaitement maîtriser.

19067 La transplantation représente un moyen thérapeutique efficace pour contrer le dysfonctionnement de certains organes. Cependant, en absence de traitement du receveur, le greffon est rejeté par le système immunitaire de l'hôte. Aujourd'hui, le rejet de greffe est contrôlé par l'utilisation d'immunosuppresseurs pharmacologiques. Cependant ces drogues ont des effets secondaires importants et ne sont pas toujours suffisantes. C'est pourquoi la recherche en transplantation vise à trouver des traitements alternatifs à ces immunosuppresseurs. Parmi les thérapies possible l'utilisation d'anticorps immunomodulateurs permet d'empêcher le système immunitaire du receveur de rejeter le greffon tout en limitant les effets secondaires. Dans ce contexte nous souhaitons tester deux molécules (que nous ne pouvons pas explicitement nommées pour des raisons de confidentialité). Nous comparerons ces anticorps avec des traitements immunosuppresseurs déjà utilisé en clinique pour déterminer leur intérêt thérapeutique.

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

- Remplacer : Des études in vitro ont montré in vitro le potentiel de l'anticorps pour réguler les réponses immunitaires. Cependant pour pouvoir tester l'intérêt de cet anticorps dans le rejet de greffe nous ne pouvons pas utiliser des modèles in vitro qui ne permettent pas de tester les interactions entre les différents types cellulaires présents in vivo.

- Réduire : Le nombre d'animaux par procédure est réduit à 480, nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Les souris seront divisées en 4 groupes. Le nombre de groupe a été réfléchi de manière à avoir les contrôles suffisants pour pouvoir conclure quant aux résultats obtenus.

-Raffiner : Les souris seront surveillées tous les jours. Les animaux montrant des signes physiques caractéristiques d'un mal être (cf fichier annexe) seront euthanasiés. Les conditions d'hébergement et d'enrichissement sont standards à l'espèce, les souris seront par groupe social de 5 maximum par cage, avec des moyens d'enrichissement.

Les procédures expérimentales susceptibles d'être douloureuses ou d'entraîner toute sorte de souffrance (greffe de peau) seront réalisées sous anesthésie. Une surveillance quotidienne du

greffon ainsi qu'un suivi clinique et comportemental des animaux (poils hérissés, dos voûté, agressivité...) sera réalisé.

Tous les animaux traités et ceux des groupes contrôles seront analysés à la fin du protocole afin d'en obtenir un maximum d'information post mortem (analyse cellulaire par cytométrie, immunohistologie, analyse d'expression ARN). Les résultats obtenus permettront de déterminer le potentiel thérapeutique de nos anticorps pour limiter/empêcher le rejet de greffe.

19068 Notre pays regorge de plantes médicinales qui sont régulièrement utilisées par les tisaneurs qui possèdent un savoir ancestral hérité des médecines ayurvédiques, chinoises et africaines, toutes vieilles de plusieurs milliers d'années. Toutefois, seulement vingt-deux d'entre elles ont été caractérisées et inscrites à la pharmacopée française. Il reste donc de nombreuses plantes pour lesquelles la caractérisation scientifique de leurs effets sur l'Homme et sur les pathologies qu'elles sont supposées soigner n'a jamais été réalisée. L'objectif de cette étude est d'évaluer les effets psychotropes (anxiolytique, antidépresseur et analgésique) de 3 extraits aqueux de plantes endémiques selon des protocoles reconnus et utilisés par tous.

Cette étude sera réalisée sur des souris mâles Swiss auxquelles on administrera par voie orale les extraits à tester à trois concentrations différentes. A raison de 5 souris par groupe, de 3 groupes par plantes et de l'ajout de deux groupes contrôles (un groupe négatif qui recevra une administration de solution saline et un groupe positif qui recevra un médicament de référence), cela correspondra à 55 souris.

Respect de la règle des 3R :

- Réduction : le nombre d'animaux utilisés sera réduit au strict minimum nécessaire pour avoir des résultats statistiquement significatifs. Les mêmes animaux seront utilisés pour les différents tests.
- Raffinement : les protocoles ont été étudiés pour que les animaux ne ressentent qu'une gêne ou un inconfort et en aucun cas un réel stress ou douleur. Pour cela, notamment les durées des tests sont courtes, 5 minutes maximum et les étapes pouvant induire une douleur sont limitées à 30 secondes de manière à être sûr de ne pas provoquer de lésions tissulaires.
- Remplacement : Il n'est pas possible de réaliser des études in vitro pour ce type d'étude.

Domages/avantages : L'étude sur ce nombre restreint d'animaux permettra d'enrichir les connaissances sur les effets des plantes endémiques et pourrait mener au développement de molécules d'intérêt pour la médecine.

19069 Les lésions nerveuses périphériques sont fréquentes et secondaires à différents traumatismes (plaies, brûlures, fractures, morsures). Leur gravité résulte dans les séquelles engendrées. La réparation chirurgicale des lésions nerveuses périphériques dépend de la perte de substance nerveuse. Lorsqu'elle est possible, la suture nerveuse directe (bout à bout) est le traitement de référence. Mais, lorsque le défaut nerveux est important et n'autorise pas une suture directe, deux techniques peuvent être utilisées : soit la greffe nerveuse où le nerf est prélevé sur un autre site donneur, soit la greffe d'un tube de réparation entre les deux extrémités du nerf lésé. Ce tube de régénération sert de guide pour la repousse nerveuse.

Parallèlement, la régénération cellulaire est en plein essor avec l'utilisation de cellules souches mésenchymateuses. Ces cellules ont la capacité de se différencier en cellules d'une autre lignée (exemple : en cellule de la peau, du cartilage, en cellule nerveuse, etc). Le tissu graisseux, abondant et accessible chez l'Homme, est riche en cellules souches mésenchymateuses. Les cellules souches mésenchymateuses issues de la graisse sous-cutanée sont déjà utilisées dans la réparation de la peau ou du cartilage.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'apport de cellules souches mésenchymateuses d'origine graisseuse associé à un tube de régénération à base de chitosan dans la réparation d'un défaut nerveux.

Le protocole expérimental se déroule en deux étapes :

- Dans un premier temps, nous réaliserons une étude *ex vivo* permettant d'évaluer les interactions entre le tube de chitosan et les cellules souches mésenchymateuses de la graisse abdominale sous cutanée. Les cellules seront prélevées sur 5 rats.

Cette étape nous permettra de vérifier la survie des cellules au contact du tube de régénération.

- Dans un second temps, nous réaliserons une étude *in vivo* chez 40 rats de type Wistar. Un défaut nerveux de 10 mm sera réalisé chirurgicalement sous anesthésie générale, puis réparé dans le même temps opératoire selon deux techniques différentes représentant nos deux groupes comparatifs : un premier groupe (x20) où le défaut nerveux sera reconstruit par un tube de régénération seul, et un deuxième groupe (X20) où le défaut nerveux sera reconstruit par un tube de régénération comblé de cellules souches mésenchymateuses d'origine grasseuse.

Le but final de cette étude est de montrer une régénération nerveuse plus rapide et de meilleure qualité dans le groupe bénéficiant de cellules souches mésenchymateuses d'origine grasseuse comparativement au groupe qui en est dépourvu.

Le recours à l'animal est indispensable devant l'impossibilité de réaliser ce type de protocole de recherche chez l'Homme. Les alternatives *in vitro* sont inexistantes. Le rat est le plus utilisé dans l'étude de la régénération nerveuse pour ses analogies avec l'Homme. Les expérimentations se feront sur des rats mâles « Wistar » (600g environ). Afin de respecter la règle des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer), le nombre d'animaux sera réduit à son minimum pour obtenir des résultats extrapolables à la population cible humaine. Après une période d'acclimatation en cage (2 animaux par cage) pendant 8 jours, les animaux seront opérés dans des règles d'asepsies strictes puis replacé dans la même cage afin de limiter tout comportement agressif les uns envers les autres. Des méthodes de raffinement seront mise en place pour limiter le stress engendré (coton, serpentins, jouets). Un traitement antalgique adapté sera assuré, pendant et après opération, selon l'échelle de douleurs spécifiques « Rat Grimace Squale » : association de l'anesthésie générale et antalgiques après une induction et complété en fin d'intervention par une anesthésie locale du site opératoire. Un traitement antalgique sera systématiquement mis en place en post-opératoire pendant 3 jours consécutifs puis seront donnés selon la douleur de l'animal. Les conditions d'hébergement respecteront les normes en vigueur et la nourriture sera laissée libre.

Les paramètres d'évaluation terminaux (cliniques, électrophysiologiques et histologiques) seront réalisés en un seul temps permettant de limiter les explorations invasives répétées. L'évaluation sera effectuée à 2 mois post opératoire. La procédure d'évaluation finale aboutissant à la mise à mort de l'animal par la nécessité des explorations histologiques (musculaire et tissu nerveux).

Le nombre total d'animaux nécessaire est de 47 : 3 rats pour l'étude *ex vivo*, 40 rats pour l'étude *in vivo* et 4 rats supplémentaires en cas d'échec (10% de la cohorte).

19070 Certaines malformations cardiaques congénitales ainsi que l'hypertension artérielle pulmonaire (maladie progressive grave qui touche les petits vaisseaux sanguins des poumons) se compliquent d'un mauvais fonctionnement (insuffisance) du ventricule droit qui souffre de façon chronique et prolongée d'un excès de charge en pression et/ou en volume. Cette insuffisance cardiaque droite conduit au décès prématuré d'adultes encore jeunes, le traitement de cette maladie étant peu satisfaisant avec une surmortalité de 7. 5% chez les 20-30 ans. Ainsi, la découverte de nouveaux traitements apparait primordiale afin de lutter contre le développement de cette maladie ou de freiner son évolution. Récemment, la thérapie cellulaire a ouvert de nouvelles perspectives thérapeutiques en cardiologie et des études expérimentales puis cliniques ont prouvé son efficacité pour améliorer la contraction du muscle cardiaque après un infarctus du myocarde. Cependant, aucune étude n'a été menée sur le ventricule droit défaillant. Avant de tester cette thérapie prometteuse chez les patients, il est crucial d'appréhender au préalable la faisabilité de cette approche, le devenir des cellules implantées, l'efficacité et l'innocuité de la thérapie cellulaire sur un modèle animal. Cette étape est nécessaire de part l'impossibilité de reproduire les conditions hémodynamiques complexes sur des modèles cellulaires ou informatiques (Remplacement). Concernant les maladies cardiovasculaires, le Porc constitue un modèle de choix en santé humaine du fait de l'existence de caractéristiques et de propriétés anatomiques et physiologiques

cardiovasculaires comparables à celles de l'Homme. Ces expériences font suite à celles menées de 2017 à 2019 sur des Porcs de modèles expérimentaux identiques dans le cadre d'un projet autorisé en 2017 dans un autre établissement utilisateur dont l'objectif était de tester l'administration par un patch contenant des progéniteurs cardiaques appliqué sur la totalité de la surface du ventricule droit. Les premiers résultats apportent la preuve de concept et de l'efficacité de cette thérapie cellulaire sur la fonction du ventricule droit. Cette étude est la suite du projet visant à tester l'efficacité à plus long terme des cellules souches utilisées ainsi que l'innocuité rythmique de cette thérapie cellulaire.

Le chercheur responsable est assisté dans sa démarche par des chirurgiens cardiaques congénitaux, des cardiopédiatres et des cardiologues rythmologues afin de favoriser les procédures non invasives (échographie cardiaque, ECG), et d'optimiser tous les gestes invasifs (chirurgie, étude rythmique et électrophysiologique) et réduire ainsi le nombre d'animaux utilisés. Pour la totalité du projet, nous utiliserons au maximum 24 animaux ce qui d'après l'évaluation statistique basée sur notre expérience nous permettra de réduire au maximum l'utilisation des animaux tout en garantissant l'obtention de données robustes (Réduction). Afin de tenir compte des besoins quotidiens de nos animaux et d'améliorer leur bien-être (Raffinement), les porcs auront une nourriture adaptée, de l'eau de boisson à volonté et seront hébergés en groupe sociaux pour permettre un contact régulier entre congénères et réduire le stress. Un enrichissement adapté à l'espèce sera mis en place (chaines, jouets, balles anti-morsure...). Lors de la prise en charge des animaux, des protocoles d'anesthésie et d'analgésie adaptés permettront également de raffiner cette étude, avec un suivi permanent de leurs constantes et de la prise en compte de leur bien-être.

19071 Le vieillissement de la population, l'augmentation de l'obésité, les maladies cardiovasculaires, le diabète ou encore des maladies génétiques sont des facteurs prédominants conduisant à une forte augmentation des maladies rénales chroniques (MRC). Le diabète, qui évolue rapidement, représente plus de 20% des coûts des maladies rénales chroniques aux États-Unis et en Amérique du Sud. Dû à de multiples origines, les dysfonctionnements rénaux primaires conduisent à une insuffisance rénale chronique puis à une insuffisance rénale terminale, dont l'incidence est de 130 à 150 millions / an en Europe. Les MRC avec une prévalence mondiale de 11 à 13%, sont également considérées comme un accélérateur des risques cardiovasculaires, de mortalité prématurée et / ou de baisse de la qualité de vie.

Les MRC entraînent une diminution du fonctionnement des reins qui ne filtrent plus correctement le sang de l'organisme. Le rein étant un organe vital dans la création d'hormones et l'épuration des déchets néfastes de notre corps, sa perte d'efficacité partielle ou totale entraîne d'énormes bouleversements sur notre vie quotidienne (diurèse, vitalité, santé, ...). Lorsque la MRC est parvenue à un stade très avancé, le patient doit, pour remplacer les fonctions vitales des reins, être dialysé ou recevoir une greffe de rein, afin de nettoyer les impuretés qui s'accumulent dans son sang.

Le MRC est donc un fardeau sanitaire mondial avec un coût économique élevé pour les systèmes de santé. Sur la base de cet impact socio-économique, le diagnostic et le traitement de l'insuffisance rénale sont devenus un enjeu majeur de santé publique. Aujourd'hui, un nombre important de sociétés pharmaceutiques, participent activement à l'identification de candidats-médicaments qui seraient actifs à un stade précoce pour interrompre cette évolution vers l'insuffisance rénale chronique terminale. Afin de permettre le développement de ces médicaments, dès les phases précliniques aux essais cliniques, il est obligatoire de s'appuyer sur des modèles pertinents pour surveiller l'activité du médicament et l'efficacité sur la progression de la maladie rénale.

Le principal objectif de notre projet est de mieux comprendre les mécanismes déclenchant la maladie rénale chronique en élaborant des études sur des cellules provenant de patients et d'identifier de nouvelles petites molécules capables de corriger précocement la maladie. De nouveaux composés issus de notre recherche seront testés pour leur efficacité in vitro sur des cellules humaines de patients. Les plus actifs d'entre eux et à condition qu'ils présentent des propriétés pharmacocinétiques acceptables in vitro et in vivo chez le rat ou la souris, seront évalués dans un modèle in vivo d'efficacité chez des espèces de rongeurs. Notre démarche consistera à

utiliser des modèles souris ou rat décrits dans la littérature qui représentent le plus fidèlement possible l'évolution de la maladie chez l'homme. Nous pourrions ainsi vérifier l'efficacité des molécules préalablement sélectionnées *in vitro*. Dans le cadre de ce projet, plusieurs milliers de molécules seront produites et testées sur les cellules, notamment celles de patients atteints de la maladie, avant d'en sélectionner une dizaine pour l'évaluation *in vivo*.

Une plateforme d'imagerie permettra de suivre l'évolution de la maladie et l'efficacité de nos composés chez les mêmes animaux du début à la fin de l'étude, excluant ainsi le recours à des animaux supplémentaires pour des études séquentielles. Certains de nos modèles peuvent apporter de l'inconfort, nous avons donc établi une liste de points limites au-delà desquels, les traitements seraient suspendus ou arrêtés. Pour chaque modèle, un programme d'analgésie sera mis en place.

Les animaux seront hébergés dans un environnement contrôlé en continu (température, pression, hygrométrie, renouvellement d'air, alternance jour/nuit) relié à un système d'alarme. Ils bénéficieront d'un enrichissement du milieu adapté à l'espèce et à l'étude. La densité dans les cages sera en conformité avec les recommandations et autant que possible, les groupes d'animaux dans les études resteront ceux formés pendant l'acclimatation. Les animaux et leurs conditions d'hébergement (environnement, nourriture, eau de boisson) seront sous surveillance quotidienne.

Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés au strict nécessaire, nous utilisons un logiciel de lois statistiques permettant de calculer le nombre minimum de souris nécessaire pour montrer que l'effet de nos composés est significatif par rapport aux animaux malades contrôles.

Enfin, la veille de la littérature nous permet de remplacer certains modèles ou procédures par de nouveaux modèles tout aussi pertinents mais présentant moins d'impact sur le bien-être animal.

Ce projet fait l'objet d'un amendement, après son approbation, nous devrions utiliser au maximum 27990 animaux sur une période de 5 ans pour mener à bien ce projet.

19072 La myasthénie gravis (ou MG) est une maladie auto-immune touchant le muscle squelettique dont les principaux symptômes sont une faiblesse musculaire fluctuante et une fatigabilité excessive. La MG résulte d'une attaque de la jonction neuromusculaire par des anticorps dirigés notamment contre les récepteurs à l'acétylcholine (RACH). Le pronostic vital du patient peut être engagé si les muscles respiratoires sont touchés. Il n'existe à ce jour que des traitements symptomatiques ou non-spécifiques et qui doivent être pris à vie. Aucun traitement actuel ne permet la guérison pour la MG.

Deux organes sont impliqués dans la myasthénie : le thymus et le muscle squelettique. Le thymus a un rôle important dans la pathogénèse. Chez la majorité des patients présentant des anticorps anti RACH, une hyperplasie thymique est retrouvée et est caractérisée par la présence de centres germinatifs, structures impliquées dans la production des anticorps pathogènes. Le muscle est la cible des attaques des anticorps pathogènes.

L'objectif du projet de recherche est de mettre au point de nouveaux traitements efficaces pour les patients myasthéniques. Pour ce faire, le présent projet vise à évaluer l'efficacité thérapeutique des cellules souches mésenchymateuses humaines, cellules multipotentes présentant des propriétés immunosuppressives, dans les modèles murins de la MG (le modèle humanisé (NSG-MG) et le modèle classique par immunisation (EAMG)). Le modèle NSG-MG permet d'analyser l'impact de molécules thérapeutiques sur le thymus humain. Les souris NSG recevront une greffe de thymus humain. Le modèle classique EAMG, permettant une analyse du muscle, consiste à une immunisation active avec le récepteur à l'acétyl choline. Pour les 2 modèles, le suivi de la mise en place de la maladie sera réalisé par des tests cliniques (test comportementaux) et des tests sanguins hebdomadaires.

Les deux modèles expérimentaux ont déjà fait l'objet d'autorisation du comité d'éthique. Nous avons aussi soumis une analyse rétrospective des études précédentes qui nous ont permis d'établir le nombre minimal d'animaux à utiliser pour obtenir des données statistiquement robustes. Dans ce présent projet d'une durée de 5 ans, nous utiliserons 350 souris (240 NOD-SCID (NSG-MG) et 110 C57BL6 (EAMG)).

Toute la démarche scientifique a été établie afin de respecter la règle des 3R (remplacer, réduire et raffiner). Cette analyse in vivo ne peut être remplacée par des études conduites in vitro du fait de l'absence de modèle cellulaire in vitro reproduisant simultanément les altérations thymiques, la réparation musculaire, la réaction auto-immune sur la jonction nerf/muscle. De plus, le test de candidats thérapeutiques sur un organisme entier est une étape nécessaire avant d'envisager des essais cliniques. La démarche scientifique est établie afin d'obtenir des résultats statistiquement pertinents en utilisant le moins de souris possible. Le raffinement des expériences est assuré par la mise en place de points limites pour éviter l'inconfort et la douleur des souris. Les souris seront anesthésiées pour l'expérimentation et mises sous analgésiques en pré et pour la période post-expérimentation. Ainsi, toutes les dispositions visant à prévenir le stress et la douleur seront prises en compte et en charge par un suivi quotidien des animaux.

19073 L'État de Stress Post-Traumatique (PTSD, pour Post-Traumatic Stress Disorder, APA 1994) est une pathologie psychiatrique à forte prévalence dans la population générale (8 – 12%) qui, en l'absence de prise en charge adaptée, peut se compliquer en formes handicapantes et comorbides (dépression, addictions, anxiété, etc.)

Le PTSD se développe à la suite du vécu d'un événement traumatisant et va induire un certain nombre de symptômes. On retrouve ainsi chez les patients un syndrome de reviviscence traumatique, un évitement des stimuli associés au traumatisme, une activation neurovégétative et enfin des troubles de l'humeur et de la cognition. De plus il a été noté des modifications cérébrales notamment dans le cortex préfrontal (CPF), l'amygdale et l'hippocampe. L'implication de l'hippocampe dans la vulnérabilité à cette pathologie a été bien documentée. Or, au sein de l'hippocampe, de nouveaux neurones sont formés à l'âge adulte. On peut donc penser que ces néoneurones pourraient être impliqués dans la vulnérabilité à développer un PTSD.

Pour une étude approfondie de cette pathologie et notamment de l'implication des néoneurones dans le développement de celle-ci, l'utilisation d'un modèle animal est nécessaire. Le modèle murin de PTSD le plus classique repose sur l'application de chocs électriques. Ce protocole de conditionnement de peur contextuelle provoque des modifications comportementales durables (évitement, immobilisation, sursaut exagéré, anxiété accrue), associées à la symptomatologie et aux altérations neurobiologiques chez l'humain. Par ailleurs, chez l'animal il est possible d'induire expérimentalement de la neurogenèse. En effet il existe une souche de souris transgéniques développée récemment, chez lesquelles il est possible d'induire une augmentation de la neurogenèse à un moment voulu grâce à une injection de Tamoxifène activant la mutation génétique.

Le but de cette expérience est d'évaluer les effets d'une augmentation de la neurogenèse adulte sur l'activité des circuits neuronaux touchés dans le PTSD. Nous avons précédemment mis en évidence qu'une augmentation de la neurogenèse avait comme impact une diminution des comportements de peur et d'anxiété, cependant, les mécanismes et circuits neuronaux qui sous-tendent ces effets restent à déterminer. Pour étudier cela, nous allons inhiber l'activité des projections de l'hippocampe. En effet, la diminution des symptômes observés après une augmentation de la neurogenèse pourrait être sous-tendue par l'activité de ces projections hippocampiques.

Nous testerons 8 lots expérimentaux, qui se distingueront par 3 facteurs : le fait d'avoir ou non subi le stress traumatique, le fait d'avoir ou non subi l'administration de Tamoxifène (qui active la construction génétique) et enfin le fait d'inhiber ou non l'activité des projections de l'hippocampe. Ainsi, il y aura $8 * 20 = 160$ souris. En application de la règle des 3 R au modèle utilisé dans l'étude :

Raffinement : Les conditions d'élevage des animaux seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu. Les animaux recevront un traitement analgésique avant, juste après et 24-48 suivant l'intervention, puis si nécessaire un traitement antibiotique. Chaque animal est placé sur une couverture chauffante pour éviter toute hypothermie. Les cornées sont protégées de la déshydratation. L'anesthésie gazeuse est ici privilégiée pour mieux contrôler la profondeur d'anesthésie et pour une meilleure récupération post-opératoire. Une surveillance post-

opératoire d'une semaine est réalisée pour suivre chaque souris et intervenir si nécessaire. Le stress traumatique appliqué aux animaux peut être qualifié de moyen, en raison de sa brièveté.

Remplacement Ce modèle s'intéressant au comportement animal, il ne peut s'entreprendre que sur l'animal vivant et aucune méthode de remplacement (par exemple, une étude in vitro) n'est envisageable. Le stress chez l'animal, comme modèle de pathologie psychiatrique humaine, repose sur l'observation du comportement de l'animal vivant. Aucun marqueur cellulaire in vitro n'est disponible. De plus, les dosages biologiques requièrent des prélèvements frais qui ne peuvent être réalisés que sur animaux sacrifiés avec délai post-mortem et conditions de prélèvement contrôlés.

Réduction : les effectifs sont optimisés, les observations comportementales nécessitent une taille d'effectifs suffisante compte tenu de la variabilité inter-individuelle (n=20 sujets par groupe). De plus, la rationalisation des procédures permet d'optimiser l'utilisation des échantillons cérébraux prélevés.

19074 Notre projet vise à développer de nouvelles approches thérapeutiques pour le diabète de type 2 (DT2). Le diabète de type 2 est caractérisé par une résistance à l'insuline et/ou une sécrétion anormale d'insuline par les cellules β pancréatiques. Lorsque l'action de l'insuline diminue, comme cela se produit lors de la prise de poids dans l'obésité, la fonction des cellules β augmente en compensation. Pour tenter de réguler cette maladie, de nombreuses études ont montré l'importance de l'activité physique et du contrôle de l'alimentation parallèlement à l'intervention pharmacologique pour traiter le DT2. Cependant, les effets d'exercices physiques «génériques» montrent des effets variables suivant les patients. Nos données préliminaires sur différentes souches de souris atteintes de DT2 ont confirmé une grande variabilité du profil métabolique musculaire suivant le fond génétique et les formes de DT2 (induite ou génétique). C'est donc dans ce contexte que nous souhaitons :

Evaluer les effets de différents exercices physiques adaptés à différents statuts métaboliques sur l'évolution pathologique du DT2.

Pour cela, l'étude utilisera deux modèles souris du DT2 aux altérations métaboliques musculaires différentes.

Le premier modèle correspond à un DT2 induit sur souris C57Bl6 par un régime riche en graisses et une altération fonctionnelle des cellules β -pancréatiques par injection de streptozotocine (STZ). Le deuxième modèle correspond à un DT2 génétique, les souris transgénique MKR.

Nous soumettrons ces deux modèles souris à différents protocoles d'exercices de nage, de durée et d'intensité variable. Les effets in vivo de l'exercice physique seront suivis longitudinalement au niveau comportemental (comportement moteur) et physiologique (métabolisme énergétique, poids corporel et glycémie). Enfin, le niveau d'atteinte neuropathique sera analysé juste avant mise à mort. Les tissus cibles seront collectés et l'identification des mécanismes candidats qui pourraient être impliqués dans les effets bénéfiques de l'exercice physique sera réalisée grâce à des techniques de biologie moléculaire.

Ce projet a été conçu pour respecter au mieux la règle des 3R.

Concernant le remplacement, aucun modèle cellulaire ne peut répondre à de telles questions scientifiques. L'analyse des maladies humaines du système métabolique et l'évaluation des effets d'exercices physiques impliquent des relations complexes entre les différents tissus et organes impliqués (tissu musculaire, tissu nerveux, foie et tissus adipeux) et nécessite l'utilisation d'organismes vivants, mimant les maladies humaines et répondant aux stimuli de manière la plus proche possible de l'Homme.

Concernant la réduction, 64 souris seront utilisées en tout pour toute la durée du projet. Ce nombre est basé sur la constitution de 3 groupes de 8 animaux diabétiques soumis à 3 types d'exercices différents et à 1 groupe de 8 animaux contrôles diabétiques sans exercice pour chacun des deux modèles étudiés. Ce nombre permet le meilleur respect possible de la règle des 3R tout en permettant de tirer des conclusions statistiquement valides.

Enfin, concernant le raffinement, le confort des animaux sera amélioré par enrichissement de l'environnement (igloo, copeaux) et d'un suivi régulier du comportement en phase symptomatique, par l'utilisation de tableaux d'évaluation individuels. Les points limites ont été établis et adaptés à la pathologie et à la tranche d'âge des animaux. Un score de douleur trop élevé impliquera une euthanasie de l'animal avant la fin de l'étude.

Ce projet fondamental et préclinique doit permettre de découvrir de nouvelles approches potentiellement thérapeutiques et de permettre d'adapter la prise en charge clinique des patients atteints de diabète de type 2. Il favorisera le développement de protocoles de physiothérapie personnalisés à chaque patient (médecine personnalisée).

19075 Les désordres de type épileptique représentent l'une des atteintes cérébrales les plus importantes au monde. En effet environ 1% de la population mondiale va dans sa vie avoir une crise d'épilepsie. Au niveau de l'activité cérébrale, il est observé lors d'une crise de type épileptique une modification transitoire du fonctionnement d'un ou plusieurs réseaux de neurones qui vont fonctionner de façon synchrone et aberrante.

Malgré le développement de plus de 20 antiépileptiques lors des 30 dernières années, plus de 30% des patients épileptiques n'ont pas leur épilepsie contrôlée (absence de crises) par les antiépileptiques. De plus, les principaux antiépileptiques utilisés en clinique montrent certes une efficacité sur les décharges épileptiques mais provoquent de nombreux effets secondaires (fatigabilité, somnolence, tremblement, troubles cognitifs ou de l'humeur, prise ou perte de poids...). Il apparaît donc comme critique de développer de nouvelles molécules antiépileptiques afin de traiter les patients épileptiques résistants aux traitements déjà existants et qui provoquent moins d'effets secondaires afin d'améliorer le contrôle de la maladie et la qualité de vie des patients.

Dans ce projet, nous nous proposons de tester, sélectionner et valider de nouvelles molécules bioactives développées par les professionnels du médicament dans un modèle de souris mimant une épilepsie focale pharmacorésistante. Cette approche repose sur l'utilisation d'un modèle de souris reproduisant les principales caractéristiques histopathologiques et électrophysiologiques d'une forme d'épilepsie humaine : l'épilepsie du lobe temporal. En clinique, les patients souffrant d'épilepsie du lobe temporal sont résistants aux antiépileptiques et sont traités par deux voire trois antiépileptiques provoquant des effets secondaires très forts et invalidants. Une étude pharmacologique extensive de ce modèle de souris du lobe temporal a montré une certaine résistance à certains antiépileptiques, ceux touchant l'excitabilité cellulaire et une sensibilité aux antiépileptiques ciblant le système inhibiteur du cerveau. Ce modèle apparaît donc comme un modèle pertinent pour la sélection et la validation de nouvelles molécules antiépileptiques.

Ce projet facilitera le développement de nouvelles molécules antiépileptiques plus efficaces et présentant moins d'effets secondaires pour des patients souffrant d'épilepsies non contrôlées efficacement par les traitements actuels.

Ce projet est composé de 6 procédures expérimentales et nécessite l'utilisation de 4200 souris au total.

Réduction : Ce nombre d'animaux a été déterminé de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en préservant la validité scientifique des expériences menées. De plus, les protocoles d'études sont basés sur des procédures d'études cliniques en utilisant un plan d'étude croisé. Ce type de protocole permet de réduire le nombre d'animaux et d'augmenter la puissance statistique puisque chaque animal est son propre contrôle.

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

Remplacement : L'utilisation de ce modèle murin est justifiée par l'absence de modèle cellulaire ou computationnel pouvant se substituer à cette préparation in vivo.

19076 La maladie de Rendu-Osler (RO) est une maladie génétique affectant 1 personne sur 6000 en France et qui se caractérise par des saignements du nez importants, des dilatations de petits vaisseaux sanguins au niveau des muqueuses ou sur la peau et, dans les cas les plus graves, par des malformations artério-veineuses (jonctions directes entre veines et artères) au niveau du foie, des poumons et du cerveau. Aucune thérapie n'existe pour guérir de cette maladie. La recherche de nouvelles cibles thérapeutiques est donc indispensable pour pouvoir traiter les patients atteints de cette pathologie. Il existe plusieurs gènes impliqués dans cette pathologie. Ces gènes sont fortement exprimés par les cellules endothéliales, cellules qui forment la couche interne des vaisseaux sanguins (endothélium), assurant le contact avec le sang et contrôlant les échanges entre le sang et les organes et tissus.

Les cellules endothéliales de l'embryon et de l'enfant sont en angiogenèse active c'est-à-dire qu'elles se multiplient pour former de nouveaux vaisseaux sanguins indispensables à l'approvisionnement en sang des tissus nouvellement formés ou en croissance. Les cellules endothéliales chez l'adulte sont quiescentes c'est-à-dire qu'elles ne se multiplient plus. Elles restent néanmoins activées par des signaux qui sont pour l'heure peu connus. De plus, ces signaux sont différents d'un organe à l'autre ce qui pourrait expliquer la spécificité des organes affectés dans les pathologies vasculaires dont la maladie de Rendu-Osler. Les malformations vasculaires des patients RO s'aggravent avec l'âge suggérant un rôle crucial dans l'endothélium quiescent des gènes impliqués dans la maladie. Cependant, le rôle exact et les mécanismes moléculaires originels sont inconnus.

Etant donné la spécificité par organe des signaux impliqués dans la quiescence endothéliale, et les interactions entre les différents types cellulaires qui composent les vaisseaux sanguins et les tissus, il n'est actuellement pas possible de reproduire la pathologie dans des modèles *in vitro*. Le recours à l'expérimentation animale est le seul modèle possible pour mieux comprendre la pathologie et ainsi trouver des cibles thérapeutiques innovantes.

Ce projet propose ainsi d'utiliser un modèle murin dans lequel le gène codant pour la protéine ALK-1, gène le plus souvent muté chez les patients RO, est supprimé. Ce modèle, qui reproduit l'altération génétique des patients, est le plus adapté pour étudier la maladie RO.

Aucune méthode cellulaire ou informatique ne peut fournir ces informations importantes pour l'élaboration ultérieure de stratégies thérapeutiques. L'étude de la spécificité des signaux régulant l'endothélium quiescent par organe est impossible à produire *in vitro* puisque l'isolement de cellules endothéliales induit une perte du microenvironnement. Le recours à des investigations *in vivo* est donc essentiel. Ces investigations porteront sur la caractérisation des phénotypes vasculaires hépatiques et pulmonaires des souris déficientes en ALK-1 (formation de malformations artérioveineuses, évaluation de la perméabilité vasculaire), ainsi que la détermination des mécanismes moléculaires conduisant à ces phénotypes (analyse de l'expression de gènes régulés par ALK-1). Le modèle murin a été choisi pour réaliser cette étude. Les animaux sont nés et ont été élevés dans un établissement agréé. Nous veillerons à n'utiliser que le nombre minimum nécessaire d'animaux, estimé à 380 sur 5 ans pour assurer la validité des résultats. Cette estimation est basée sur des tests statistiques nous permettant d'évaluer le nombre minimal d'animaux nécessaires pour obtenir un résultat scientifique conclusif.

Les animaux sont hébergés en groupe dans un environnement enrichi et des protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis pour éviter toute souffrance et stress des animaux.

Des critères d'arrêt ont été définis afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus, pour lesquels il sera décidé de mettre en place un traitement approprié ou d'une euthanasie.

19077 Les maladies parasitaires liées aux vers parasites touchent aussi bien l'Homme que les animaux. L'impact de ces vers parasites sur la santé animale est significatif puisqu'ils sont responsables de symptômes cliniques de type perte de poids, anémie, diarrhée voire la mort des animaux les plus atteints. L'utilisation massive de vermifuges a conduit à l'apparition de vers résistants aux traitements et rend actuellement le contrôle de ces parasites relativement limité pour l'élevage moderne conventionnel. Quant à l'agriculture biologique, elle favorise la mise en place de mesures

de prévention et proscrit en préventif l'utilisation de médicaments vétérinaires allopathiques chimiques de synthèse. Que ce soit dans l'un ou l'autre de ces systèmes de production, la santé des animaux peut être mise à mal par les parasites entraînant un mal-être important voire une souffrance dans les cas les plus extrêmes. Il est donc urgent de trouver de nouvelles solutions de contrôle efficaces, plus naturelles et respectueuses de l'environnement.

Pour cela, nous développons des projets de recherche qui visent à mieux comprendre la biologie du parasite ainsi que les mécanismes impliqués dans l'apparition de vers résistants mais également l'effet antiparasitaire de produits naturels. Au laboratoire, le modèle ovin est couramment étudié mais dans l'optique de tester de nouvelles molécules aux propriétés antiparasitaires, le modèle murin est très pertinent. En effet, après des tests *in vitro* de première intention (mise en évidence de produits actifs sur les stades libres du parasite) les preuves de concept peuvent être menées *in vivo* sur souris et ceci de manière beaucoup plus aisée que si l'on travaillait sur ovins (infrastructures, quantités de produits naturels à tester, approvisionnement en animaux, coût. . .). Nous avons donc mis au point un modèle murin sur lequel nous pouvons inoculer un nématode gastro-intestinal, *Heligmosomoïdes polygyrus bakeri*, phylogénétiquement proche des parasites ovins. Dans un second temps, un retour sur les espèces cibles est nécessaire.

Actuellement, les micro algues sont sujettes à un fort engouement en nutrition et santé humaine, par leur richesse en nutriments et l'effet avéré de certaines molécules sur la protection de l'organisme : activités anti-oxydante, antimicrobienne, antivirale, antiparasitaire... Cet intérêt pour leur potentiel touche depuis peu le secteur de la nutrition animale. De plus, les effets bénéfiques de certains composés des micro algues sur la santé des organismes peuvent également constituer une alternative à l'utilisation des traitements médicamenteux en élevage. Cependant, les effets de l'introduction des micro algues dans la ration sur les performances et la santé des animaux d'élevage sont peu connus.

En première intention, une série de tests *in vitro* (parasite ovin) a permis de mettre en évidence une activité antiparasitaire de plusieurs extraits de ces micro algues. Dans un second temps, une étude préliminaire *in vivo* (modèle murin) a été menée sur 3 extraits sélectionnés *in vitro*. Un effet antiparasitaire très marqué a été observé pour l'un des candidats ainsi qu'un effet moindre pour un deuxième extrait.

Le protocole proposé ici est un retour sur l'espèce cible et vise à savoir si l'introduction de micro algues dans la ration permet d'avoir de nouvelles armes dans la gestion des strongles digestifs chez le mouton.

La charge parasitaire sera le critère évalué (nombre d'œufs de parasite excrété dans les fèces au cours du temps, hématoците ponctuel).

Les effets de ces extraits seront étudiés par la comparaison de 4 groupes :

- à un groupe avec uniquement la base de la supplémentation (sans micro algue) et soumis à l'infestation par le parasite.
- à un groupe recevant une supplémentation avec un seul extrait (Algue A ou Algue B) et soumis à l'infestation par le parasite.
- à un groupe recevant une supplémentation combinée (Algue A + Algue B) et soumis à l'infestation par le parasite.

Dans ce projet nous utiliserons 32 agnelles (4 lots de 8 animaux) âgées d'environ 3 mois. Le nombre d'animaux est calculé pour pouvoir mettre en évidence des effets modérés à fort, sur la base d'expérience précédente. Ce nombre d'animaux a été réduit au minimum. Il correspond au nombre minimal permettant d'obtenir des résultats significatifs avec les tests statistiques utilisés.

Remplacement : le ver parasite *Haemonchus contortus* est un parasite obligatoire dont le cycle de développement ne peut être réalisé *in vitro*. De plus notre étude vise à reproduire les situations d'élevage.

Réduction : afin de minimiser au maximum les nombres d'animaux nécessaire, une série de tests *in vitro* a permis de sélectionner les extraits de micro algues les plus prometteurs (3 parmi 30 candidats) puis les 2 plus actifs *in vivo* (modèle murin) avant de réaliser ce protocole

Raffinement : les animaux sont conduits en lot, et gérés par du personnel qualifié; ils sont maintenus en condition d'élevage sur litière paillee et ont en enrichissement des objets suspendus (disque/tube à mordiller) et/ou tapis brosse fixe avec picots. La dose infestante est limitée pour démontrer des effets tout en minimisant l'impact sur le bien-être des animaux. Les prélèvements de matières fécales pour les coproscopies sont réalisés après lubrification et la zone de prise de sang est rasée si besoin. Les doses infestantes de 6000 larves infestantes permettent d'obtenir une infestation suffisante pour mettre en évidence des effets bénéfiques tout en minimisant les altérations physiologiques sur les animaux.

19078 L'objectif de ce projet de recherche est d'évaluer la biodistribution de nouveaux radiotraceurs par imagerie TEP-CT et SPECT-CT.

Ces nouveaux composés sont destinés à être développés pour des applications de médecine nucléaire en oncologie. Les radiotraceurs testés sont des sondes moléculaires contenant un ligand avec une liaison spécifique à la cible tumorale et un radio-isotope à courte demi-vie détectable par imagerie nucléaire.

Ce projet de recherche répond à un besoin médical non satisfait dans le domaine de l'oncologie. Les tumeurs ont besoin d'un diagnostic précoce et spécifique pour lequel il est essentiel d'utiliser des sondes diagnostiques extrêmement puissantes et spécifiques. Cela permettra une meilleure caractérisation de la tumeur et la conception d'une stratégie thérapeutique optimisée conduisant à une progression limitée de la maladie et un besoin moindre de traitements supplémentaires. Bien entendu, ces nouveaux agents doivent faire l'objet d'une validation préclinique avant toute utilisation clinique. L'efficacité diagnostique des radiotraceurs étudiés ne pouvant être testée *in vitro*, le recours aux modèles animaux est donc nécessaire. La détermination de la biodistribution d'un radiotracer est primordiale pour affiner son efficacité. Pour cela, cette étude propose d'étudier la biodistribution de nouveaux radiotraceurs sur le modèle porcin. Après injection intraveineuse du nouveau radiotracer aux animaux anesthésiés, des acquisitions d'imagerie médicale non invasives (TEP-CT ou SPECT-CT) seront réalisées 30 minutes, 1h, 2h et 4h post-injection. Ces acquisitions permettront de quantifier la radioactivité présente dans différents organes et à différents temps afin de connaître la répartition du radiotracer dans l'organisme. De plus, des prélèvements sanguins et urinaires seront réalisés à différents temps (5, 15, 30 minutes puis 1, 2 et 4h post-injection du radiotracer) dans le but de mesurer la dose de radioactivité circulante (dans le sang) et éliminée (dans les urines, car l'élimination de la radioactivité est effectuée au niveau urinaire).

Pour chaque étude de validation d'un nouveau radiotracer, 5 porcs (*Sus scrofa domesticus*) (femelles, 5 mois, 40 +/- 5 kg) seront inclus. Ce modèle a été choisi pour ses nombreuses similarités physiologiques et anatomiques avec l'Homme. Le modèle porcin présente également l'avantage de pouvoir utiliser du matériel, des équipements et des protocoles identiques à ceux dédiés à l'Homme.

Ce projet est conçu pour respecter au mieux la règle des 3R:

Remplacement: L'efficacité diagnostique des radiotraceurs étudiés ne pouvant être testée *in vitro*, le recours aux modèles animaux est donc nécessaire. Le recours à l'utilisation des porcs est justifié car l'étude de la distribution tissulaire des cibles concernées chez les rongeurs ne peut être correctement transposée à l'Homme.

Réduction: Nous estimons notre besoin maximal en animaux à 5 porcs par étude. Le nombre de radiotraceurs innovants à tester est estimé à 5 sur les 5 ans, soit un total de 25

animaux maximum sur 5 ans. Ce nombre a été déterminé par l'expérience de l'équipe comme étant le nombre minimal permettant d'obtenir des effets interprétables. Le nombre d'animaux a été réduit au maximum et a été conçu sur la base des données de la littérature et de travaux antérieurs réalisés dans des contextes analogues.

Raffinement: Afin de tenir compte des besoins quotidiens de nos animaux et d'améliorer leur bien-être, les animaux bénéficieront d'une période d'acclimatation de 7 jours avant toute manipulation, auront une nourriture adaptée, de l'eau de boisson à volonté et seront stabulés en groupe de 2 à 8 pour permettre un contact régulier entre congénères et réduire le stress avec enrichissement

(cordes pendantes, chaînes, jouets et balles anti-morsure, fibres de bois au sol). Les différentes acquisitions d'imagerie seront réalisées sous une seule anesthésie générale. Un contrôle biquotidien en postopératoire est assuré par une personne compétente avec évaluation du bien-être et de la douleur (par grille de score). L'évolution du score permet de noter l'amélioration ou l'aggravation de l'état de l'animal et de prendre des mesures appropriées (points limites). Les animaux seront gardés en vie à la fin de ce projet.

19079 Ce projet propose des techniques de chirurgie dans des modèles rongeurs « à façon » sur la base d'une structure génétiquement modifiée (lignées ciblées) répondant aux besoins particuliers des projets scientifiques des aires thérapeutiques. Ces modèles génétiquement modifiés peuvent en effet nécessiter des actes chirurgicaux : castration, implantation de mini-pompe ou d'implants hormonaux pour des stimulations pharmacologiques ou immunologiques (immunosuppression ou immunostimulation) afin de répondre plus spécifiquement à une problématique scientifique.

L'objectif est de produire des animaux ciblés avec des caractéristiques génétiques et physiologiques particulières pour soutenir les axes des équipes de recherche dans la lutte contre les maladies comme Alzheimer, les problèmes cardiovasculaires ou le cancer et permettre ainsi d'aboutir à des modèles rongeurs (souris, rats) présentant les stades précoces de ces maladies et offrant de nouvelles possibilités pour tester de futurs candidats-médicaments.

L'espèce de choix est principalement la souris génétiquement modifiée mais aussi parfois le rat.

L'effectif produit est estimé en fonction de la demande de services spécifiques en support aux projets de recherche et n'excédera pas 350 animaux par an soit un effectif maximal de 1050 animaux sur une durée de 5 ans pour ce projet.

Ce projet respecte les 3R :

-1) Remplacer : Les actes chirurgicaux (castration, ovariectomie, mini-pompe) effectués sur ces animaux sont justifiés par le besoin de fournir aux chercheurs les organismes et tissus décrits dans leurs procédures expérimentales. Chaque fois que les cultures cellulaires suffisent à couvrir les besoins des chercheurs, celles-ci sont utilisées sans recours ultérieur à l'animal.

-2) Réduire : L'approche de maximaliser les modèles sur fond génétiquement modifié vise à raffiner pour être au plus proche de la pathologie « cible » et réduire le nombre d'animaux nécessaires aux expérimentations.

-3) Raffinement : Les études menées au sein du centre de recherche sont encadrées par des recommandations internes, intégrant tous les aspects affectant l'utilisation des animaux (éthique, hébergement, soins, manipulations, expérimentation) et ayant pour objectif de prévenir toute douleur ou détresse chez l'animal (utilisation d'anesthésiques et d'antalgiques). Dans le cadre de modèles chirurgicaux, l'utilisation d'antalgiques au sein de protocoles déjà établis, et l'ajustement des types de litières contribuent au raffinement de la période post-chirurgicale.

19080 Comprendre le lien entre l'alimentation et la santé représente un réel challenge face à une épidémie mondiale de maladies et pathologies métaboliques telles le diabète de type 2 principalement associé à l'obésité. Ces maladies sont induites par une dérégulation du métabolisme énergétique et glucidique. Ces dernières années, les pistes de recherche pour la lutte contre ces maladies s'orientent vers les interactions entre les protéines et le métabolisme énergétique et glucidique. En effet, il est connu que l'ingestion de protéines induit un effet satiétogène qui pourrait s'expliquer par la formation de peptides bioactifs issus de la digestion. Ces peptides exerceraient une action sur les mécanismes de régulation périphériques de la prise alimentaire et sur l'homéostasie glucidique.

L'objectif de cette expérimentation est de :

- Vérifier l'interaction entre les protéines et le métabolisme glucidique.

- Tester l'hypothèse que la nature et l'origine des protéines induiraient des différences de réponse biologique.

Cette expérimentation consisterait à tester l'effet de différentes protéines agro-alimentaires administrées par gavage chez des rats (48 rats par étude soit 240 rats maximum sur 5 ans) sur le métabolisme intestinal glucidique grâce à des tests de tolérance oral au glucose.

Le but de ce projet s'inscrit dans la continuité d'une étude réalisée in vitro montrant des effets potentiels des protéines sur la régulation de l'homéostasie glucidique. En effet, des tests in vitro sur lignées cellulaires d'origine intestinale ont été réalisés au laboratoire afin de doser certains marqueurs pouvant être impliqués dans la régulation du métabolisme glucidique produites après contact des cellules intestinales avec les différentes protéines agro-alimentaires avant et après digestion par un protocole de digestion gastro-intestinale simulée. Malheureusement ces tests ne permettent pas de mettre en évidence l'effet des protéines sur la régulation du glucose. A cette étape, l'utilisation des animaux est donc indispensable. Par conséquent, nous proposons d'explorer physiologiquement les effets des protéines sur l'homéostasie glucidique dans un modèle animal de petite taille: le rat.

Nous prévoyons d'utiliser 48 animaux par étude (soit 240 rats maximum sur 5 ans). Ces derniers seront hébergés dans une animalerie conventionnelle, dans des cages respectant les normes en vigueur.

Les procédures expérimentales sont conçues pour respecter la règle des 3R et limiter le nombre d'animaux utilisés :

- Principe de remplacement : Il n'existe pas de méthodes alternatives ou de substitution nous permettant d'étudier le rôle in vivo de protéines naturelles. L'utilisation de rongeurs (souche Zucker) nous permet d'évaluer le potentiel des protéines à agir sur la régulation glucidique de rats diabétiques.

- Principe de réduction : Le nombre d'échantillons testés ainsi que leurs concentrations est réduit grâce au test de criblage in vitro.

Principe de raffinement : Les animaux sont surveillés tous les jours afin d'évaluer la présence de signes cliniques modérés de détresse au cours de leur hébergement. Les critères et signes qui permettent d'évaluer le niveau de douleur ou de stress ou la détresse des animaux ont été dégagés sur la base des critères établis dans la littérature dès 1985. Chaque procédure expérimentale sera réalisée par un personnel habilité. Lors des manipulations, les stratégies de raffinement des expériences (pièce calme, dispositions pour diminuer l'angoisse des animaux) seront réalisées par le personnel habilité. Lors des procédures expérimentales, les critères et signes permettant d'évaluer la vigilance des animaux et la présence de signes cliniques de détresse/douleur seront particulièrement étudiés. Si un animal présente des signes cliniques de détresse au cours d'une expérimentation, celui-ci sera rapidement euthanasié pour éviter toute souffrance.

19081 L'hypertension artérielle est un facteur de risque cardiovasculaire qui affecte entre 10 et 40% de la population en fonction de l'âge. L'hyperaldostérisme primaire est dû à un dysfonctionnement du cortex surrénalien et constitue la forme la plus fréquente d'hypertension artérielle. L'une des principales causes de cette pathologie est la formation d'adénome produisant de l'aldostérone en excès, hormone impliquée dans le contrôle de la pression artérielle.

Les interactions entre les cellules corticosurréaliennes et les cellules endothéliales permettent le développement coordonné du réseau vasculaire lorsque les cellules surréaliennes prolifèrent et l'organe grandit.

L'objectif de notre projet est de mieux comprendre ces interactions en suivant le devenir des cellules les plus externes de la corticosurrénale, qui produisent l'aldostérone, au cours du temps et en réponse à des traitements ou régime connus pour stimuler la plasticité du cortex. Pour cela nous utiliserons un modèle murin permettant de suivre de façon spécifique le devenir de ces cellules, avec un système rapporteur.

Afin de pouvoir étudier le rôle des cellules endothéliales dans la plasticité du cortex surrénalien, les souris seront soumises à des régimes riches ou pauvres en sodium ou en potassium ainsi qu'à des traitements à base de glucocorticoïdes ; régimes et traitements connus pour modifier la plasticité de cet organe. Nous soumettrons également les souris à un traitement inhibant

l'angiogenèse pour comprendre l'interaction entre angiogenèse et prolifération cellulaire, en situation normale et en réponse à un traitement aux glucocorticoïdes.

Pour respecter le principe des 3Rs, le nombre d'animaux utilisés sera réduit au nombre minimum nécessaire et suffisant pour permettre l'analyse statistique des données.

Remplacement : Une approche in vitro est développée pour étudier certains aspects des interactions cellules endocrines / cellules endothéliales, par l'utilisation de modèle de co-culture de cellules dérivées de cortex surrénalien et de cellules endothéliales.

Réduction : Le nombre de souris a été réduit au maximum tout en assurant des résultats statistiquement interprétables. Les analyses observationnelles seront complétées et vérifiées par les approches in vitro.

Raffinement : La souffrance animale sera réduite au maximum par le raffinement des méthodes expérimentales, notamment l'utilisation d'analgésique adaptée si nécessaire. Une surveillance régulière sera mise en place et une grille d'évaluation établie afin de permettre de mettre fin à l'expérimentation de façon anticipée. Les conditions d'hébergement seront enrichies par l'ajout de maison en plastique et des morceaux de coton seront placés dans les cages pour permettre la fabrication d'un nid.

L'accès à l'alimentation et à l'eau de boisson sera ad libitum.

Au total, 368 souris seront utilisées dans ce projet.

Les résultats de ce projet permettront de mieux comprendre les interactions entre cellules endocrines et endothéliales au niveau du cortex surrénalien en condition normale mais aussi pathologique. A terme, ces résultats pourraient permettre le développement de nouveaux traitements ciblant les voies mises en cause et représenter une alternative aux options actuellement disponibles afin de parfaitement contrôler la pression artérielle pour les patients chez qui l'option chirurgicale n'est pas possible ou n'est pas souhaitée.

19082 La prévalence du diabète de type 2 à la Réunion est 2 fois plus importante qu'en métropole et la surmortalité associée y est 3,5 fois plus importante. L'augmentation des facteurs de risque (obésité, surpoids, sédentarité, mauvaise alimentation) laisse présager une augmentation de la prévalence du diabète à la Réunion dans les années à venir. La neuropathie diabétique (ND) est l'une des complications chroniques les plus fréquentes du diabète. Elle concerne les atteintes du système nerveux périphérique, c'est-à-dire les nerfs sensitifs et moteurs ainsi que les nerfs du système nerveux autonome qui commandent nos organes. La ND perturbe considérablement la sensibilité à la douleur et au toucher. Chez certains patients, elle provoque des douleurs terribles au contact d'un simple drap et chez d'autres au contraire, elle peut rendre indolore une blessure au pied. Ces blessures au pied peuvent facilement s'infecter et mener à la gangrène et à l'amputation. Ces complications au niveau du pied ont une incidence économique et sociale très importante, avec un risque d'amputation multiplié par 10 à 15 chez le diabétique. Actuellement, les thérapies pour traiter les ND sont d'une part de rééquilibrer la glycémie (non efficace pour le diabète de type 2) et d'autre part d'utiliser des molécules ciblant les douleurs d'origine nerveuses.

Dans l'objectif d'étudier cette pathologie et de proposer de nouvelles approches thérapeutiques, nous proposons de développer deux modèles de ND chez la souris en utilisant : 1) Un modèle de souris pré-diabétique induit par un régime riche en lipide. 2) Un modèle de souris diabétique de type 2 (souris db/db). Ces deux modèles murins développent des ND au cours du temps. Nous évaluerons la neuropathie en réalisant des tests sensoriels et moteurs. L'utilisation de modèles murins de ND est couramment utilisée en recherche et présente l'avantage de mimer les déficits sensoriels (perte de sensibilité tactile et douloureuse) ainsi que les lésions périphériques (diminution de l'innervation au niveau de la peau) observés chez les patients. Pour la mise en place des modèles de ND, nous utiliserons un maximum de 85 souris.

Nous serons particulièrement vigilants afin de développer nos protocoles dans le respect de la règle des 3R :

Remplacement : Pour ce projet, le recours à l'expérimentation sur des animaux vivants est indispensable car la ND est impossible à reproduire sur des modèles *in vitro* simplifiés. Le modèle de ND est couramment utilisé chez la souris car elle permet de reproduire les déficits observés chez l'homme. Les études seront systématiquement optimisées d'après la littérature et/ou les observations réalisées au laboratoire.

Réduction : L'utilisation des animaux sera réduite au maximum et les expériences seront planifiées et réalisées les unes après les autres afin d'éviter des pertes inutiles. L'application de cette politique de réduction mise en place permettra d'optimiser au mieux chaque expérimentation afin de retirer un maximum d'information d'un minimum d'animaux.

Raffinement : Les protocoles sont réfléchis afin de réduire la douleur et la détresse de l'animal. Les animaux seront sous la surveillance de personnes habilitées à manipuler les animaux et la diffusion par ces personnes de leur savoir-faire permettra de réaliser nos expérimentations dans le respect de l'animal et des conditions optimales du suivi des règles d'hygiène et de sécurité. Tous les animaux sont hébergés dans un service de zootechnie ayant un environnement enrichi qui a été agréé par le ministère.

19083 Le Syndrome de Détresse Respiratoire Aiguë (SDRA) est une pathologie grave d'apparition rapide caractérisée par une réaction inflammatoire pulmonaire disproportionnée en réponse à une agression (pneumopathie bactérienne ou virale, infection extra-pulmonaire, transfusion massive, polytraumatisme, . . .), conduisant à une défaillance respiratoire par destruction des éléments pulmonaires permettant les échanges gazeux (membrane alvéolo-capillaire). Cette pathologie est associée à un pronostic sombre avec une mortalité d'environ 40% alors qu'elle concerne plus de 10% des patients admis en réanimation. Malgré les progrès considérables réalisés dans la compréhension des mécanismes à l'origine de cette maladie, son traitement reste à l'heure actuelle essentiellement symptomatique et aucun traitement visant à contrôler cette réaction inflammatoire pulmonaire exacerbée n'a fait la preuve de son efficacité.

Les lymphocytes T régulateurs (Treg) sont une sous-population de lymphocytes T CD4+ jouant un rôle essentiel dans le maintien de l'équilibre du système immunitaire et dans la prévention des réponses immunitaires aberrantes. Les Treg sont dotés de propriétés immuno-modulatrices, c'est-à-dire qu'ils sont capables d'interagir avec la plupart des composants du système immunitaire et d'empêcher leur activation, et ils jouent également un rôle dans la réparation des tissus endommagés. Un rôle protecteur des Treg au cours du SDRA a été montré dans plusieurs travaux expérimentaux (réduction des lésions à la phase aiguë et accélération de la résolution) mais peu d'études se sont intéressées au renforcement de cette population cellulaire pour contre-balancer l'inflammation dérégulée caractéristique de cette maladie.

L'objectif scientifique principal de ce projet de recherche est d'évaluer l'impact d'un renforcement du nombre et des propriétés immuno-modulatrices des Treg via une immunothérapie spécifique, sur la phase aiguë et l'évolution du SDRA, dans des modèles expérimentaux chez la souris. Les objectifs secondaires comprennent l'analyse des Treg dans les compartiments pulmonaire et systémique lors du traitement par immunothérapie et l'évaluation de l'impact du traitement sur les autres acteurs cellulaires impliqués dans le développement du SDRA.

Ce projet de recherche expérimental sera réalisé chez des souris C57BL/6 âgées de 8 à 12 semaines. 1000 souris seront nécessaires pour mener à bien ce projet. Différents modèles expérimentaux seront conduits. L'induction de l'inflammation pulmonaire sera essentiellement réalisée par l'instillation intra-trachéale de lipopolysaccharide (LPS) puis le traitement par immunothérapie sera administré par voie intra-péritonéale. Différentes conditions expérimentales seront appliquées et permettront de s'assurer que les effets du traitement sont effectivement médiés par les Treg. Enfin, un modèle de SDRA d'origine infectieux par instillation intra-trachéale d'*Escherichia coli* sera réalisé, permettant de reproduire plus fidèlement ce qui est observé chez l'homme dans le contexte de pneumopathie bactérienne.

Différents prélèvements seront ensuite réalisés, 1, 3, 5 et 10 jours après l'induction du SDRA, afin de suivre l'évolution des lésions de SDRA et des populations cellulaires immunitaires et notamment

des Treg dans les compartiments pulmonaire et systémique. Les analyses comprendront notamment l'évaluation de la sévérité du SDRA par histologie et l'analyse des populations cellulaires d'intérêt dans ces différents compartiments par cytométrie en flux.

Au cours de ce projet de recherche, il est attendu une augmentation du nombre et des capacités immuno-régulatrices des Treg, notamment au niveau pulmonaire, lors du traitement par immunothérapie et que ce renforcement de l'activité des Treg soit associé à une atténuation de la réponse inflammatoire dérégulée et des lésions pulmonaires observées à la phase aiguë ainsi qu'à une accélération de la résolution du SDRA.

Le respect du principe des « 3 R » sera appliqué tout au long de ce projet de recherche.

Afin de remplacer les animaux, un certain nombre d'expériences visant à étudier les effets du traitement par immunothérapie sur les interactions entre les Treg et les autres cellules impliquées dans le développement du SDRA seront réalisées grâce à des co-cultures de cellules in vitro et non chez des animaux. Cependant, la complexité des interactions globales entre les Treg et les autres acteurs cellulaires au cours du SDRA rend nécessaire l'utilisation de modèles in vivo chez l'animal afin de répondre aux objectifs de ce projet de recherche, les modèles in vitro ne pouvant à eux-seuls être suffisants.

Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, les analyses seront combinées au maximum chez un même animal (lavage broncho-alvéolaire, prélèvements des poumons, du sang et de la rate chez une même souris pour les analyses cellulaires). De plus, certaines analyses ne seront pas réalisées à tous les temps expérimentaux mais uniquement à ceux jugés les plus pertinents (analyses de transcriptome et de méthylome par exemple). Enfin, le nombre d'animaux par groupe a été calculé afin de correspondre au nombre minimal permettant de mener des études statistiques pertinentes sur le plan scientifique.

Enfin, le principe de raffinement sera appliqué. Les animaux seront surveillés de manière quotidienne après l'induction du SDRA et des points limites seront définis, avec une vigilance particulière portée sur les signes de souffrance ou de détresse liés à l'atteinte du système respiratoire. Par ailleurs, une anesthésie sera réalisée avant tout geste douloureux (mélange de Kétamine et Xylazine par voie intra-péritonéale) et une analgésie systématique sera réalisée afin de prévenir la douleur et la souffrance liée au développement du SDRA (Buprénorphine). En cas de douleurs intenses ou de signes de souffrance malgré le traitement systématique, l'analgésie sera majorée, sous réserve de l'absence d'apparition d'un point limite justifiant l'euthanasie de l'animal. Enfin, l'environnement des souris sera enrichi (lanières de papier Kraft, maisons en carton, tunnel en carton ou carré de coton compacté).

19084 Le développement précoce du cortex cérébral s'accompagne de mouvements cellulaires complexes, dont certains sont de grande amplitude. Ces mouvements sont contrôlés par les propriétés intrinsèques des cellules qui migrent et par des facteurs extrinsèques qui influencent leurs mouvements. Les anomalies qui surviennent pendant la phase de migration sont responsables de défauts de structure du cortex et se traduisent par des dysfonctionnements neurologiques ou psychiatriques très invalidants. Les anomalies de migration d'une sous-population des neurones corticaux, les interneurons, conduisent à des défauts de localisation et/ou à des changements de densité dans le cortex. Ces anomalies ont été observées chez des patients souffrant de maladies neuro-psychiatriques comme l'épilepsie, la schizophrénie, l'autisme, le déficit intellectuel, suggérant que ces pathologies peuvent avoir une origine développementale. Pour comprendre l'origine de ces maladies humaines, il est crucial d'identifier les facteurs qui contrôlent la mise en place des interneurons corticaux dans les conditions normales et de comprendre le rôle joué par ces facteurs dans les conditions pathologiques. Des facteurs intrinsèques aux interneurons corticaux et des facteurs de l'environnement régulent la mise en place et le fonctionnement des circuits corticaux.

Pour caractériser le rôle de ces différents facteurs, nous menons des études fondamentales sur des modèles de souris sauvages et transgéniques dont les interneurons corticaux expriment un marqueur fluorescent ce qui permet de les identifier dans le cerveau, et sur des modèles de souris mutantes dans lesquelles les processus intrinsèque ou extrinsèque que nous étudions sont altérés.

Les souris ont un cortex cérébral qui suit les mêmes règles de développement que celui de l'homme aux phases précoces. Elles sont un bon modèle animal pour les études que nous menons, bien adaptées aux études embryologiques et histologiques qui permettent de caractériser le développement et l'organisation adulte des circuits corticaux. Elles sont également bien adaptées aux études comportementales qui permettent de corrélérer les défauts d'organisation des circuits corticaux à des défauts de fonctionnement des circuits. Nos travaux antérieurs nous aident à raffiner et réduire le nombre d'animaux requis tout en générant des résultats robustes. Le nombre total d'animaux utilisés pour le projet sera de 1940 souris.

Les objectifs de la recherche sont

- 1) de caractériser les mécanismes de migration neuronale à l'échelle cellulaire, en comparant le phénotype de neurones migrant dans les cerveaux de souris contrôles ou de souris avec un gène d'intérêt muté. Lorsque les souris mutantes pour le gène d'intérêt n'existent pas, nous utilisons la technique de l'électroporation in utero qui permet de surexprimer ou invalider les gènes d'intérêt.
- 2) de déterminer les conséquences de l'invalidation des gènes d'intérêt sur l'organisation neuroanatomique du cortex embryonnaire et adulte, sur les propriétés fonctionnelles du cortex juvénile et adulte, et sur le comportement des animaux juvéniles et adultes. Les études visent à caractériser la structure du cerveau de souris mutantes et de souris mutantes conditionnelles obtenues par croisement.

Mesures prises pour le respect de la règle des 3 Rs :

Remplacement. Les modèles in vitro sont largement utilisés dans nos études mais la substitution de neurones embryonnaires par des lignées cellulaires n'est pas encore possible. Enfin l'influence de la structure tridimensionnelle du tissu cortical sur la migration neuronale n'est pas encore modélisée et nous ne pouvons pas nous affranchir d'études expérimentales en l'état actuel des connaissances.

Réduction: L'expérience acquise au cours des travaux antérieurs nous a permis d'ajuster le nombre d'embryons transgéniques contrôles et mutants nécessaires pour comparer les conditions expérimentales d'une manière valide sur le plan statistique. Pour réduire le nombre d'animaux utilisés, les expériences d'histologie seront réalisées sur des animaux déjà utilisés dans les expériences de comportement.

Raffinement. Les souris sont hébergées dans un milieu enrichi avec du 'sizzle nest'. Des observations du bien-être animal sont réalisées 1 fois par jour. Pour les expériences d'électroporation in utero: les plasmides électroporés dans le cerveau des embryons ne sont pas cytotoxiques. Pour la procédure de chirurgie un protocole d'anesthésie et d'analgésie est mis en place. Pour les animaux commerciaux, une période d'acclimatation d'une semaine est respectée. Toutes les procédures expérimentales sont définies avec des points limites.

19085 Une formation théorique et pratique intitulée « Initiation à l'expérimentation animale » est proposée à destination d'étudiants engagés dans un parcours professionnel en relation avec la recherche expérimentale dans le domaine de la santé et de l'identification de nouveaux médicaments (22 étudiants au maximum chaque année répartis sur 2 promotions). L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques est souvent une source de questionnement et d'incertitude chez certains de ces étudiants. Ce projet pédagogique est basé sur des enseignements théoriques et pratiques dont l'objectif est de les former à la démarche expérimentale dans le domaine biomédical et de les initier à l'expérimentation animale. Ces enseignements les aideront à se positionner vis-à-vis de l'utilisation de modèles animaux dans la poursuite de leur cursus.

Les enseignements théoriques abordent les notions suivantes : Apports de l'expérimentation animale ; Aspects réglementaires et bioéthiques ; Notion de modèle animal (modèles animaux en cancérologie, en immunologie et en neurosciences) ; Physiologie et comportement des rongeurs (rat/souris) ; Bien-être animal ; Points limites en expérimentation animale ; Règle des 3R et alternatives à l'expérimentation animale ; Fonctionnement d'une animalerie conventionnelle et d'une animalerie EOPS.

Les enseignements pratiques sont composés de 3 séances de 3 heures de Travaux Pratiques (TPs), durant lesquelles les étudiants seront initiés à la démarche expérimentale d'une équipe de recherche locale. Les gestes suivants seront réalisés sur les animaux : préhension, contention et évaluation du comportement sensori-moteur (locomotion, équilibre) chez l'animal vigile. Aucun geste invasif ne sera pratiqué sur les animaux.

Ces TPs seront réalisés en conformité avec les exigences de la règle des 3R :

- Remplacer : L'initiation à l'expérimentation animale et la formation aux bons gestes techniques ne peut pas être réalisée autrement que sur l'animal.

- Réduire : Le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum. Celui-ci a été déterminé de manière à permettre à chaque étudiant de se familiariser avec les différents gestes expérimentaux et à limiter le nombre de manipulations réalisées sur chaque animal.

- Raffiner : Pendant toute la période précédant la mise en œuvre du projet, les animaux seront hébergés selon les conditions d'hébergement, d'enrichissement et de surveillance quotidienne définies par la Structure Chargée du Bien-Être Animal (SCBEA) de l'Établissement. Le projet sera réalisé à partir d'animaux issus d'élevages et destinés à l'euthanasie (animaux surnuméraires : sexe et génotype en inadéquation avec les projets de recherche en cours, animaux reproducteurs trop âgés). Par ailleurs, toutes les procédures de ce projet sont de classe légère (gestes non invasifs). Enfin, la réalisation des gestes techniques sur les animaux sera précédée de démonstrations réalisées par les encadrants et d'entraînement préalables sur des mannequins en silicone.

Les animaux utilisés dans ce projet sont des animaux surnuméraires issus d'un élevage réalisé dans le cadre d'un projet expérimental. Chaque année, un maximum de 22 rats sera utilisé (soit au total 110 animaux sur une durée de 5 ans).

19086 Nous nous intéressons à la dystrophie musculaire oculopharyngée (OPMD) qui est une maladie génétique due à une mutation dans le gène PABPN1. Alors que cette protéine est présente dans tous les tissus du corps, seuls quelques muscles très particuliers sont atteints chez les patients OPMD sans que l'on sache encore aujourd'hui pourquoi. Dans ce contexte, nous nous intéressons à étudier les mécanismes physio-pathologiques aboutissant à la maladie. Nous étudions la régénération musculaire pour comprendre comment elle se déroule et comment elle peut être perturbée dans l'OPMD et nous analysons les effets de l'activité physique sur les muscles dans le but de vérifier si l'exercice peut avoir un effet bénéfique sur le muscle.

La régénération musculaire c'est le processus par lequel le muscle est capable de récupérer sa fonctionnalité après un dommage ou blessure. Ce processus est géré par une population de cellules souches, appelées cellules satellites. Dans le muscle normal, les cellules satellites sont en état de quiescence, mais suite à un dommage musculaire elles sont capables de s'activer, de proliférer et de se différencier, et finalement, de former de nouvelles fibres musculaires. Cependant, peu de choses sont vraiment connues lors de la régénération d'un muscle OPMD in vivo. Une première partie de ce projet consiste à étudier la régénération in vivo d'un muscle de souris OPMD en la comparant à la régénération d'une souris contrôle. Pour cela, le muscle Tibialis Anterior (TA) de la souris sont injectés avec de la notexine, une substance capable de déclencher la régénération dans le muscle et après l'injection les muscles sont prélevés et analysés. Dans une deuxième partie du projet, afin d'étudier les effets de l'exercice physique sur les muscles dystrophiques de souris OPMD, les souris sont soumises à des conditions d'exercice. Les muscles sont ensuite prélevés et analysés.

Au total, 180 souris seront utilisées. La régénération musculaire et l'exercice physique sont des processus qui peuvent être investigués exclusivement in vivo et pour les quelles un remplacement in vitro n'est pas encore possible. Pour la réduction, nous utiliserons le nombre minimum de souris nécessaire pour avoir des différences statistiquement significatives entre les groupes de souris. Egalement, afin de réduire le nombre de souris utilisées dans le respect de la règle des 3R, pour chaque souris dans les études de régénération musculaire, les deux TA gauche et droite seront injectés. Les souris sont anesthésiées lors de l'injection. Pour le raffinement, le milieu dans lequel

les souris sont élevées est enrichi et suite au réveil, les animaux seront surveillés quotidiennement pendant toute la durée de l'expérience afin de détecter des signes de douleur.

19087 La neuroradiologie interventionnelle (NRI) est une spécialité médicale qui vise à soigner des maladies localisées au niveau du cerveau et de la colonne vertébrale, par des méthodes moins invasives que la chirurgie sous contrôle d'une imagerie utilisant les rayons X (radioscopie). Des techniques ont été développées pour permettre de soigner notamment des maladies vasculaires graves en évitant la chirurgie, ainsi que des pathologies au niveau de la colonne vertébrale en limitant au maximum les risques compte tenu de la proximité de la moelle épinière et des vaisseaux sanguins. Ce projet a pour objectif d'encadrer la formation des nouveaux médecins sur les trois principaux types de pathologies rencontrés dans cette spécialité.

La première pathologie rencontrée sont les anévrismes. Ce sont des dilatations anormales dans la paroi d'une artère, ce qui peut être très risqué car elles peuvent présenter des risques importants de fuite, voire de rupture. Les conséquences peuvent alors être dramatiques, notamment au niveau du cerveau, allant jusqu'à la mort de l'individu. Pour traiter les anévrismes en NRI, un long tube est introduit dans l'artère fémorale au niveau de l'aîne pour être remonté dans les vaisseaux sanguins jusqu'à atteindre la zone de l'anévrisme au niveau des artères du cerveau. Des dispositifs ont été spécialement développés soit pour être insérés dans l'anévrisme dans le but de le boucher (petit ressort spiralé ou coil), soit pour reconduire le sang en dehors de l'anévrisme à l'aide d'un ressort du diamètre de l'artère.

Pour la formation, des anévrismes seront recréés de manière chirurgicale sur l'animal. Les médecins en formation auront ensuite à traiter les anévrismes comme décrit ci-dessus sous la direction du formateur.

D'autres pathologies couramment rencontrées sont les malformations dites artérioveineuses, qui peuvent amener à une communication anormale entre artères et veines. Pour les traiter, on introduit un long tube de manière similaire à la technique pour les anévrismes afin de remonter au niveau de la zone à traiter. Dans ce cas, des colles médicales spécialement adaptées ont été mises au point pour boucher ces communications par leur injection.

Dans l'animal utilisé pour ce projet, le porc, il existe une structure anatomique qui reproduit bien ce que serait une malformation artérioveineuse chez l'humain. Les médecins vont apprendre à se former à cette technique en bouchant des vaisseaux sanguins de cette structure en se servant des techniques utilisées chez l'humain.

Le troisième aspect sur lequel est focalisé ce projet concerne des pathologies qui vont entraîner des dommages au niveau des vertèbres, pouvant être à l'origine de douleurs importantes chez le patient. La vertébroplastie consiste en l'insertion de grosses aiguilles au niveau de la ou des vertèbres, sous contrôle radioscopique sans endommager la moelle épinière et les structures environnantes. Elles permettront l'injection d'un ciment médical dans la ou les vertèbres touchées, qui va la ou les consolider et soulager le patient.

La technique sera pratiquée par les médecins sur les vertèbres de l'animal, en respectant la même procédure que celle appliquée chez l'humain. Plusieurs vertèbres pourront être traitées pendant la formation, permettant de réduire le nombre d'animaux à utiliser.

Les techniques décrites ci-dessus sont des techniques de pointe, qui nécessitent un apprentissage important et de l'expérience pour être réalisées en toute sécurité sur le patient. Des modèles existent pour maîtriser certaines de ces techniques, comme des reproductions en silicone, pour la navigation dans les vaisseaux sanguins. Cependant ces modèles restent assez éloignés de la réalité que ce soit au niveau des sensations ressenties par le médecin, ou des conditions rigoureuses de travail attendues dans un bloc opératoire (hygiène, sécurité du patient, utilisation du matériel). L'utilisation de modèles animaux reste aujourd'hui la seule façon de former au mieux les neuroradiologues à ces techniques pour assurer la meilleure prise en charge possible du patient.

Dans cette formation, le modèle animal choisi a été le porc au vu de sa proximité anatomique avec l'humain par la taille de l'animal en général ainsi que par la taille de ses vaisseaux et des vertèbres. Un animal permet la formation de 6 étudiants à une technique. Au total avec 9 animaux, il est

possible de former 18 médecins par an aux différentes techniques. Des sessions supplémentaires de formation pourront être incluses dans cette autorisation dans une limite de 90 animaux sur les 5 ans.

Les animaux seront suivis et pris en charge par des personnes formées et compétentes sur le modèle animal décrit. Ils seront anesthésiés tout au long de chaque procédure. Leur anesthésie sera suivie rigoureusement et ajustée en fonction du suivi des paramètres vitaux de l'animal, pour permettre une prise en charge rapide et éviter toute douleur à l'animal. Au vu des conséquences que pourraient entraîner les manipulations faites durant la formation, les animaux ne seront pas réveillés.

19088 Les maladies neurodégénératives comme la maladie de Huntington (MH) sont une préoccupation croissante en santé publique. Malgré d'importants efforts de recherche, il n'existe encore aujourd'hui aucun traitement capable de combattre de façon efficace la progression de ce type de maladies.

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

Nous avons déjà la preuve de concept de notre stratégie dans des modèles murins pour la maladie de Huntington : l'enzyme clé du métabolisme cérébrale du cholestérol à l'aide d'un vecteur (de type AAV) dans les régions précocement atteintes par la pathologie chez des souris modèle permet de corriger les anomalies neuropathologiques et comportementales chez la souris modèle.

Le but principal de cette étude est d'investiguer quelles sont les conséquences générales, de la surexpression du CYP46A1 (le gène thérapeutique) et la restauration de la voie de synthèse du cholestérol dans la région cible du cerveau (striatum), sur le métabolisme cellulaire des souris du modèle murin pour la MH. Pour répondre à cette question différents biomarqueurs du métabolisme présents dans les tissus et dans le sang seront analysés. A la fin de l'étude les souris seront euthanasiées.

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

Réduction: Le nombre d'animaux utilisés est optimisé pour obtenir des résultats statistiques. Leur nombre (110) a été restreint au minimum indispensable de façon à obtenir des données nécessaires pour valider l'efficacité d'une stratégie thérapeutique innovante qui peut être considérée comme cible dans plusieurs maladies neurodégénératives. En effet, des travaux précédents ont permis d'établir les doses de vecteur à injecter et les temps d'analyses.

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

19089 Le lupus érythémateux disséminé (LED) est une maladie auto-immune chronique caractérisée par la production d'auto-anticorps et la dégradation de certains organes / tissus (peau, rein, cerveau). Une meilleure compréhension de la pathogenèse du LED humain est absolument nécessaire car les traitements restent inefficaces, et seul un traitement ciblé a été approuvé pour le LED au cours des 50 dernières années avec une efficacité thérapeutique faible. Chez l'homme, le syndrome

lymphoprolifératif autoimmun (ALPS) de type Ia présente des similitudes cliniques avec le LED ; l'ALPS type Ia est dû à une mutation dans le gène de la molécule Fas ce qui conduit à une perte de fonction de Fas. La souche de souris de laboratoire appelée Lpr, qui a une mutation spontanée dans le gène de Fas conduisant à sa déficience, développe un LED.

CD95 (communément appelé Fas) est un récepteur exprimé à la surface de très nombreuses cellules de l'organisme. Lorsque Fas est activé par son ligand naturel, il provoque la mort par apoptose des cellules qui le portent. Le ligand naturel de CD95 est appelé CD95L ; il est exprimé principalement à la surface de cellules immunitaires comme les lymphocytes T et les cellules NK pour éliminer les cellules cibles cancéreuses ou infectées. CD95L peut également être coupé par des enzymes pour libérer un ligand soluble qui n'induit pas de signaux de mort mais, au contraire, est capable d'induire des signaux cellulaires de prolifération ou d'inflammation. Chez les patients atteints de LED, il a été établi que la forme soluble de CD95L favorise l'arrivée des cellules inflammatoires dans les organes enflammés. D'autres données montrent que le récepteur CD95, indépendamment de son ligand CD95L, est capable de bloquer le signal inflammatoire. Ainsi, CD95 et CD95L induisent différents signaux antagonistes conduisant à la mort ou à la prolifération, pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires, ce qui rend délicat l'identification du rôle de chacun dans l'étiologie lupique.

CD95 est exprimé par les lymphocytes B, les cellules à l'origine de la production des anticorps qui sont des "armes moléculaires" qui reconnaissent spécifiquement une cible et entraînent son élimination. La production des anticorps est très contrôlée ; elle nécessite plusieurs phases : une phase de prolifération active des lymphocytes B, une phase de vérification de la qualité des cellules produites et une phase de sélection des cellules « correctes » et d'élimination par apoptose des cellules « incorrectes » qui produisent des anticorps potentiellement dangereux pour l'organisme pouvant être, par exemple, à l'origine de maladies auto-immunes. Les cellules « correctes » mûrissent alors en véritables usines de production d'anticorps. Si le rôle apoptotique de CD95 est avéré dans la phase d'élimination des cellules « incorrectes », divers arguments pointent également pour un rôle non apoptotique favorisant la maturation en cellules « usines d'anticorps ». Nous émettons l'hypothèse qu'une déficience de CD95 au niveau des lymphocytes B contribue au LED non seulement en empêchant la mort des lymphocytes B "incorrects" mais également en favorisant la phase de maturation, par un mécanisme indépendant de l'activité apoptotique de CD95.

Notre projet vise à établir 1) le rôle de CD95 dans la maturation des lymphocytes B dans un modèle murin Lpr où la déficience de CD95 est restreinte à la population des lymphocytes B et 2) le rôle de CD95 exprimé par les lymphocytes B dans le développement du LED. Le modèle murin sera établi en croisant des souris Lpr (déficience de CD95 sur toutes les cellules) avec des souris génétiquement modifiées au niveau des lymphocytes B. Les souris issues de ces croisements auront une déficience de CD95 uniquement au niveau des lymphocytes B. Les souris déficientes en CD95 dans les lymphocytes B et les souris contrôles sans déficience seront traitées avec différents antigènes pour provoquer la maturation des lymphocytes B. Différentes techniques d'analyses cellulaires et moléculaires permettront d'apprécier le degré de maturation des lymphocytes B. De plus, les signes cliniques du LED seront évalués à partir de prélèvement de sang et par analyse des reins prélevés en post-mortem. Les prélèvements seront réalisés entre 7 jours et 21 semaines post traitement antigénique de façon à évaluer la maturation à court terme et à long terme (mémoire) des lymphocytes B, et les conséquences sur les signes du LED.

Le projet durera 5 ans et sera réalisé en utilisant au total 475 souris.

Le projet expérimental répond aux exigences des 3R :

Remplacer : La maturation des lymphocytes B nécessite l'interaction de la cellule avec son environnement dans les organes lymphoïdes dits secondaires comme la rate et ne peut pas être reproduit dans des modèles in vitro.

Réduire : Les croisements de souris, les traitements avec des antigènes et les analyses cellulaires et moléculaires des lymphocytes B sont maîtrisés par l'équipe, ce qui permet de limiter le nombre d'animaux utilisés.

Raffiner : Les animaux seront élevés dans des conditions d'hébergement qui respectent leur bien-être. Le soin de base et les élevages seront réalisés par le personnel de l'animalerie qui est qualifié et expérimenté. Les différents gestes techniques liés au projet (préhension, contention, injection intrapéritonéale, prélèvement de sang au sinus maxillaire) sont des procédures de classe légère et seront réalisés par des expérimentateurs qualifiés selon des procédures établies qui respectent le bien-être animal. L'état général des animaux sera observé quotidiennement pour repérer tout signe anormal et agir en conséquence.

19090 La surdité congénitale d'origine génétique touche 1 enfant sur 1000 en France. Plus de 150 gènes ont été impliqués dans des surdités héréditaires à ce jour, mais de nombreuses causes de surdité génétique restent encore non caractérisées.

Dans certaines formes de surdité syndromique, des anomalies de pigmentation sont aussi rapportées et les deux altérations sont expliquées par un développement anormal des cellules pigmentaires de la peau, et de cellules pigmentaires de l'oreille interne (les deux ayant la même origine embryologique). L'étude des anomalies du développement de ces cellules ne peut être réalisée in vitro car elle nécessite des interactions entre différentes structures embryonnaires qui permettent d'aboutir à un organe très complexe. C'est pourquoi le recours à l'utilisation d'un modèle animal est indispensable pour comprendre comment les mutations au sein de gènes d'intérêts impactent le développement et la fonction de ces structures, dont certaines sont spécifiques aux vertébrés.

La souris et le poisson zèbre sont deux modèles de choix, complémentaires, pour ce projet. Le but est de mieux comprendre l'origine des défauts observés chez les patients pour, in fine, appliquer les résultats au diagnostic génétique de ces maladies, et mieux comprendre les mécanismes de la fonction auditive. La souris permet la réalisation de tests auditifs et l'étude de la structure d'une oreille interne très proche de celle de l'homme ; seuls des modèles murins déjà existants sont nécessaires à ce projet. Le poisson zèbre peut rapidement être sujet à l'édition du génome (« création » de lignées portant les mutations similaires à celles des patients) ; de plus, la pigmentation et le développement de l'oreille interne y sont très facilement analysables par simple observation. Les fonctions auditives peuvent également être testées aisément par des moyens non invasifs à des stades plus tardifs. Ces résultats devront s'interpréter en sachant que la vésicule otique du poisson, au contraire de l'homme et de la souris, ne contient pas de cellules pigmentaires. Les similitudes et différences du système auditif des mammifères et du poisson zèbre sont bien connues, de ce fait l'information est transposable d'une espèce à l'autre et les limites de cette transposition sont largement identifiées.

Au total, un maximum de 360 souris mutantes (embryons à partir de E14, nouveau-nés ou animaux plus âgés) seront générées à l'aide des croisements adéquats. Les souris seront maintenues dans des cages contenant des enrichissements (nids, maisons. . .). Pour limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux, une surveillance journalière sera mise en place et des points limites ont été établis. En parallèle, 1500 poissons seront nécessaires pour générer et analyser les lignées d'intérêt. Les poissons seront maintenus dans des bacs avec enrichissements, surveillés selon des critères établis et euthanasiés si ces critères sont atteints. La réalisation in vitro d'études préliminaires complémentaires aux modèles murins et poisson nous permettront de réduire le nombre d'animaux utilisés selon la règle des 3R (Réduire au maximum le nombre d'animaux : seules les expériences nécessaires pour arriver à une conclusion scientifique ont été considérées et elles seront interrompues dès l'obtention d'une différence significative ; Raffiner la méthodologie : les animaux seront maintenues dans des cages contenant des enrichissements, une surveillance journalière sera mise en place et des points limites ont été établis afin de limiter la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux ; Remplacer l'expérimentation animale lorsque c'est possible : l'utilisation de modèles complémentaires aux modèles animaux proposés sont et seront considérés à chaque fois que possible pour réduire le nombre d'animaux).

Ce projet permettra sur une période de 5 ans de déterminer de nouveaux mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine de cette forme syndromique de surdité. A terme, ces études permettront d'améliorer le diagnostic et la prise en charge des patients.

19091 Les épilepsies sont les maladies neurologiques les plus fréquentes avec les migraines et concernent plus de 500. 000 personnes en France et 60 millions dans le monde. Près de 30% des patients résistent aux traitements pharmacologiques actuellement disponibles et, chez ces personnes, la chirurgie de résection est le seul traitement curatif efficace. Il n'est cependant possible que dans un nombre de cas très limité. Cette approche chirurgicale très invasive n'est pas sans risque et est de moins en moins tolérée par les patients. Il est donc important de développer des solutions thérapeutiques alternatives qui ne demandent pas de craniotomie. Pour cela, l'irradiation fractionnée spatialement de Rayon-X est un traitement développé depuis plus de 10 ans en vue de traiter des pathologies neurologiques et des tumeurs cérébrales. Ce traitement non invasif pourrait être proposé comme alternative très performante pour des pathologies qui nécessitent une chirurgie de résection. Le but de ce projet est donc de développer un traitement focalisé du foyer épileptique par irradiation fractionnée spatialement dans un modèle d'épilepsie chez le rat. Ce modèle permet de représenter chez l'animal de façon chronique un type particulier d'épilepsie (épilepsie mésio-temporale) qui est un réel enjeu en thérapeutique clinique (risque accru de mort subite, comorbidités cognitives et émotionnelles, pharmaco-résistance). Ce projet permettra de développer dans ce modèle validé un protocole optimal d'irradiation fractionnée spatialement visant une suppression des crises focales chez plus de 70% des animaux, avec des effets secondaires limités, que ce soit au niveau comportemental ou histologique. Ces données seront utilisées par la suite pour un transfert de cette approche méthodologique vers la clinique.

Le projet global est composé de sept procédures expérimentales dont 6 seront réalisées dans un établissement de recherche en neurosciences et une sur une plateforme permettant l'irradiation par un faisceau X fractionné spatialement. Seule la procédure d'irradiation est décrite dans cette demande, les 6 autres ayant déjà fait l'objet d'une autre demande approuvée le 1er mars 2021 par le Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (Annexe 2).

Raffiner : Nous veillerons à suivre les animaux quotidiennement de façon à intervenir immédiatement dès qu'un signe évocateur de douleur serait observé. Pour réduire toute douleur, souffrance ou anxiété, ils seront anesthésiés et analgésiés de façon profonde durant toutes les interventions (chirurgie, IRM, irradiation) et les techniques d'imagerie que nous utiliserons dans nos procédures sont sans douleur pour l'animal et permettent de répéter les acquisitions chez le même animal. Les animaux seront maintenus avec de la nourriture et de la boisson à volonté, ainsi que des objets en carton et du coton. Ils seront habitués à la manipulation par des expérimentateurs agréés. A la fin des expériences, les animaux seront euthanasiés par surdosage de pentobarbital.

Remplacer : L'utilisation de l'animal dans son intégrité est nécessaire pour répondre à notre question. Il n'existe aucun modèle cellulaire qui permette de mettre en évidence un foyer épileptique dans le cerveau ni de le traiter par irradiation et l'utilisation d'irradiation fractionnée spatialement n'est pas encore possible chez l'homme. Le développement d'une stratégie thérapeutique telle qu'envisagée dans cette étude nécessite d'avoir recours à un modèle animal dans lequel le développement d'un foyer épileptogène a été clairement caractérisé et mis en évidence. Dans cette étude, le rat sera utilisé car sa taille permet l'application de la technique d'irradiation fractionnée spatialement, contrairement à des espèces plus petites (souris).

Réduire : Le nombre d'animaux a été réduit au maximum tout en permettant une exploitation statistique rigoureuse des résultats. Pour cela, en fonction de l'expérience acquise en modélisation animale des épilepsies, nous estimons que 396 animaux au total seront utilisés pendant 5 ans dans les quatre séries d'expériences de ce projet.

Ce projet a pour objectif final de traiter de façon non invasive la zone épileptogène (ZE) chez des patients atteints d'épilepsie focale pharmaco-résistante. Les techniques non-invasives (radiothérapie par gamma-knife ou ultrasons) actuellement utilisées ne sont pas plus efficaces que la chirurgie invasive et présentent des effets secondaires et un risque pour les tissus adjacents en raison de leur manque de précision. L'irradiation fractionnée spatialement est une méthode non invasive très précise et peu toxique qui, une fois évaluée et validée pour traiter un foyer épileptique chez l'homme, pourrait permettre d'éviter une chirurgie invasive, de réduire les risques associés à

une telle chirurgie et de limiter à 1-2 jours la durée d'hospitalisation (au lieu de 10-15 jours pour une chirurgie).

19092 Le projet de recherche a pour objectif de comprendre les mécanismes de formation du cœur, et la mise en place de l'architecture de la pompe cardiaque. Le muscle cardiaque, ou myocarde, est le tissu principal du cœur. Sa taille et son architecture orientée déterminent la contraction efficace du cœur. La disposition relative des chambres cardiaques est essentielle à la mise en place de la double circulation sanguine. Par l'étude de modèles murins déficients pour des voies de signalisation, nous voulons mettre en évidence les mécanismes de croissance du myocarde et de positionnement des chambres cardiaques.

Nous produirons des embryons de souris génétiquement modifiées, afin d'étudier la fonction de certains gènes dans la formation et malformation du cœur. Pour compenser l'effet de la mutation génétique et démontrer les hypothèses moléculaires, nous aurons recours à l'injection de composants pharmacologiques. Ce projet de recherche fondamentale sur la formation du cœur a des retombées pour la compréhension des malformations cardiaques, qui affectent 1% des naissances et dont l'origine est inconnue dans 80% des cas.

Le projet, prévu sur une durée de 5 ans, aura recours à 64 souris adultes, femelles gestantes, subissant une injection de classe légère.

Remplacement : nous utilisons différentes approches pour analyser les mécanismes des malformations cardiaques, incluant la modélisation informatique (*in silico*) et les cultures cellulaires (*in vitro*). En général, les expériences de remplacement ne peuvent pas reproduire la complexité des mécanismes mis en jeu au cours du développement embryonnaire, comme la forme tridimensionnelle du cœur, l'intégration d'une multitude de signaux et d'interactions cellulaires. C'est pourquoi nous aurons aussi recours au modèle animal, en choisissant la souris comme modèle classique de mammifère, avec un cœur à 4 cavités comme chez l'homme, et comme modèle expérimental établi, avec de nombreux outils génétiques disponibles, un temps de génération court et des portées de grande taille.

Réduction : le nombre d'animaux est calculé sur la base d'un plan expérimental stéréotypé permettant d'obtenir la puissance statistique nécessaire à l'obtention de conclusions biologiquement pertinentes.

Raffinement : les animaux seront élevés en cages enrichies et surveillés au cours des procédures pour repérer l'éventuelle apparition de signes cliniques pouvant indiquer une souffrance ou un mal-être. En cas d'apparition de signes cliniques, ou à la fin de la procédure, les animaux sont euthanasiés.

19093 La Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) est une maladie inflammatoire complexe entraînant une diminution progressive et irréversible des capacités respiratoires. On estime que la BPCO atteint 3,5 millions de personnes en France, soit 7,5% de la population. La maladie est plus fréquente chez les fumeurs, le tabac étant le principal facteur de risque. La BPCO est également un facteur de risque de développement de cancer pulmonaire et un facteur de mauvais pronostic. En effet, les patients atteints de BPCO ont entre 3 et 5 fois plus de risque, selon leur historique de tabagisme, de développer un cancer du poumon. Il existe également des indices suggérant que la BPCO augmente la dissémination métastatique des cancers pulmonaires.

L'objectif de cette étude est de mettre au point chez la souris un modèle mimant l'augmentation d'incidence de cancers du poumon lors de la BPCO afin de pouvoir étudier les mécanismes biologiques impliqués. Dans un premier temps, la croissance tumorale sera étudiée chez des souris sans BPCO afin de déterminer les meilleures conditions expérimentales. Dans un second temps, un cancer pulmonaire sera généré chez des souris atteintes de BPCO afin de mimer l'augmentation de tumeur du poumon retrouvée chez les patients atteints de BPCO.

Les avantages du projet seront d'obtenir un nouveau modèle animal ouvrant la voie à l'étude détaillée des cellules du système immunitaire dans les cancers du poumon associés à la BPCO. Les effets indésirables attendus sont les suivants: les animaux pourront présenter une légère

augmentation de stress dû à l'anesthésie et aux procédures expérimentales. De plus, au cours de l'établissement de la BPCO et de la croissance des tumeurs pulmonaires, les animaux pourraient présenter des difficultés respiratoires. La durée escomptée du projet est de 2 ans.

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

« Remplacer » les modèles animaux : Il n'existe pas de modèle non animal permettant de reproduire les mécanismes biologiques complexes à l'œuvre au cours à la fois de la croissance tumorale, de la BPCO et de la réponse immunitaire associée. Notre projet nécessite donc l'utilisation d'un modèle animal.

« Réduire » le nombre d'animaux en expérimentation : Pour nos expérimentations, nous avons utilisé une analyse statistique a priori afin de prévoir le nombre nécessaire et suffisant d'animaux (54 animaux) pour conclure sur les résultats scientifiques.

« Raffiner » la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites : Les animaux feront l'objet d'une surveillance rapprochée afin de détecter les points limites préalablement établis et d'éviter tout stress et souffrance. Avant la procédure expérimentale, les souris seront anesthésiées afin d'éliminer la souffrance potentielle due à la procédure. À la fin de l'expérimentation les souris seront mises à mort par exsanguination. De la naissance à la mort, les animaux seront hébergés dans des conditions optimales incluant un enrichissement.

19094 Le récepteur principal des cannabinoïdes a un rôle critique dans la communication entre les neurones. Ceci est la raison du fort potentiel des traitements à base de cannabinoïdes qui sont à l'heure actuelle en phase d'essai clinique. Il demeure cependant un manque dans la compréhension de l'action de ces molécules à l'échelle de tout le cerveau. En effet, l'un des problèmes majeurs demeure la rapide habitude aux cannabinoïdes qui induit une tolérance chez les consommateurs chroniques. Le cerveau est organisé en réseau, avec une connectivité fonctionnelle propre, susceptible d'être modifiée par des états pathologiques ou des drogues. L'étude de ces réseaux se fait par imagerie fonctionnelle en mesurant les modifications du flux sanguin entre différentes zones cérébrales. L'objectif de ce projet est donc d'évaluer si la connectivité fonctionnelle des réseaux neuronaux est modifiée par les cannabinoïdes en absence ou présence de tolérance. Nous utiliserons une technique d'imagerie par échographie ultrarapide, qui permet l'étude de la connectivité fonctionnelle chez la souris éveillée. Le nombre total d'animaux nécessaire à la réalisation de ce projet est de 284 pour une durée de 5 ans.

Ce projet sera réalisé dans le respect de la règle des 3Rs et met en jeu des procédures chirurgicales, une technique d'imagerie du flux sanguin cérébral basée sur des ultrasons et des tests de comportement.

Remplacement : A l'heure actuelle, il n'existe pas de méthode de remplacement permettant de reproduire la complexité du cerveau, ce qui rend l'utilisation d'un modèle animal indispensable à la réalisation de ce projet. L'analyse de la connectivité sur animal éveillé n'a été mise au point à ce jour que chez la souris.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est le minimum nécessaire permettant une analyse statistique robuste des résultats grâce aux données collectées au cours d'expériences précédentes.

Raffinement : Pour éviter toute souffrance, les procédures de chirurgie se feront sous analgésie et anesthésie générale. Les séances d'imagerie seront réalisées sur animal vigile dont la tête sera immobilisée mais dont le mouvement des pattes ne sera pas entravé ; des séances d'habitude seront effectuées au préalable. Les souris seront observées quotidiennement et tout signe de douleur, souffrance, angoisse ou stress sera soulagé avec des analgésiques. Une grille précise d'évaluation des points limites sera utilisée conduisant à une mise à mort anticipée si nécessaire.

A terme, ce projet permettra démontrer si les cannabinoïdes causent une modification de la connectivité fonctionnelle et ainsi accélérer le développement de nouvelles thérapies plus efficaces pour des pathologies comme les épilepsies, la douleur chronique ou la sclérose en plaque.

19095 La Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) est une maladie inflammatoire complexe entraînant une diminution progressive et irréversible des capacités respiratoires. On estime que la BPCO atteint 3,5 millions de personnes en France, soit 7,5% de la population. La maladie est plus fréquente chez les fumeurs, le tabac étant le principal facteur de risque. La BPCO est également un facteur de risque de développement de cancer pulmonaire et un facteur de mauvais pronostic. En effet, les patients atteints de BPCO ont entre 3 et 5 fois plus de risque, selon leur historique de tabagisme, de développer un cancer du poumon. Il existe également des indices suggérant que la BPCO augmente la dissémination métastatique des cancers pulmonaires.

L'objectif de cette étude est de mettre au point chez la souris un modèle mimant l'augmentation d'incidence de cancers du poumon lors de la BPCO afin de pouvoir étudier les mécanismes biologiques impliqués. Dans un premier temps, la croissance tumorale sera étudiée chez des souris sans BPCO afin de déterminer les meilleures conditions expérimentales. Dans un second temps, un cancer pulmonaire sera généré chez des souris atteintes de BPCO afin de mimer l'augmentation de tumeur du poumon retrouvée chez les patients atteints de BPCO.

Les avantages du projet seront d'obtenir un nouveau modèle animal ouvrant la voie à l'étude détaillée des cellules du système immunitaire dans les cancers du poumon associé à la BPCO. Les effets indésirables attendus sont les suivants: les animaux pourront présenter une légère augmentation de stress dû à l'anesthésie et aux procédures expérimentales. De plus, au cours de l'établissement de la BPCO et de la croissance des tumeurs pulmonaires, les animaux pourraient présenter des difficultés respiratoires. La durée escomptée du projet est de 2 ans.

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

« Remplacer » les modèles animaux : Il n'existe pas de modèle non animal permettant de reproduire les mécanismes biologiques complexes à l'œuvre au cours à la fois de la croissance tumorale, de la BPCO et de la réponse immunitaire associée. Notre projet nécessite donc l'utilisation d'un modèle animal.

« Réduire » le nombre d'animaux en expérimentation : Pour nos expérimentations, nous avons utilisé une analyse statistique a priori afin de prévoir le nombre nécessaire et suffisant d'animaux (54 animaux) pour conclure sur les résultats scientifiques.

« Raffiner » la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites : Les animaux feront l'objet d'une surveillance rapprochée afin de détecter les points limites préalablement établis et d'éviter tout stress et souffrance. Avant la procédure expérimentale, les souris seront anesthésiées afin d'éliminer la souffrance potentielle due à la procédure. À la fin de l'expérimentation les souris seront mises à mort par exsanguination. De la naissance à la mort, les animaux seront hébergés dans des conditions optimales incluant un enrichissement.

19096 Les maladies psychiatriques comme la dépression ou les troubles de la personnalité touchent une partie de plus en plus importante de la population. Malgré son origine multifactorielle, l'environnement joue un rôle majeur dans le développement, le déclenchement et/ou l'évolution de ces troubles. Ainsi, les événements dits traumatiques pendant l'enfance font très souvent partie de l'histoire clinique des patients psychiatriques. Par contre, les effets 'protecteurs' de l'environnement familial n'ont jamais été étudiés. Dans ce projet, nous cherchons à évaluer, chez la souris, comment la modification du niveau de soins maternels pendant la période précoce de la vie post-natale influence la susceptibilité au stress à l'âge adulte. Pour aborder cette problématique et comprendre les changements moléculaires et des connexions neuronales induits par l'environnement social, nous allons étudier 3 groupes de souris exposés à des niveaux de soins différents pendant les 14 premiers jours après la naissance. À l'âge adulte, ces souris seront soumises à un stress social intense (défaite sociale) ou à un protocole de stress non-prévisible. Les conséquences comportementales et moléculaires seront ensuite comparées. Ces connaissances seront d'une grande utilité pour approfondir nos connaissances sur l'origine des maladies psychiatriques.

REMPACER

Ce type d'étude nécessite un modèle animal puisque les méthodes de remplacement (e. g. culture cellulaire) ne permettent pas d'évaluer les fonctions cérébrales supérieures (donc inutilisables chez

l'humain). D'une manière générale les modèles rongeurs sont nécessaires en neurosciences intégratives pour des raisons de proximité de comportements basiques avec l'Homme ainsi que par les aspects logistiques (reproduction, petite taille, transgénèse).

REDUIRE

Nous allons limiter au maximum le nombre d'individus à utiliser pour ce projet. Le fait d'utiliser un modèle physiologique (facteurs environnementaux) évitera la génération de nouvelles souches transgéniques présentant des anomalies/handicaps. Nos données préalables nous ont également permis un calcul approximatif de la taille de la cohorte optimale pour ces expériences permettant de limiter le nombre d'animaux sans diminuer pour autant la puissance de nos analyses. Le nombre total d'animaux à utiliser dans ce projet est estimé à 411 souris.

RAFFINER

De nombreuses mesures seront prises pour éviter toute sorte de souffrance et respecter le bien-être des animaux. Les prémédication, anesthésie, analgésie, suivi et soins post-opératoires se feront systématiquement selon des procédures validées par le vétérinaire. Pour les chirurgies, nous utiliserons une anesthésie locale aux points d'ouverture de la peau en plus d'une anesthésie générale. Une échelle de bien être permettra d'évaluer et pallier une éventuelle souffrance chez un animal.

19097 Les néoplasmes myéloprolifératifs (NMP) sont des maladies chroniques qui sont caractérisées par une augmentation de cellules matures dans le sang. Ce sont les maladies myéloïdes hématologiques les plus prévalentes (0,3-0,5/1.000 en Europe), leur fréquence augmente avec l'âge. Les NMP regroupent trois maladies : la polyglobulie de Vaquez (PV) caractérisée par une surproduction de globules rouges, la thrombocythémie essentielle (TE) qui présente un excès de plaquettes et la myélofibrose primaire, qui est la forme la plus sévère, caractérisée par une surproduction des lignées myéloïdes associée à la présence invalidante de fibres de collagène dans la moelle osseuse (Mo). Ces trois maladies forment un continuum de la TE vers la PV vers la myélofibrose dite secondaire, ou de la TE directement vers la myélofibrose. La myélofibrose s'accompagne de la relocalisation des cellules souches hématopoïétiques (CSH) responsables de la production de toutes les cellules du sang et normalement nichées dans la Mo vers la rate, qui devient le site d'une hématopoïèse extramédullaire résultant en l'augmentation de sa taille. Les patients peuvent présenter des complications hémorragiques et thrombotiques ainsi qu'à long terme, un risque majeur de transformation du NMP en leucémie. Ces maladies sont causées par l'acquisition de deux grands types de mutations dans les CSH de la Mo qui induisent, par des mécanismes différents, une sur-activation des signaux contrôlant la production des cellules myéloïdes du sang à partir des CSH.

Notre équipe a développé et caractérisé des modèles de souris exprimant ces deux types de mutations identifiées chez les patients. Ces souris développent des maladies mimant les NMP humains et leur évolution. Notre laboratoire a également identifié une amplification d'une région chromosomique transmise de façon héréditaire dans plusieurs familles originaires des Antilles qui prédispose au développement des NMP se transformant en leucémies.

Le premier objectif de notre travail est d'étudier à l'échelle de l'organisme, comment ces mutations affectent le compartiment des CSH afin d'identifier la sous-population de CSH initiatrice de la maladie pour pouvoir la cibler thérapeutiquement. L'utilisation d'animaux est primordiale dans cette étude pour évaluer l'effet du microenvironnement de la Mo sur la régulation des CSH mutées et réciproquement. De plus, nous souhaitons étudier les propriétés et le rôle des CSH qui quittent la Mo pour la rate dans l'aggravation en myélofibrose. Enfin, un des mutants responsables des NMP est sécrété dans le sang, ce qui pourrait avoir des effets sur des cellules voisines pouvant ainsi participer à la maladie.

Notre deuxième objectif vise à tester l'efficacité de nouveaux médicaments dans nos souris. Les deux types de mutations que nous étudions et avons modélisé chez la souris induisent des maladies différentes, que nous cherchons à mieux comprendre pour affiner des thérapies plus efficaces pour chacune. Les thérapies actuelles procurent un soulagement des symptômes chez les patients sans

parvenir à éliminer les CSH responsables des NMP, ce qui pose un réel problème de santé publique. Nous proposons de tester l'efficacité d'anticorps développés par notre partenaire industriel ciblant spécifiquement un de ces deux types de mutants. Nous comparerons également l'effet d'un inhibiteur d'une protéine de signalisation activée par les deux types de mutants. Enfin, notre équipe a récemment montré que la co-administration d'interféron alpha et d'arsenic à un de nos modèles de souris entraîne la diminution des cellules mutées initiatrices de la maladie, il nous reste encore à explorer le mécanisme de cette coopération. L'utilisation des animaux est incontournable car ces traitements consistent aussi à mobiliser le système immunitaire contre la maladie, ce qui est beaucoup trop complexe à reproduire in vitro, in silico ou par d'autres méthodes sans animaux. Il s'agit aussi d'analyser l'organisme dans sa globalité incluant les paramètres complexes du sang, de la Mo, la rate et le foie.

Enfin, il existe des prédispositions aux NMP dont celle décrite par notre équipe dans plusieurs familles originaires des Antilles avec une forte incidence de NMP/leucémies. Dans ces familles, le développement de la leucémie est associé à des mutations additionnelles dans d'autres gènes que ceux responsables des NMP. Pour ce troisième objectif, grâce à un modèle de souris modélisant cette prédisposition, nous cherchons à comprendre les mécanismes prédisposant aux NMP et à étudier la coopération entre cette prédisposition et les autres mutations identifiées chez ces familles.

Remplacement: L'utilisation d'animaux est incontournable car les mutations étudiées s'expriment dans les cellules souches hématopoïétiques (CSH) dont les propriétés d'auto-renouvellement (à la base de la résistance et de la dominance clonale de ces maladies) requièrent l'environnement médullaire impossible à reproduire in vitro. De plus, la progression de la maladie s'accompagne d'une mobilisation des CSH de la moelle osseuse vers la rate dont nous souhaitons caractériser le rôle afin de le contrer. Enfin, seuls les traitements des souris mimant les symptômes hématologiques des patients atteints de NMP permettront d'analyser leurs efficacités dans l'organisme dans sa globalité, incluant la réponse immunitaire contre les cellules mutées.

Réduction: Pour ce projet de 5 ans nous estimons à 2543 le nombre de souris nécessaires pour mener à bien nos projets. Il est difficile de générer des cohortes d'animaux identiques en élevage car la maladie évolue différemment d'une souris à l'autre avec l'âge. Pour contrer cela, nous utiliserons la greffe de cellules de moelle osseuse car la maladie est transplantable. Ce système nous permet de générer de façon synchrone et reproductible de nombreux animaux (jusqu'à 30/donneur) ayant une maladie au même stade d'évolution, ce qui augmente considérablement le pouvoir statistique de nos études. Le nombre d'animaux choisi pour chaque lot représente le minimum requis (réduction) pour constituer un échantillonnage statistiquement représentatif, en nous basant sur la littérature et nos expériences antérieures.

Raffinement: Toutes les interventions (greffes, prélèvements de sang) seront faites sous anesthésie générale. Une surveillance quotidienne sera effectuée pour s'assurer de leur santé physique et comportementale : du DietGel haute énergie sera ajouté dans les cages en cas de diminution de la prise alimentaire et les points limites strictement appliqués. Les animaux bénéficieront d'un environnement enrichi en tout temps (abri en carton, papier, coton, ...).

19098 L'analyse génomique a montré que le gène Bin1 ((Bridging Integrator-1) était un facteur de risque de la maladie d'Alzheimer. Les techniques de culture cellulaire utilisant des cellules cancéreuses neuronales ont permis de déterminer le rôle de Bin1 (Bridging Integrator-1) sur le développement de la maladie d'Alzheimer. Les études in vivo réalisées sur des drosophiles transgéniques surexprimant des isoformes de Tau (Tubulin-associated unit) et de Bin 1 (Bridging Integrator-1) ont montré que ces deux protéines interagissent. Chez l'humain atteint de la maladie d'Alzheimer, le premier marqueur que l'on peut suivre est l'Abeta 40 et l'Abeta 42. Aussi pour approfondir les résultats obtenus sur les drosophiles nous voulons développer un modèle de souris exprimant ces 2 protéines. Cette étude portera sur 1224 souris âgées de 6-7 mois et de 10-11 mois. Afin de respecter la règle des 3Rs nous travaillons sur les 2 sexes. Pour réduire le nombre, nous effectuons sur un hémisphère cérébral les analyses immunohistologiques et sur le second les extractions d'ARN et de protéines. Pour la réalisation de cette étude longitudinale et afin de réduire le stress et l'angoisse chez nos animaux, les procédures seront espacées de 3 à 7 jours selon la procédure

suivante à effectuer. Nous utiliserons des analgésiques chaque fois que cela s'avère nécessaire, notamment dans les procédures terminales afin d'éviter toute souffrance inutile aux animaux. Les animaux inclus dans ce projet sont observés régulièrement afin de vérifier l'absence de signes de souffrance (perte de poids, piloerection, dos rond, démarche anormale, pâleurs des extrémités, automutilation, isolement léthargie, vocalisation anormale,...). Conformément aux nouvelles directives, pour l'hébergement des animaux, nous avons mis dans toutes les cages des "maisons à souris" afin de limiter le stress. De plus afin de s'assurer du bien-être des animaux, leur état sanitaire est surveillé par des contrôles réguliers.

19099 La greffe de peau ou transplantation cutanée est l'utilisation d'un morceau de peau pour recouvrir une plaie, soit dans un but de cicatrisation par le tissu apporté, soit comme pansement. Suivant l'origine du greffon on parle de prélèvement autologue (fait sur le receveur lui-même) ou de prélèvement hétérologue (fait sur une autre personne que le receveur). La xénogreffe désigne la transplantation d'un greffon où le donneur est d'une espèce biologique différente de celle du receveur. Elle s'oppose ainsi à l'allogreffe où le greffon vient de la même espèce que le receveur.

Les substituts cutanés ou dermes artificiels, sont des biomatériaux capables de remplacer une partie de la peau et constituent une alternative précieuse pour la gestion des plaies lorsque les thérapies standards sont un échec. Cependant, sélectionner le bon substitut n'est pas une décision thérapeutique aisée. Aujourd'hui, si les greffes autologues sont les greffes de première intention pour la couverture des plaies, elles se heurtent à l'écueil d'une disponibilité limitée de peau, en particulier dans la prise en charge des grandes brûlures et les procédures restent invasives et douloureuses. Des allogreffes et des xénogreffes peuvent pourvoir au remplacement temporaire de la peau, avant de laisser la place à une autogreffe. Subsiste évidemment les risques de rejet, douleurs et infection, et la formation de cicatrices.

De nombreux substituts cutanés biosynthétiques sont aujourd'hui disponibles. Ils sont constitués de cellules humaines vivantes ensemencées sur une matrice et nourries de protéines et des facteurs de croissance nécessaires pour mieux se développer et se multiplier dans le tissu souhaité. Ils sont utilisés pour traiter les plaies chroniques qui ne cicatrisent pas et pour les greffes de tissus mous chez les patients présentant des brûlures à épaisseur partielle (épaisseur partielle) ou des plaies chirurgicales, les ulcères du pied diabétique, les ulcères veineux...

Il est donc important de tester de nouveaux substituts cutanés sur des modèles de plaies simples et chroniques représentatifs chez l'animal qui pourront être utilisés par la suite chez l'Homme et ainsi permettre d'améliorer la cicatrisation des plaies.

L'objectif de notre projet est donc d'évaluer différents substituts cutanés nouvellement développés afin de sélectionner celui ou ceux qui permettront de favoriser la régénération de tissu cutané sur un modèle de plaie murin.

Ce projet nécessitera l'utilisation d'un total de 300 souris mâles Swiss Nude de 20-22 g réparties en 15 groupes de 20 souris chacun, permettant de tester 15 substituts cutanés nouvellement développés. Nous utiliserons des souris Nude pour éviter les risques de rejet.

Les conditions expérimentales ont été définies lors d'un précédent projet et les procédures expérimentales seront donc les suivantes : sous anesthésie gazeuse, induction d'une plaie cutanée circulaire de 12 mm de diamètre par excision cutanée complète sur le milieu du dos (Procédure expérimentale 1), suivi de la greffe d'un substitut cutané dans le lit de la plaie cutanée avec suture chirurgicale et collage d'un anneau en silicone autour de la région greffée pour éviter la contraction de la plaie (Procédure expérimentale 2), puis placement pendant 4 semaines au maximum d'un pansement au-dessus de la région greffée, puis d'une compresse au-dessus du pansement pour absorber les exsudats = liquides organiques sortant de la plaie cutanée, d'un pansement de couverture et d'une bande de sparadrap pour maintenir le tout en place (Procédure expérimentale 3), sans que cela ne perturbe l'activité et le comportement des souris selon nos observations effectuées lors des études précédemment réalisées. Les régions greffées seront observées et photographiées chaque semaine pendant 4 semaines lors du change de pansement effectué 2 fois par semaine après placement des souris sous anesthésie gazeuse, afin d'évaluer la survie et la

tolérance du greffon cutané et de scorer différents paramètres d'intérêt (Procédure expérimentale 4).

Pour chaque substitut cutané testé, les souris seront mises à mort à différents temps après réalisation de la greffe cutanée, 3, 7, 14 et 28 jours, par injection intrapéritonéale d'une surdose d'euthanasique sous anesthésie gazeuse, et un prélèvement cutané sera effectué au niveau de la zone de greffe cutanée pour la réalisation d'analyses biologiques (histologie et immunohistochimie) permettant d'évaluer les processus de régénération du tissu cutané (prolifération cellulaire, épithélialisation, vascularisation...).

Nous utiliserons le nombre minimum d'animaux nécessaire à la réalisation de ce projet mais permettant d'obtenir des résultats prédictifs et représentatifs (Réduction).

Les souris seront placées en cage individuelle (18. 9 x 29. 6 x 12. 8 cm) avec couvercle filtrant pour éviter qu'elles ne s'arrachent entre elles le greffon cutané, l'anneau en silicone, les pansements et la bande de sparadrap, et en cycle de lumière inversé pour observer leur comportement pendant leur phase active et ainsi respecter leur horloge biologique (chronobiologie), des bâtonnets d'ouate étant placés dans leur cage comme enrichissement pour assurer leur bien-être (Raffinement).

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

Ce projet sera réalisé sur des animaux vivants car il n'est pas possible d'utiliser des modèles in vitro ou ex vivo pour évaluer la tolérance et l'efficacité de substituts cutanés sur des plaies cutanées chroniques (Remplacement).

19100 Au cours du vieillissement, les organismes subissent un déclin des fonctions tissulaires, ce qui entraîne une altération des fonctions physiologiques et des performances cognitives. Des progrès significatifs ont été récemment réalisés pour comprendre le mécanisme cellulaire et moléculaire impliqué dans le déclin progressif des fonctions cognitives. Cependant, le processus qui conduit à la baisse des performances locomotrices reste encore largement inconnu, et il n'existe pas de thérapies disponibles pour la ralentir. La découverte de nouvelles stratégies thérapeutiques, en lien avec le recyclage et nettoyage d'éléments cellulaires (autophagie), dans les neurones pourrait permettre de prévenir/traiter le déclin de nos fonctions locomotrices lié à l'âge.

Une approche expérimentale en conditions physiologiques est nécessaire et indispensable pour valider notre hypothèse concernant le rôle de ces facteurs autophagiques dans le vieillissement neuronal et nécessite l'utilisation d'animaux.

Nous utiliserons des souris sauvages de 3 et 16 mois pour vérifier notre hypothèse, le nombre de souris sauvages nécessaire sera de 860 sur 5 ans.

Les souris sauvages recevront un produit inhibiteur des gènes de l'autophagie par injection et certaines d'entre elles recevront une drogue permettant de réparer cette inhibition, avant de les soumettre, 3 semaines plus tard, à différents tests de locomotion (le test du rotarod, le test de la poutre, et le test d'agrippement).

Pour respecter le principe des 3R (remplacement, raffinement, réduction), le nombre de souris sauvages utilisées sera réduit à son minimum (analyses de paramètre multiples pour chaque souris et utilisation de tests statistiques adaptés).

- Remplacement : Il n'existe pas de méthode de remplacement permettant de reproduire la complexité du cerveau ce qui rend l'utilisation d'un modèle animal indispensable à la réalisation du projet.

- Réduction : L'étude sera arrêtée si les expérimentations initiales invalident l'hypothèse de travail. Des prélèvements auront lieu pour des analyses histologiques, de biologie cellulaire et moléculaire afin d'extraire le maximum de données de chaque expérimentation. Un nombre minimal et homogène d'animaux par étude est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les

résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique.

- Raffinement : Afin de prévenir au maximum la souffrance et l'anxiété des animaux, les injections auront lieu sous anesthésie générale profonde pour éviter toute douleur et des antalgiques sont prévus en pré et post-opératoire. Pour assurer le bien-être des souris, elles seront placées en cage groupée dans un milieu enrichi. Les souris seront sous surveillance journalière et des points limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

En résumé, ce projet pourrait permettre de conduire au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour traiter les dysfonctionnements locomoteurs liés à l'âge.

19101 Contexte scientifique :

L'obésité est un problème majeur de santé publique dont la prévalence est en constante augmentation. On estime que près d'un tiers de la population mondiale est en surpoids. L'inflammation associée à l'obésité est un facteur clé dans le développement de cette maladie. Cette inflammation est médiée par les cellules immunitaires (globules blancs ou leucocytes). Parmi ces cellules, les monocytes jouent un rôle dans l'entretien des tissus (maintien de l'homéostasie). Au cours de l'obésité, les monocytes sont recrutés vers le tissu adipeux, dans lequel ils agissent avec les cellules adipeuses (adipocytes) et ainsi modulent la physiologie du tissu. Les monocytes peuvent se différencier en cellules inflammatoires dont la présence au sein du tissu est associée à un dysfonctionnement de celui-ci. Toutefois, les interactions entre monocytes et adipocytes restent mal caractérisées. Ce projet vise à caractériser le rôle des monocytes dans le tissu adipeux. Nous émettons l'hypothèse que la production d'acides gras par les adipocytes est un mécanisme clé dans les interactions cellulaires régissant la physiologie du tissu.

Problématique :

Le dérèglement des cellules immunitaires est associé à la progression des maladies métaboliques. La nutrition joue un rôle clé dans la production des leucocytes, ainsi que dans leurs fonctions. Des résultats préliminaires suggèrent qu'un manque de production d'acides gras par les adipocytes induit une inflammation affectant les monocytes sanguins, qui sont alors recrutés spécifiquement au sein du tissu adipeux brun dont le rôle est la thermogénèse (production de chaleur), induite notamment durant l'hibernation, contrairement au tissu adipeux blanc qui accumule l'énergie sous forme de graisse. Les mécanismes d'interaction entre adipocytes bruns, acides gras et monocytes restent inconnus.

Hypothèse de travail :

Le projet vise à tester l'hypothèse que l'attraction des monocytes vers le tissu adipeux brun affecte les fonctions de ce tissu. Dans ce but des souris dont le tissu adipeux est incapable de générer des acides gras afin d'induire le recrutement des monocytes vers le tissu adipeux brun seront comparées à des souris de type sauvage. La thermogénèse sera induite par exposition temporaire au froid et le recrutement et le maintien des monocytes vers le et au sein du tissu adipeux seront modulés par des anticorps.

Justification du modèle et raffinement :

Les maladies métaboliques sont des pathologies complexes qui impliquent de multiples organes (tissus adipeux blanc et brun, foie, pancréas, muscles) dont les interactions ne peuvent être reproduites de manière satisfaisante in vitro. L'utilisation de modèles in vivo est donc indispensable pour la compréhension des mécanismes physiologiques et pathologiques. La souris est le modèle de mammifère pour lequel les modifications génétiques sont les plus aisées à réaliser et les plus répandues. Parmi ces lignées, certaines présentent un défaut dans la production des lipides au sein du tissu adipeux. Ces souris ne présentent aucun défaut de prise alimentaire, poids ou comportement, et n'ont donc aucun phénotype dommageable. Afin de pouvoir générer des résultats robustes, un maximum 300 souris devraient être utilisées sur une période de 5 ans.

Le respect de la règle des "3R" sera assuré par:

- Réduction : afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, nous utiliserons une approche statistique nous permettant d'estimer le nombre d'animaux strictement nécessaires. Les animaux des 2 sexes seront utilisés, quel que soit leur âge. De ce fait, la très grande majorité des animaux générés pourra être utilisé dans les expériences.

- Remplacement : aucune méthode alternative in vitro ou in silico n'est adaptée afin de remplacer des expériences in vivo dans le contexte

-Raffinement : Les procédures décrites sont parfaitement maîtrisées par les expérimentateurs. Aucune incidence de ces procédures sur le bien-être des souris en termes de poids, prise alimentaire. De plus, Les points limites décrits permettent de limiter très précocement tout signe d'angoisse, souffrance ou détresse anticipée ou non. Les animaux seront hébergés dans des cages présentant un environnement enrichi (abri et coton) sauf durant l'exposition au froid terminale. Les animaux auront libre accès à de l'eau et de la nourriture.

Perspectives :

Cette étude pourrait ouvrir de nouvelles perspectives de traitement visant à moduler l'inflammation du tissu adipeux au cours de pathologies métaboliques telles que l'obésité.

19102 Le syndrome de Netherton (SN) est une maladie génétique cutanée rare dont l'incidence est estimée à 1/200000. Il est caractérisé par une érythrodermie ichtyosiforme congénitale (dermatose inflammatoire génétique), une anomalie capillaire et des manifestations atopiques (allergiques). Ces symptômes sont présents dès la naissance, entraînant des infections bactériennes, une déshydratation, une hypothermie et une perte de poids extrême et sont à l'origine d'un taux de mortalité postnatal élevé. Ces symptômes conduisent à une inflammation sévère de la peau évoluant par poussées ayant un fort impact sur la qualité de vie des personnes atteintes. Jusqu'à présent, il n'existe pas de traitement efficace pour les sujets atteints du SN.

Seule l'utilisation de modèles murins génétiquement modifiés et inductibles au tamoxifène ainsi qu'un modèle de xénogreffe humaine, mimant le plus fidèlement possible les symptômes du SN, permettra de développer et tester l'efficacité de nouvelles thérapies. Nous utiliserons ces modèles pour tester des molécules thérapeutiques ayant eu des résultats intéressants in vitro afin d'évaluer l'effet du blocage de certaines molécules cibles sur le phénotype du syndrome de Netherton.

Ce projet est développé dans le respect de la règle des 3R, un nombre minimal d'animaux sera donc utilisé. Dans ce projet, un total de 854 animaux était estimé pour une durée de 5 ans. AMENDEMENT2: 2 lot de 42 souris NMRI-nu ont été ajoutés pour valider le modèle amment le nombre total de souris à 938.

Il s'agit du nombre d'animaux jugé nécessaire pour obtenir des résultats analysables, en incluant les répétitions indispensables à la démonstration. Afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, une anesthésie sera pratiquée et les procédures se dérouleront avec une surveillance journalière. Les antalgiques seront administrés systématiquement en post-opératoire et pourront être administrés en cas de nécessité dans les autres procédures. Enfin, des points limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire. A terme, les résultats précliniques de ce projet permettront de développer de nouvelles thérapies ayant le potentiel d'améliorer la prise en charge thérapeutique des patients.

Rappel AMENDEMENT 1: modification de la fréquence d'administration des molécules thérapeutiques de 2 fois par semaine à 3 fois par semaine et un prélèvement de sang à partir de la veine submandibulaire a été ajouté.

Rappel AMENDEMENT 2: Ajout de la description d'un acte chirurgical dans la procédure de chirurgie concernant les greffes de peau équivalente humaine sur les souris Immunodéficientes. 2 lots de 42 souris NMRI-nu ont été ajoutés pour valider le modèle et portent le nombre total de souris à 938.

Rappel AMENDEMENT 3: Ajout d'une voie d'administration des molécules thérapeutique dans procédure 1 : orale (P. O.) par gavage

Rappel AMENDEMENT 4: Précisions sur la voie d'administration des molécules thérapeutique dans procédure 1 et procédure 7: application en topique

Rappel AMENDEMENT 5: Ajout d'une voie d'administration de tamoxifene dans procédure 5: application de molécules thérapeutiques en topique

Nouvel AMENDEMENT 6 : Remplacement de la voie d'administration orale (P. O.) par gavage par une administration via un hydrogel nutritif mis à disposition des animaux, nécessitant un isolement de trois semaines dans la procédure 7 sur les souris Spink5KO inductible.

19103 1- Intitulé du projet

Imagerie d'une stratégie de thérapie cellulaire après injection intra articulaire dans un modèle murin d'arthrose induite à la collagénase

2- Durée du projet (en mois)

36 mois

3- Mots-clés (maximum 5)

Osteoarthrose, médecine régénérative, cellules souches mésenchymateuses, imagerie in vivo, imagerie du k-edge

4- Finalité du projet

Recherche translationnelle et appliquée

5- Objectifs et bénéfices escomptés du projet

Notre groupe travaille sur la mise au point d'approches de thérapies cellulaires pour réparer ou régénérer le cartilage détruit suite aux pathologies ostéo-articulaires. Les cellules souches mésenchymateuses possèdent des propriétés anti-inflammatoires et chondroprotectrices qui les rendent particulièrement intéressantes pour mettre en place un traitement de ces maladies.

L'objectif de ce projet collaboratif est de développer une technique d'imagerie bicolore basée sur l'imagerie à l'aide de rayons X afin d'effectuer le suivi in-vivo de ces cellules souches mésenchymateuses marquées à l'or, associées ou non à un hydrogel marqué à l'iode, après implantation intra-articulaire dans un modèle murin d'arthrose induite à la collagénase. Cette technique présente l'avantage de permettre une imagerie d'un élément donné donc d'être très spécifique en comparaison des autres approches : il sera ainsi possible de réaliser des cartographies in-vivo des éléments tels que l'or ou l'iode donc de suivre de manière spécifique et simultanée le devenir des cellules thérapeutique d'une part et de l'hydrogel d'autre part. A terme si cette technique est validée, elle pourra être utilisée chez les patients présentant de l'arthrose et traités à l'aide de ces nouvelles thérapeutiques, à l'aide d'un scanner spectral à comptage de photons (qui permet de faire cette approche d'imagerie chez les patients).

Ce projet repose sur l'utilisation de cellules souches mésenchymateuses d'origine humaine ; il est démontré que les cellules humaines ne sont pas rejetées et possèdent un effet thérapeutique chez la souris. Le développement de la pathologie sera contrôlé en cours d'expérimentation par imagerie par résonance magnétique (IRM). Le suivi longitudinal du devenir des cellules sera réalisé par imagerie dans les 6 semaines après induction du modèle d'arthrose.

Nous avons déterminé un programme de travail sur les 3 ans à venir qui tient compte des avancées attendues de notre projet de recherche. Un total de 114 souris sera utilisé au maximum. Le modèle d'arthrose chez la souris présente l'avantage de reproduire assez fidèlement les caractéristiques cliniques des formes inflammatoires d'arthrose observées chez l'Homme et est considérée comme référence. De plus, l'utilisation du modèle souris permet de tester l'effet thérapeutique de cellules souches mésenchymateuses humaines qui ne sont pas rejetées par le système immunitaire de la souris.

6- Nuisances prévues

Les animaux seront imagés in-vivo de 1 à 6 semaines après l'induction du modèle murin d'arthrose à la collagénase. A ce stade, ils ont cicatrisé et ils ne ressentent pas de douleur liée au modèle. Les procédures du projet (imagerie in-vivo réalisée sous anesthésie générale) présentent des

contraintes de classe légère pour les animaux et n'engendrent pas de souffrance ou de stress. Par ailleurs l'irradiation de l'animal par les rayons X est maintenue au minimum pour permettre un suivi longitudinal.

7- Application de la règle des «trois R»

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

- Réduction : le nombre d'animaux a été calculé avec l'aide d'un logiciel permettant d'évaluer le nombre d'animaux minimum nécessaire pour mettre en évidence des différences statistiquement significatives sur les paramètres à mesurer (données préliminaires obtenues dans d'autres expériences)
- Raffinement : toutes les mesures seront prises pour réduire la souffrance des animaux. Les procédures utilisées pour induire la pathologie ostéoarticulaire étant de degré de sévérité légère au maximum, les animaux ne présentent pas de signes de souffrance habituellement. Cependant, dans le cas où certains signes seraient observés, un traitement oral avec du paracétamol serait mis en place.
- Remplacement : Afin de proposer une thérapie cellulaire chez l'Homme, il est important de démontrer l'efficacité thérapeutique des cellules souches mésenchymateuses humaines et murines dans un modèle pré-clinique pertinent chez l'animal. Des modèles in vitro ne suffisent pas seuls à évaluer l'efficacité de ces cellules. Plusieurs sous-types d'arthrose existent chez l'Homme, il est donc nécessaire de mettre en place des modèles in vivo reproduisant le plus fidèlement possible les atteintes humaines. Par ailleurs, des tests ex vivo ont été réalisés au préalable afin d'obtenir la preuve de concept de la faisabilité de l'imagerie bicolore par imagerie à base de rayons X dans ce modèle avant de passer à l'imagerie in vivo.

19104 Les altérations et dégradations des vaisseaux sanguins sont des phénomènes prédominants dans le développement des pathologies cardiovasculaires. L'intégrité du lit vasculaire est garantie, à l'état normal, par une communication entre les cellules circulantes (plaquettes, hématies et cellules immunitaires) et le tissu vasculaire lui-même. Cependant la nature des cellules ainsi que les bases moléculaires sous-tendant ces interactions ne sont pas clairement définies. A la différence du reste des cellules circulantes, les monocytes dits « patrouilleurs » ne suivent pas le flux sanguin mais restent au contact des cellules endothéliales. Ils rampent continuellement sur la paroi des vaisseaux, éliminent les cellules mourantes et participent in fine au bon état du tissu vasculaire. Réciproquement, les cellules endothéliales produisent des facteurs essentiels au développement et maintien de ces « monocytes patrouilleurs ». Ce projet vise à définir les bases moléculaires et les conséquences fonctionnelles de ces interactions. Nous utiliserons des lignées de souris transgéniques (OGMs) traitées par injections de différentes substances et effectuerons des prélèvements sanguins sur ces animaux. Les résultats obtenus devraient permettre de mieux comprendre l'interdépendance entre monocytes et cellules endothéliales dans la protection des vaisseaux sanguins.

Le plan expérimental de notre projet, affiné par une étude statistique du nombre d'animaux nécessaires à l'obtention de résultats fiables, a été conçu pour respecter la règle des 3 R (Remplacer, Réduire, Raffiner). Notre projet nécessite l'utilisation d'animaux car cellules endothéliales sanguines et monocytes patrouilleurs sont très sensibles à leur environnement. Les cellules endothéliales subissent par exemple les contraintes physiques générées par la circulation sanguine tandis que les monocytes sont continuellement renouvelés du fait de l'hématopoïèse (néoformation de cellules sanguines dans la moelle osseuse). Les approches que nous pourrions développer in vitro ne permettent pas de récapituler l'ensemble des interactions cellulaires que nous nous proposons d'étudier. Nous utiliserons par conséquent des souris comme modèle d'étude, leur physiologie étant suffisamment proche de celle de l'homme pour permettre d'accroître nos connaissances sur les monocytes patrouilleurs et l'homéostasie vasculaire.

Ces souris sont élevées en groupes sociaux dans des environnements complexes afin de satisfaire leur instinct grégaire, de favoriser les comportements naturels et de limiter l'agressivité. Ainsi, les cages contiennent le plus souvent 5 souris et un dôme dans lequel elles peuvent créer leur nid et

s'y reposer. Les cages sont contrôlées quotidiennement par 2 animaliers qui vérifient l'état sanitaire et le bien-être des animaux. Cette surveillance permet d'agir rapidement en cas de problèmes (agressivité par exemple) et de mettre en place le protocole de mise à mort si les critères d'interruption prédéfinis sont atteints. Nous aurons recours à l'analgésie et l'anesthésie lorsque les besoins de l'expérience ou si l'état des individus le demandent. Enfin, pour réduire le nombre d'animaux utilisés au laboratoire nous avons une approche collective des expérimentations, ce qui nous permet d'utiliser un même individu dans le cadre de différents projets.

Pour obtenir les résultats attendus nous prévoyons d'utiliser 1032 souris sur une période de 2 ans.

19105 Au cours des dernières années, de nombreux produits radiopharmaceutiques ont été utilisés, en cliniques et précliniques, pour la détection de foyers infectieux, notamment des globules blancs marqués avec des produits radioactifs. Malheureusement, ces produits présentent des inconvénients inhérents, comme le temps de marquage (globules blancs), une faible spécificité et une qualité d'image sous-optimale, des appareils d'examen non adaptés, ce qui rendait le diagnostic des infections très difficiles surtout chez des patients déjà fragilisés par d'autres pathologies et des chirurgies.

Par rapport aux examens conventionnels, la tomographie par émission de positons (TEP) au fluorodésoxyglucose (un produit correspondant à un analogue du sucre) ([18F]-FDG-TEP), offre des avantages importants car elle peut fournir des informations métaboliques d'une lésion. De plus, la [18F]-FDG-TEP nécessite beaucoup moins de temps que l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et n'est pas contre-indiquée chez les patients présentant une insuffisance rénale ou des implants métalliques. Plusieurs études précliniques et cliniques ont montré que la [18F]-FDG-TEP est supérieure aux examens conventionnels d'imagerie dans plusieurs pathologies (tumorales neurologiques, cardiaque, osseuse, ...). Cependant, son rôle dans l'évaluation des patients atteints d'infection est encore peu clair.

Objectif : nous évaluerons le rôle de cet examen dans le diagnostic, et l'analyse du processus de formation et de développement de l'infection et de l'inflammation dans un modèle expérimental d'abcès sous-cutané chez le rat.

1- Dans chaque groupe, 2 animaux auront un examen d'imagerie avant d'induire l'abcès, ces examens, serviront de contrôle pour vérifier et retirer la captation physiologique (non spécifique à une infection) de l'animal, ce qui permettra de réduire le nombre d'animaux nécessaire pour cette étude. (Réduction).

2- L'abcès sera induit chez 78 rats Wistar, en utilisant une souche de bactérie qu'on trouve dans les selles des animaux et qui n'est pas transmissible à l'Homme. Une colonie de cette bactérie sera injectée par voie sous-cutané au niveau de la patte antérieure gauche, un volume équivalent contenant du sérum physiologique sera injecté au niveau de la patte antérieure droite (région controlatérale, ctrl négatif). Les animaux seront suivis de J0 (pour certains animaux) jusqu'à J60, après l'induction de l'abcès (J1, J2, J3, J4, J5, J6, J7, J8, J9, J10, J15, J30 et J60) par imagerie afin de définir un schéma temporel de l'évolution de l'inflammation post infectieuse dans le temps. Le nombre d'animaux a été calculé en amont par un statisticien en tenant compte de la variabilité du modèle afin d'utiliser le moins d'animaux. Certains animaux auront 2 à 3 passages en imagerie, pour augmenter le nombre des examens par temps, sans pour autant ajouter des animaux supplémentaires. (Réduction).

3- L'analyse objective des caractéristiques métaboliques du [18F]-FDG au niveau d'une lésion infectieuse ne peut être réalisée que sur un modèle animal permettant par la suite d'analyser le mécanisme physiologique global à l'image de des examens chez l'Homme ce qui permettra de mieux coller à la réalité lors d'administration de traitements thérapeutique (Remplacement).

4- Enfin, dans le cadre du suivi du bien-être des animaux, les examens TEP, les prélèvements sanguins et les abcès seront induits sous anesthésie générale pour éviter un stress inutile à l'animal. Après induction de l'abcès, les animaux seront examinés de façon très soutenue durant les 48h en surveillant leur état général, en mesurant (i) leur poids, (ii) leur température, (iii) l'état du gonflement de l'abcès, les animaux recevront également un antalgique tous les 6 à 8h durant 48h. De plus,

cette surveillance se poursuivra quotidiennement durant toute la période de l'étude pour chaque animal. Si un des points limites est atteint, l'animal sera mis à mort : Compte tenu de la gravité modérée associée à la procédure nous fixerons des points limites très généraux. L'observation de signes de souffrance (yeux mi-clos, prostration, cachexie, arrêt de prise d'aliment/de boisson, et immobilité, prostration, dos vouté, cris) pourra mener à la mise à mort de l'animal. En outre, une perte de poids supérieure à 15% pendant 2 jours consécutifs sera un critère éthique justifiant la mise à mort du rat. Enfin, l'évolution de l'abcès vers une nécrose profonde des tissus adjacents (non superficielle) conduira à la mise à mort de l'animal concerné (Raffinement).

19106 La mise en œuvre des réglementations portant sur l'expérimentation animale inscrite dans le droit français depuis février 2013 précise des obligations réglementaires de formations et de compétences pour les personnes qui manipulent et utilisent des modèles animaux. Ainsi, les personnes amenées à travailler avec des modèles animaux doivent, en plus de leur formation initiale, justifier de la maîtrise des gestes techniques qu'elles vont mettre en œuvre dans leurs projets. Pour acquérir ces compétences techniques, un accompagnement par une personne compétente est mis en place sous forme de tutorat. Ce tutorat est à destination des personnels amenés à utiliser des souris dans leur domaines de Recherche en Sciences du Vivant. Cette phase de tutorat est essentielle et est un investissement sur l'avenir en matière de Raffinement. En effet, une personne bien formée sera ensuite capable et aura toutes les compétences nécessaires pour réaliser ensuite son travail de Recherche selon les bonnes pratiques en expérimentation animale et en accord avec la réglementation européenne.

Règle des 3R.

Dans la mesure où ce projet a pour objectif de former des personnes qui seront amenées à travailler avec des animaux vigiles, la première règle, soit celle de Remplacer, ne peut être appliquée ; les deux autres le sont de manière à réduire au maximum le stress ou l'angoisse des animaux, ainsi que le nombre d'animaux nécessaires au projet.

En ce qui concerne la règle de Raffiner, les animaux ont accès ad libitum à l'eau et à la nourriture, bénéficieront de conditions de température et d'hygrométrie régulées et conformes à la réglementation en vigueur. L'enrichissement de l'environnement des animaux (matériel de nidification et abris), le maintien des interactions sociales (hébergements de plusieurs individus dans une même cage) et la surveillance quotidienne des animaux permettent de s'assurer de leurs bien-être et de détecter rapidement tout changement de comportement tout au long de leur vie.

Au moment des manipulations effectuées pour le tutorat, une attention toute particulière est portée à l'apprentissage initial de la capture et de la préhension de l'animal. La présence continue d'un encadrant garantit la qualité de l'apprentissage du savoir-faire nécessaire à la réalisation de tous les gestes techniques enseignés (administrations et prélèvement de sang).

En ce qui concerne la règle de Réduire, un nombre minimal de souris est prévu pour assurer un bon enseignement à chacun des participants et la possibilité de renouveler les phases de tutorat. En effet, l'acquisition des compétences nécessite de pouvoir répéter les gestes techniques pour que la personne atteigne le niveau de compétence requis. Ce niveau de compétence est évalué par le formateur, lors des séances de tutorat. Toutes les informations relatives aux compétences des personnels sont suivies et formalisées au niveau de l'Etablissement Utilisateur par le responsable du suivi des compétences.

De plus, il est important de préciser que toutes les souris utilisées dans ce projet sont des animaux de réforme. Ce nombre annuel a été calculé au plus juste des besoins. Le projet nécessite au maximum un total de 270 souris sur 5 ans.

19107 Clostridioides difficile (C. difficile) est une bactérie anaérobie productrice de spores. Il s'agit de la première cause de diarrhées bactériennes associées aux soins chez l'adulte dans les pays développés et en particulier en France (plus de 24 000 cas par an, dont 14 % de formes compliquées). La mortalité associée aux infections à C. difficile (ICD) est de l'ordre de 3%. Les ICD représentent un coût sanitaire important pour nos sociétés, en raison de l'augmentation des durées

moyennes de séjours et du surcoût des soins associés. De plus, les ICD touchant en priorité les personnes âgées, on peut anticiper une augmentation de ces infections liées au vieillissement de la population, qui risque de renforcer la pression économique sur notre système de santé. Le traitement des ICD repose en premier lieu sur l'utilisation d'antibiotiques efficaces, mais plus de 20% des patients vont rechuter après un premier épisode et le risque de rechute augmente avec le nombre d'épisodes. Les rechutes multiples, qui peuvent être très invalidantes pour ces patients, sont alors traitées par transplantation fécale.

La contamination des patients se fait à partir des spores résistantes, présentes dans l'environnement des services hospitaliers. Dans le tube digestif, les spores germent en formes végétatives qui doivent coloniser le tube digestif de l'hôte avant de produire les toxines, majoritairement responsables des signes cliniques et des lésions de la muqueuse intestinale. Notre laboratoire s'est spécialisé dans l'étude de l'étape cruciale de colonisation, et travaille sur le rôle des composants bactériens impliqués dans cette étape (notamment sur des protéines de surface à rôle d'adhésine). L'objectif de ces études est d'identifier de nouvelles cibles vaccinales et/ou thérapeutiques pour lutter contre les ICD. Pour caractériser précisément le rôle de ces composants dans l'étape de colonisation, la stratégie de choix est l'étude de souches mutantes n'exprimant plus l'un ou l'autre de ces composants. Au cours d'une première étape, les mutants sont caractérisés phénotypiquement grâce à plusieurs essais réalisés *in vitro* (capacité à se multiplier, capacité à sporuler et à germer, formation de biofilm, adhésion sur lignées cellulaires, . . .) pour identifier les composants les plus susceptibles de jouer un rôle dans le processus de colonisation, ce qui nous permet de répondre aux exigences de remplacement et de réduction de la règle des 3R. Pour les facteurs de virulence les plus intéressants, les essais de colonisation des souches mutantes chez l'animal restent une étape incontournable pour comprendre leur rôle, car même les expériences sur modèles cellulaires en trois dimensions ou en fermenteurs modélisant le tube digestif ne permettent pas de reproduire idéalement le processus infectieux global.

Deux types d'essais sont programmés : i) des essais de compétition entre la souche parentale et les souches mutantes en souris axéniques, qui permettent d'identifier et de caractériser des diminutions subtiles de fitness de colonisation des souches mutantes, et de faire des analyses aisément interprétables sur la distribution spatiale des bactéries dans les tissus digestifs ; ii) des essais de colonisation individuelle en souris conventionnelles, qui permettent d'évaluer la capacité des souches mutantes à coloniser dans un environnement complexe, physiologiquement proche de celui de l'infection humaine.

Chez les souris, les signes cliniques induit par l'ICD sont généralement limités, avec une diarrhée modérée spontanément résolutive entraînant une souffrance extrêmement réduite. Toutefois, la symptomatologie dépend du modèle utilisé (les signes cliniques sont plus fréquents chez les souris conventionnelles) ainsi que des souches testées, et certains mutants peuvent entraîner une diarrhée plus importante voir le décès des animaux. Dans le souci de la troisième exigence de la règle des 3R, les conditions d'hébergement seront optimisées et des critères d'arrêt anticipé seront définis en fonction d'un score clinique pour les animaux, surveillés quotidiennement pendant la durée des expériences. Les groupes d'animaux seront définis pour permettre des analyses cinétiques tout en conservant une interprétation statistiques robustes (15 animaux par essai de compétition et 16 animaux par essai conventionnel -8 souris infectées par la souche parentale contrôle et 8 souris infectées par la souche mutante-). Nous prévoyons de tester 12 mutants durant les 4 ans du projet, et d'utiliser donc 372 animaux maximum. Certains mutants sont ou seront construits et testés dans le cadre d'un projet accepté et financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR).

19108 Cet avenant définit l'ajout de trois procédures au projet "2020011014327143" précédemment autorisé. Deux de ces procédures (« chambre à trois compartiments » & "roue d'activité") sont de classe légère, la troisième (« labyrinthe aquatique de Morris ») est de classe modérée. Cet ajout s'inscrit dans une volonté de valider de nouveaux tests en éthologie appliquée, tests faisant appel à des registres comportementaux (évaluation de la sociabilité, de la mémoire sociale, de l'activité

spontanée, de l'apprentissage et de la mémoire spatiale) n'appartenant pas aux répertoires étudiés par les tests inclus dans la demande initiale d'autorisation de projet.

Le projet "2020011014327143" s'articulait sur une comparaison des performances comportementales entre animaux testés en milieu conventionnel versus milieu de statut sanitaire contrôlé (appelé EOPS). Depuis, le contexte a évolué et le travail à accomplir se restreint désormais à la validation des tests comportementaux à réaliser en zone EOPS. En conséquence, l'effectif initial des animaux alloués à ce projet a été divisé par 2, c'est pourquoi il nous semble possible, via de nouveaux tests à valider chez le rat, d'accroître les capacités d'investigations en zone EOPS. Ainsi, nous sollicitons, par le présent avenant, la possibilité de mettre en place et de valider deux procédures légères (« chambre à trois compartiments » et « roue d'activité ») et une procédure modérée (« labyrinthe aquatique de Morris ») qui ne figuraient pas dans la première demande d'autorisation de projet.

Pour rappel, l'effectif initial mobilisé pour les validations en zone EOPS était de 80 rats ; sur les 80 rats initialement prévus pour la comparaison en zone conventionnelle et qui ne seront pas utilisés, le présent avenant sollicite l'utilisation de 40 animaux (2 lots de 20). Ceux-ci seront hébergés dans les mêmes conditions que celles définies dans l'autorisation de projet initiale EOPS. De même, les animaux seront divisés en 4 groupes de 10 rats chacun, un groupe recevant l'administration d'un agent pharmacologique connu pour ses propriétés modulatrices du comportement vis-à-vis du test considéré (scopolamine en tant que produit amnésiant dans la chambre à 3 compartiments et le labyrinthe aquatique de Morris, caféine pour la procédure des roues d'activité), les autres 10 rats étant administrés avec le véhicule et considérés ainsi comme témoins.

Par rapport aux principes de la règle des 3R, le recours à l'animal pour réaliser ce type d'expérimentation ne peut pas être substitué par des systèmes virtuels ou cellulaires, le but de cet avenant étant d'étudier l'influence des conditions EOPS sur l'expression de différents registres comportementaux du rat (Remplacement). Le nombre d'animaux requis pour cet avenant est de 40 rats qui seront organisés et utilisés en lots expérimentaux comme décrit ci-dessus dans le but de limiter le nombre de rats utilisés (Réduction) tout en assurant la pertinence des résultats qui seront obtenus. Les rats seront maintenus dans des conditions d'hébergement EOPS telles que prescrites par la réglementation et surveillés quotidiennement par du personnel certifié et formé (Raffinement). Les 40 rats engagés dans cet avenant seront conservés et pourront être utilisés dans le cadre d'autres actions de formation sur avis du porteur de projet et de la structure en charge du bien-être animal, complété par l'avis du vétérinaire référent. Ils ne seront mis à mort selon une méthode réglementaire qu'en dernier recours ou atteinte de points limites, qui demeurent les mêmes que ceux mentionnés dans la demande d'autorisation de projet initiale.

Ces points limites relatifs à un état de mal être persistant seront relevés (perte de poids corporel supérieures à 10% du poids de départ, perte de poids supérieure à 20% sur 3 jours, état de stress apparent de l'animal se maintenant suite à la manipulation (comportement agressif, cris récurrents), tout signe de lésions suite à l'administration des substances pharmacologiques utilisées lors des tests (saignements, difficultés respiratoires et/ou cardiaques), signes comportementaux anormaux (prostration, hyperactivité, signes d'agressivité vis-à-vis des congénères).

19109 En élevage, l'utilisation des PLF (Precision Livestock Farming) est de plus en plus répandue, et ce dans différentes filières. Ces nouvelles technologies mises au service de l'élevage, permettent un suivi en continu des différents individus composant un troupeau, ou du troupeau dans son ensemble. L'éleveur peut ainsi recevoir des informations en temps réel sur l'état de santé de ses animaux, permettant une gestion plus fine des différents paramètres d'élevage tels que l'alimentation ou la détection de maladies. En effet, connaître l'état de santé et de bien-être des animaux assure une meilleure gestion de la production et permet ainsi d'assurer un rendement optimal. D'autres outils, tels que les accéléromètres, permettent de rendre compte de l'activité des individus, permettant de rendre compte des effets de différentes procédures d'élevage sur le comportement des animaux. La température corporelle représente elle aussi un outil utilisé dans plusieurs situations. En effet, des études ont démontré la relation entre température corporelle et mise bas chez différentes espèces. La détection du poulinage grâce à la température corporelle a

été démontrée en utilisant la prise de température rectale. La mesure en continu de la température corporelle peut cependant se faire de différentes manières. Chez les bovins elle l'est notamment grâce à la température ruminale ou à la température vaginale. Ces deux types de mesures ne sont pas réalisables chez la jument. En effet, les équins sont des monogastriques, rendant difficile l'utilisation de capteurs passant par le système digestif du fait de leur taille. De plus, bien que cela ait déjà été réalisé grâce à une « pilule », cela ne permet qu'un suivi temporaire de la température. Au regard des systèmes permettant la mesure de la température vaginale, ils sont généralement assez mal supportés dans par les chevaux. Cela nous a donc mené à la mise en place d'une alternative et à l'utilisation d'une puce d'identification implantée en intramusculaire mesurant aussi la température corporelle (ThermoChip™, Antelliq/Merk). Le projet vise à mieux connaître la relation qui peut exister entre température corporelle et la fonction reproduction de la jument. Les précédentes études se focalisant sur cette relation se sont centrées sur l'étude de la température à l'approche du poulinage. Ici, nous souhaitons, également, étendre l'étude de cette relation à l'ensemble du cycle, et notamment à l'ovulation. Être en mesure de prédire ces événements d'élevage clé, poulinage, cycle reproducteur et ovulation, grâce à des mesures effectuées en continu serait une innovation utile à la filière. En effet, chez les équidés, l'ovulation est difficile à prévoir et de courte durée. Ainsi, il est difficile d'inséminer les juments au moment précis de l'ovulation. Bien que des méthodes d'induction soient disponibles et permettent de palier le problème, avoir un indicateur physiologique fiable serait un moyen de limiter l'usage de substances exogènes. De plus, en rapprochant le plus possible les inséminations de l'ovulation, il serait possible d'augmenter la rentabilité des élevages en rendant potentiellement plus nombreuses les inséminations fécondantes. Ce projet a pour but de déterminer s'il existe une rythmicité particulière de la température corporelle associée au cycle reproducteur. Si une telle relation était mise au jour, nous souhaitons être en mesure d'identifier avec autant de précision que possible le moment de l'ovulation. Comme objectif secondaire, nous souhaitons démontrer la faisabilité de la mise en place d'un système de prise de température automatique et en continu sur des chevaux au pâturage. A notre connaissance, aucun dispositif de ce type n'est actuellement disponible. Notons que l'outil qui permettra d'effectuer ces relevés le fera de manière non-invasive pour l'animal. Le projet respecte au mieux la règle des 3R. Remplacement: étant donné que le cheval est l'espèce cible et que nous nous intéressons à la détection du cycle et en particulier au moment de l'ovulation, nous ne pouvons pas éviter l'utilisation d'animaux vivants. Réduction: le nombre d'animaux utilisés (30 sur 2 ans soit un total de 60) permettra la prise en compte de possibles variations individuelles, ce nombre est un maximum afin de répondre aux contraintes matérielles de suivi des cycles, si nous obtenons le nombre de cycles suffisant (20 cycles complets) dès la première année nous arrêterons. Raffinement: notre étude n'implique que des procédures classiques déjà en place dans l'élevage équin. Les animaux évoluent dans des conditions d'élevage classique et sont suivis quotidiennement par du personnel formé et expérimenté afin de s'assurer de leur bon état de santé physique et mentale.

19110 *Toxoplasma gondii* est un parasite protozoaire ubiquitaire capable d'infecter un large éventail d'hôtes à sang chaud, y compris l'Homme. Les oocystes (forme de résistance) de *T. gondii* peuvent persister et rester infectieux dans l'environnement pendant des années. Malgré l'importance des oocystes de *T. gondii* comme une source majeure d'infection, les études qui se concentrent sur la transmission, la distribution dans l'environnement, et la résistance à l'inactivation sont extrêmement limitées. Un obstacle majeur à la réalisation d'études avec des oocystes de *T. gondii* est la difficulté de produire un grand nombre d'oocystes. De plus, le stade oocyste de *T. gondii* ne peut pas être reproduit in vitro par culture cellulaire, il y a donc obligation d'utiliser l'hôte définitif: le chat.

Par conséquent, identifier et caractériser des organismes comme substituts aux oocystes de *T. gondii* constitue un enjeu essentiel. Ils ne sont pas pathogènes pour l'homme, sont également transmis à leur hôte par voie oro-fécale et présentent une structure similaire, notamment au niveau de la paroi de l'oocyste. En effet, comme *T. gondii*, les *Eimeria* appartiennent à la classe des coccidies au sein du phylum Apicomplexa. *Eimeria* spp. et *T. gondii* sont très proches génétiquement et ont un développement similaire au niveau de l'intestin chez leur hôte définitif respectif. De plus, des caractéristiques similaires incluant la résistance environnementale, les

mécanismes de formation de la paroi de l'oocyste ainsi que son autofluorescence sous excitation UV, indiquent que les parois des oocystes de *T. gondii* et d'*Eimeria* spp. sont similaires en structure et composition moléculaire. En outre, cette espèce d'*Eimeria* ont déjà été proposées comme modèle de coccidies. *Eimeria papillata* a été utilisée comme contrôle positif pour valider le processus d'extraction d'ADN de *Toxoplasma gondii* à partir de végétaux à feuilles vertes. De même, *E. papillata* a été utilisée comme modèle de coccidies dans une étude canadienne pour suivre la contamination « de la fourche à la fourchette » et la modéliser. Les oocystes du genre *Eimeria* sont donc des candidats intéressants comme modèles d'étude de *T. gondii*.

Ainsi, le modèle souris permet de produire des oocystes d'*Eimeria papillata* qui seront par la suite testés/utilisés comme modèle de *T. gondii*. Le but étant d'appliquer différents traitements afin d'observer si les oocystes de *T. gondii* et d'*E. papillata* répondent de façon similaire.

La production d'oocystes nécessite l'infection orale de l'hôte "souris" avec un nombre suffisant d'organismes d'*Eimeria*, afin d'obtenir une excrétion d'oocystes dans les selles pendant 3 à 15 jours après l'infection. Cette méthode permet d'obtenir un grand nombre d'oocystes (plusieurs millions d'oocystes par souris). Une visite quotidienne des animaux par le personnel de laboratoire est prévue.

Un nombre de 70 souris maximum incluant le projet pilote est envisagé sur les 5 ans de durée du projet. Le recours aux animaux est indispensable car il n'existe pas de méthode alternative valable (culture cellulaire, évaluation in vitro). Les parasites doivent être obtenus en quantité suffisante par multiplication in vivo sur souris selon des protocoles établis dans le respect de la règle des 3R : En effet, (1) le recours à l'animal est indispensable puisqu'il n'existe pas d'alternative autre que le passage par la souris qui permet d'amplifier la quantité de parasites (multiplication dans les organes). (2) Le nombre d'animaux est réduit au strict minimum nécessaire. (3) Les animaux sont hébergés en groupes sociaux et bénéficient d'un enrichissement adapté (abris, tunnels).

L'avantage de ce projet est que *Eimeria papillata* n'est pas un agent pathogène humain.

Aucun dommage n'est attendu lors de ce projet puisque l'infestation par *Eimeria papillata* n'induit pas de mortalité chez la souris.

19111 Les tumeurs cérébrales appelées glioblastome étant de très mauvais pronostic, des recherches restent indispensables pour améliorer leur diagnostic et pour aider à la prise en charge des patients. La détection de ces tumeurs est réalisable grâce à l'utilisation de l'imagerie combinée TEP/NIRF (tomographie par émission de positons / fluorescence proche infrarouge) qui offre un potentiel indéniable pour effectuer à la fois une cartographie des cellules tumorales et un ciblage de celle-ci. Une telle combinaison conjugue le diagnostic non invasif de l'imagerie corps entier par TEP avec la chirurgie intra-opératoire guidée par l'imagerie de fluorescence ou l'histopathologie ex vivo. Pour mettre en œuvre cette double approche diagnostique, nous avons développé des molécules d'imagerie bimodale que nous souhaitons évaluées pour leur caractère innovant.

Nos molécules sont des outils originaux d'imagerie bimodale pour l'imagerie combinée TEP/NIRF élaboré sur la base de marqueurs ayant une structure chimique unique rassemblant un dérivé de la cyanine et de fluor-18 (radiotracer) lié à un centre de carbone. Un peptide ciblant les intégrines est utilisé ce qui rend notre molécule spécifique aux tumeurs de glioblastome.

Nos molécules ont fait l'objet d'une étude in vitro préalable dont la pertinence des résultats à déterminer la réalisation de cette étude in vivo. Cette étude ne peut cependant pas être modélisée exclusivement à l'aide de cultures cellulaires in vitro et la mise en œuvre de modèles in vivo, tels que les modèles de greffes intracérébrales de tumeurs humaines chez la souris, est nécessaire pour valider au niveau préclinique les stratégies combinant le diagnostic d'une tumeur (à l'aide de la TEP) et son traitement par chirurgie intra-opératoire guidée par l'imagerie de fluorescence et ceci en utilisant un seul produit (Remplacement). La difficulté posée par l'utilisation des modèles de tumeurs intracérébrales in vivo reste le suivi de la croissance tumorale au cours du temps ainsi que son ciblage.

L'objectif du projet est de caractériser la meilleure molécule innovante développée pour l'imagerie bimodale TEP/NIRF et pré-sélectionnée in vitro, sur un modèle de glioblastome humain (lignée

cellulaire U87-MG) greffé chez la souris nude. L'évaluation portera sur sa biodistribution sur corps entier au cours du temps par fluorescence (1h à 24h) ainsi que sa sélectivité tumorale sur des modèles de tumeurs intracérébrales (fluorescence et TEP).

Les techniques d'imagerie non-invasives permettront de réduire le nombre d'animaux utilisés en expérimentation puisqu'elles permettent de réaliser des suivis dans le temps sur un même animal (Réduction).

Ainsi, au maximum 48 souris immunodéficientes recevront une greffe de cellules cancéreuses U87-MG selon des protocoles maîtrisés par le laboratoire. Le développement des tumeurs implantées en sous cutanée permettra une première évaluation de la biodistribution sur corps entier par imagerie de fluorescence avant d'envisager une étude de la sélectivité tumorale sur des tumeurs intracérébrales de plus petit volume qui seront suivies par microscopie intravivale de fluorescence. De même une imagerie corps entier des souris sera réalisée par TEP pour évaluer la possibilité d'utiliser l'imagerie bimodale avec cette molécule. Le bien-être des animaux fera l'objet d'un suivi quotidien, les souris seront anesthésiées lors des procédures d'implantation des tumeurs et d'imagerie limitant ainsi le stress de animaux ainsi que le choix de points limites suffisamment précoces comme par exemple une perte de poids de plus de 10% sur 3 jours (Raffinement). Tous les animaux seront mis à mort à la suite des séquences d'imagerie soit 48h après l'administration des molécules d'imagerie.

19112 Les maladies inflammatoires et infectieuses touchant le système nerveux central sont actuellement une thématique de recherche majeure puisque de plus en plus de personnes sont touchées par ces maladies. Par exemple, en France, la sclérose en plaques touche entre 90 000 et 100 000 personnes. Ces pathologies sont dues à l'infiltration de cerveau par des cellules immunitaires, en particulier des lymphocytes, provenant du sang. Des traitements destinés à bloquer ou ralentir l'évolution de la maladie en bloquant cette infiltration ont été développés mais ils entraînent des effets secondaires graves chez certains patients pouvant conduire au développement d'un cancer ou au décès. De plus, ces traitements sont inefficaces chez certains patients. C'est la raison pour laquelle les mécanismes modulant l'entrée des lymphocytes dans le cerveau doivent être étudiés afin de déterminer de nouvelles cibles pour prendre en charge ces maladies. La barrière hémato encéphalique (BHE), séparant le sang du cerveau est en première ligne pour moduler ce passage et notamment, les principales cellules qui la constitue, les cellules endothéliales. Dans notre projet, l'étude de l'interaction spécifique entre les cellules immunitaires (lymphocytes) et les cellules endothéliales est basée sur l'utilisation de modèles animaux (lignées pures génétiquement homogènes) qui reproduisent en majeure partie les caractéristiques cliniques et cellulaires de ces maladies humaines.

Pour l'ensemble du projet, des études in vitro sur cellules primaires et in vivo seront réalisées. Nous étudierons les mécanismes de chacune des sous populations lymphocytaires à l'état naifs ou activés afin de comprendre les mécanismes physiologiques et pathologiques. Nos modèles serviront également à tester de nouveaux traitements en développement. Ainsi, il est prévu d'utiliser un maximum de 3638 animaux sur 5 ans.

La règle des 3R sera appliquée dans le cadre de ce projet. 1-Remplacement : le recours à l'expérimentation animale dans le cadre de cette étude se fait après des expériences in vitro dans des modèles cellulaires qui ont permis d'identifier des voies de signalisation impliquées dans la régulation du fonctionnement du système immunitaire. Le principe de remplacement n'est pas applicable à ce projet car les études in vitro ne reproduiraient pas l'ensemble des voies impliquées dans des modèles physiologiques intégrés et par conséquent ne permettent pas l'obtention de résultats scientifiques exploitables et pertinents pour la pathologie humaine. 2-Réduction : les expériences sont organisées de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux tout en gardant la puissance statistique permettant de tirer des conclusions solides des expériences réalisées. Les expériences précédentes menées sur ce modèle nous ont permis d'améliorer les protocoles et de réduire au maximum l'utilisation des animaux. Les résultats actuels ont permis de valider que des lots de 10 souris selon les paramètres à évaluer permettent d'acquérir des données fiables. 3- Raffinement : Les conditions d'expérimentations font l'objet d'une procédure de suivi du

bien-être animal. Les animaux seront suivis quotidiennement à l'initiation du modèle. Un animal sera euthanasié s'il présente un des points limites d'arrêt de la procédure, définis pour limiter la douleur, la souffrance ou l'angoisse de l'animal.

19113 L'anesthésie générale demeure l'une des grandes avancées de la médecine, facilitant les procédures invasives depuis le milieu du XIXe siècle. Ses effets conduisent à une modification transitoire de l'activité cérébrale, se traduisant par une perte de conscience, une amnésie et une analgésie, en assurant le maintien des fonctions physiologiques. Cependant, en dépit de l'utilisation importante des anesthésiques généraux, leur mécanisme reste inconnu. Les avancées de ces dernières décennies ont permis l'identification de diverses cibles moléculaires ainsi que de modifications de l'activité cellulaire. Néanmoins, à une échelle plus globale, le fonctionnement du cerveau sous anesthésie générale est encore peu compris.

Certains effets indésirables, tel que des troubles cognitifs et du comportement, sont susceptibles d'apparaître et de perdurer à plus ou moins long terme après une anesthésie générale, notamment chez les enfants et les personnes âgées. À ce jour, le mécanisme responsable de ces altérations demeure inconnu. Bien qu'une mort neuronale a été statistiquement associée avec les effets indésirables, aucun lien de causalité n'a pu être établi. Une hypothèse alternative probable implique une plasticité anormale découlant de l'anesthésie générale, conduisant aux modifications de l'activité cérébrale responsable de ces troubles. Une meilleure compréhension du mécanisme de l'anesthésie générale, permettrait d'améliorer l'adaptation des procédures anesthésiques aux patients afin de limiter ces effets indésirables.

Ce projet permettra d'étudier chez la souris, d'une part le fonctionnement du cerveau sous anesthésie générale, et d'autre part les phénomènes de plasticité anormale pouvant expliquer les troubles observés. Pour cela, les réseaux neuronaux fonctionnant sous anesthésie générale ont été préalablement identifiés par des techniques d'imageries. Afin d'explorer les modifications fonctionnelles de ces réseaux, ainsi que les phénomènes plastiques, des techniques de mesure de l'activité *in vivo* seront employées.

Le nombre d'animaux nécessaire est estimé à 300 pour ce projet, conforme aux exigences de réduction, de raffinement et de remplacement :

- réduction : des analyses intermédiaires permettront de limiter le nombre d'animaux au strict nécessaire,

- raffinement : quand plusieurs procédures chirurgicales sont nécessaires chez le même animal, elles seront effectuées dans le même temps opératoire, dans la mesure du possible ; la surveillance post-opératoire des animaux sera biquotidienne, afin de conduire une analgésie guidée par une échelle validée (MGS : Mouse Grimace Scale, Langford 2010). Le protocole sera interrompu si les points limites définis sont atteints, à savoir une perte de poids durable de l'animal (> 20%) accompagné de signes de souffrances évalués par l'échelle MGS et une prostration, malgré un traitement bien conduit. Le stress de l'animal sera limité par un enrichissement permanent de l'environnement, ainsi qu'une habitude quotidienne à l'expérimentateur et la salle d'opération durant la semaine précédant les procédures.

- remplacement : Il n'existe pas de modèle *in silico* ou *in vitro* permettant de mesurer les phénomènes désirés ; les espèces non mammifères ne sont pas pertinentes pour cette étude.

19114 L'absence de gravité, autrement appelée la « microgravité », retrouvée lors des vols spatiaux, est connue pour engendrer une migration des liquides corporels vers la partie haute du corps. Il est désormais reconnu que cette migration liquidienne mène à diverses réponses physiologiques et physiopathologiques, en induisant notamment des effets néfastes sur le système cardiovasculaire et cérébral. Parmi ces effets, une potentielle augmentation de la pression intracrânienne est suggérée, mais sa progression ainsi que ses mécanismes de régulation restent à ce jour mal compris.

Les analogues des vols spatiaux, permettant de simuler sur Terre les effets de la microgravité sur l'organisme, suggèrent que la redistribution des fluides corporels conduit à des modifications au

sein de l'homéostasie cérébrale et cardiovasculaire, avec des modifications de l'activité du système nerveux autonome. De récents travaux menés à la fois chez la souris et chez l'Homme, ont montré qu'une augmentation modérée de la pression intracrânienne s'accompagne à la fois d'une augmentation parallèle et, réversible, de l'activité du système nerveux sympathique. Par ailleurs, il a été montré dans plusieurs études, la présence d'une hyperactivité sympathique en condition de microgravité. Cependant, son origine reste méconnue.

Notre hypothèse est que les variations de la pression intracrânienne pourraient être un facteur de modulation de l'activité du système nerveux sympathique, en microgravité.

Les différents objectifs de ce travail de recherche réalisés chez la souris seront 1) d'évaluer l'impact d'une augmentation de la pression intracrânienne sur l'activité du système nerveux sympathique, 2) d'identifier quelles régions cérébrales sont impliquées afin de comprendre comment ces réponses sont médiées.

Les retombées de ce projet sont attendues dans le domaine de la recherche spatiale, afin d'évaluer les conséquences d'une augmentation modérée de la pression intracrânienne sur la régulation cardiovasculaire en condition de microgravité, mais également dans le domaine de la médecine, où de nombreuses situations pathologiques sont caractérisées par une augmentation de la pression intracrânienne.

Ce projet sera réalisé dans le respect du bien-être animal et de la règle des 3Rs. Afin de suivre la règle de raffinement, l'expérimentation fera l'objet d'un suivi quotidien du bien-être des animaux, adapté aux procédures expérimentales, et des potentiels effets indésirables sur leur état de santé global. Tous les animaux de l'étude sont anesthésiés et analgésiés de manière optimale afin de supprimer une éventuelle douleur ou souffrance. Les conditions d'hébergement sont les plus adaptées afin de réduire tout stress ou mal être que pourraient ressentir les animaux. L'expérimentation est organisée de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux, c'est pourquoi 80 souris sont nécessaires pour la réalisation de cette étude menée sur quatre ans, avec une puissance statistique raisonnable. Il n'existe pas à l'heure actuelle de moyens alternatifs à l'utilisation des animaux, cette recherche intégrée ne pouvant être menée que dans un modèle animal.

19115 Le déficit en fer est la principale cause d'anémie qui correspond à une baisse du taux d'hémoglobine dans le sang, et peut être causé, chez l'homme, par un manque d'apport en Fer dans l'alimentation (malnutrition), par la perte de sang (menstruation, saignement gastro-intestinal) ou par des maladies chroniques telles que des maladies inflammatoires, des maladies rénales chroniques ou des cancers. L'anémie due à un déficit en fer entraîne les symptômes suivants : faiblesse, fatigue et dans les cas sévères peut affecter le développement mental et moteur des enfants et augmente le risque de mortalité des mères et des leurs enfants.

Un modèle d'anémie modérée due à un déficit en fer par un appauvrissement en fer de l'alimentation a été développé chez le rat.

Le projet consiste à évaluer dans ce modèle de rat, l'effet bénéfique de candidats-médicaments sur l'amélioration de la carence en fer et donc de l'anémie.

Pour ce projet, il est prévu un nombre maximal de 800 animaux sur 5 ans.

Règle des 3 R:

Remplacement: dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le rat car il n'existe pas de méthode de substitution (in vitro ou in silico) pour étudier l'impact de l'anémie sur un organisme dans sa globalité. A ce jour, le rat est l'espèce la plus adaptée à ce type de modèle d'étude.

Réduction : Un nombre minimal et suffisant d'animaux par groupe est utilisé afin d'analyser de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et d'effectuer des analyses statistiques.

Raffinement : Le raffinement sera obtenu par la mise au point de procédures rigoureuses, un suivi quotidien de l'état de santé des animaux, le suivi des signes cliniques et la détermination des points limites. De plus, le nombre de prélèvements sanguins sera limité pour minimiser la perte de sang.

19116 Les maladies allergiques d'origines cutanées (p. ex. , la dermatite atopique), respiratoires (p. ex. , l'asthme allergique) ou alimentaires sont en plein essor dans les pays développés. Il est maintenant estimé qu'un tiers des français souffrent d'une ou plusieurs formes de maladies allergiques, dont certaines peuvent s'avérer fatales (p. ex. , certaines formes d'asthmes réfractaires aux corticoïdes ou encore des chocs anaphylactiques induits par l'ingestion de cacahuètes).

L'origine des diverses maladies allergique chez l'homme est extrêmement complexe et plusieurs facteurs (p. ex. , immunologique, génétique, environnemental, neuronal etc) sont suspectés d'être impliqués dans leur développement. Ce programme de recherche a pour but de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires de l'allergie et de développer de nouvelles approches thérapeutiques. Devant la complexité de ces maladies, due notamment à l'implication de différents organes et types cellulaires, le recours aux modèles animaux est indispensable. L'espèce utilisée pour ce projet de recherche est la souris de laboratoire. Nous estimons devoir utiliser 3612 souris sur les 5 années que durera ce projet. Ce nombre inclut le nombre minimum nécessaire de contrôles et la nécessité de reproduire les résultats, en respect avec la règle des 3R. Le calcul du nombre minimal d'animaux par groupe a été fait sur la base de notre expérience antérieure avec les modèles d'allergie que nous allons utiliser et des tests statistiques que nous avons effectués lors d'études antérieures. Les animaux seront observés quotidiennement et nous veillerons aux conditions de transport et d'hébergement (enrichissement des cages avec des carrés de ouates. . .). Bien que nous n'anticipions pas d'apparition de signes de douleur dans nos modèles d'allergie, tout animal présentant une douleur évidente (isolement, baisse importante de l'activité, perte de poids > 20%, pilo-érection et/ou grimace) sera immédiatement mis à mort. Les résultats attendus des expériences que nous projetons de réaliser contribueront à mieux comprendre le développement des maladies allergiques et à identifier de nouvelles stratégies pour prévenir et soigner ces maladies.

19117 Les maladies du retard mental sont parmi les maladies les plus souvent rencontrées dans les services de génétique médicale, et représentent 5 à 10% des coûts de santé publique. Un des objectifs principaux des laboratoires de diagnostic génétique est d'identifier les gènes associés aux anomalies du développement. Pourtant, près de 50% des patients dont l'ADN est séquencé et analysé se retrouveront dans une impasse diagnostique à l'issue de ces analyses lorsque les mutations sont retrouvées dans des gènes dont la fonction est peu connue par exemple. Ainsi, nous nous intéressons au modèle murin pour explorer la fonction des gènes dans le développement.

Le premier axe de recherche porte sur l'analyse systématique de l'impact des 20000 gènes du génome de la souris sur la morphologie cérébrale. A cette fin, les cerveaux de souris « KO » issues d'un consortium international (indépendant de cette demande) sont traités selon un protocole histologique à haut débit. A l'heure actuelle, nous disposons de plus de 200 gènes candidats pour lesquels des études ultérieures seront à considérer et qui feront l'objet de demandes de DAP indépendantes et ciblées.

Il est important de noter que l'étude fonctionnelle poussée des maladies du retard mental ne peut être réalisée que sur animaux vivants puisqu'il s'agit ici de modéliser des maladies humaines affectant l'organe dont la structure anatomique est la plus complexe du corps humain: le cerveau. Pour ces raisons, le REMPLACEMENT par d'autres modèles nous est impossible. Le nombre d'animaux sera REDUIT au minimum pour atteindre un pouvoir de détection statistique de 80% entre différents groupes d'animaux. Et enfin, toutes les précautions possibles seront prises pour RAFFINER nos procédures et réduire au mieux l'inconfort des animaux en les habituer aux tests et/ou en utiliser anesthésique et antalgique.

Ainsi, au cours de notre étude sur la morphologie cérébrale à haut-débit, nous avons identifié Vps13b, qui est aussi le gène sous-jacent au syndrome de Cohen et étudié depuis de nombreuses années dans le laboratoire hôte. Cependant, les effets de ce gène sur le système nerveux central (sur la structure du cerveau) et son lien avec le comportement animal ne sont pas complètement élucidés. Pour atteindre notre objectif scientifique, l'expérimentation animale in vivo sera utilisée sur un maximum de 144 souris pendant une période de 5 années.

Le nombre de souris se décline en plusieurs groupes :

2 cohortes de 12 animaux, 2 sexes, 3 génotypes (WT, Het et Hom),

19118 Malgré les progrès thérapeutiques, les maladies cardiovasculaires (CV) ou cardio-neurovasculaires restent la première cause de mortalité dans le monde, la deuxième en France juste après les cancers. Les maladies cardiovasculaires ont principalement pour origine l'atteinte ischémique (manque d'oxygène) du myocarde et l'hypertension artérielle. L'évolution au long court est le développement de l'insuffisance cardiaque, le cœur n'est alors plus capable d'assurer la perfusion des tissus et le taux de mortalité atteint 50% à 4 ans. La recherche dans ce domaine reste donc un enjeu majeur de santé publique.

De plus, environ 3% des médicaments approuvés au cours des 20 dernières années ont, par la suite, été retirés du marché suite à l'identification d'effets adverses. Les effets indésirables cardiovasculaires représentent la plus fréquente cause d'arrêt de développement ou de retrait de médicament (27%). Ces effets délétères ont notamment été observés lors des traitements par chimiothérapie des cancers. En clinique humaine, certaines classes d'agents anti-tumoraux très largement utilisées induisent malheureusement une certaine cardiotoxicité consistant essentiellement en des troubles du rythme et une insuffisance cardiaque aigüe.

Les différentes étiologies humaines des maladies ou complications cardiovasculaires peuvent être reproduites chez l'animal par des interventions chirurgicales. En effet, les rongeurs (rats et souris) développent des atteintes CV de façon reproductible et répétable et sont donc des modèles de choix pour étudier le mécanisme d'action des nouveaux médicaments. Par ailleurs, l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection réduite ou préservée ainsi que les cardiomyopathies suite aux chimiothérapies sont l'aboutissement d'un processus de remodelage cardiaque sur le long terme, mettant en œuvre de multiples systèmes (immunitaires, neuronaux, endocriniens, rénaux. . .) dont les actions et leurs composantes ne peuvent être étudiées que chez l'animal. Ceci est un gage d'une meilleure transposition vers la clinique dont le besoin en nouveaux traitements est urgent.

Par ailleurs toutes nos études respectent le principe des 3R :

Réduire : Le projet a été organisé de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux tout en prenant en compte la mortalité post-chirurgicale qui est de 30 à 50% et la variabilité interindividuelle à développer une dysfonction. Par ailleurs, chaque animal est utilisé pour mesurer plusieurs caractéristiques (physiologiques, anatomiques, histologiques, biochimiques et moléculaires) du développement de la pathologie. Compte tenu de ces critères, on estime devoir inclure un maximum de 7500 animaux sur les 5 ans tous modèles confondus.

Remplacement : Les processus impliqués dans l'insuffisance cardiaque sont trop complexes pour être étudiés sur cellules isolées. Par ailleurs ces études ayant pour but de valider l'efficacité de nouveaux médicaments une bonne prédictibilité est indispensable et seules l'utilisation des animaux permet de réaliser ces tests dans un système intégré et donc de présenter cette qualité.

Raffinement : Tous nos animaux sont hébergés dans des cages dont les dimensions sont en accord avec la législation européenne, en nombre adapté à l'espèce et aux dimensions de la cage et avec un enrichissement correspondant aux standards réglementaires dont un accès ad libitum à l'eau et à la nourriture. Pendant toute la durée de nos études, les animaux sont suivis quotidiennement, pesés au moins une fois par semaine afin d'identifier une potentielle souffrance. Si les animaux présentent des signes de souffrances (tels que perte de poids, défaut de toilettage, agressivité, ...) des mesures sont mises en place pour y remédier et si ces signes devaient s'aggraver les animaux concernés seront sacrifiés. L'utilisation de l'échographie pour le suivi de la fonction cardiaque de manière répétée permet en outre d'éviter toute souffrance puis que c'est une technique d'imagerie exploration non invasive. Pour les procédures qui peuvent induire de la douleur chez l'animal, une analgésie per et post-opératoire est mise en place pour la réduire et la contrôler.

19119 Le déconditionnement musculaire lié au vieillissement est aujourd'hui une préoccupation dans l'évolution de nos modes de vie. Ce déconditionnement se traduit par une perte importante des capacités musculaire et peut considérablement altérer la santé et la qualité de vie des individus.

Ce projet d'étude a trois objectifs principaux :

- Etudier les mécanismes fondamentaux du déconditionnement musculaire
- Etudier les effets de différents moyens de prévention ou contremesure à base d'exercice physique et de solutions pharmacologiques
- Créer un assemblage de contremesures en vue de prendre en charge de manière globale et individuelle les effets du déconditionnement en respectant les recommandations en matière de santé.

Pour atteindre ces objectifs, deux types d'expérimentations animales seront mises en place avec ou sans complémentation pharmacologique (eau de boisson, molécule associée aux croquettes ou par administration orale).

La première utilisera le modèle de référence "Hindlimb Unloading" (HU), permettant chez la souris d'induire un déconditionnement lié à l'hypoactivité des membres inférieurs.

La deuxième utilisera des animaux âgés (15 à 22 mois) permettant ainsi d'avoir directement accès aux problématiques du vieillissement.

Enfin, ces deux modèles pourront être couplés, permettant ainsi de reproduire une situation d'inactivité chez la personne âgée.

Pour ces protocoles, les molécules utilisées ont déjà été testées à de nombreuses reprises et ont fait l'objet de publications. Cependant, les effets de leurs interactions entre elles et avec de l'activité physique reste à étudier. L'activité physique sera calibrée de manière individuelle aux moyens de tests d'efforts et sera principalement réalisée sur tapis de course ou au moyen de "free-wheeling" par l'ajout de roue d'exercice en accès libre dans les cages. Ces expérimentations donneront lieu à des tests fonctionnels ainsi qu'à des prélèvements terminaux (sang, organes, muscles, os-tendon), permettant une évaluation approfondie des effets des méthodes de préventions et de leurs éventuels effets indésirables.

Pour réaliser ce projet, 320 souris non génétiquement modifiées seront utilisées, réparties en 6 expérimentations comprenant chacune 4 à 9 lots de 10 animaux.

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

- « Remplacer » les modèles animaux : Nos questions scientifiques sont centrées sur les effets des différents niveaux de contraintes environnementales sur la physiologie du système musculaire. Les expérimentations animales avec système intégré sont donc indispensables. Des modifications engendrées au niveau de l'organisme entier, telles que les modifications des sécrétions hormonales par exemple, influencent la cinétique de perte ou de gain de la masse musculaire. De fait, nous nous sommes orientés vers un modèle animal se rapprochant de l'humain sur la physiologie musculaire et avons donc choisi la souris. Il n'existe pas de modèle cellulaire reproduisant nos procédures expérimentales. Dès que possible en fonctions des résultats obtenus, ces expérimentations seront traduites chez l'homme.

- « Réduire » le nombre d'animaux en expérimentation : pour nos expérimentations, nous avons prévu le nombre strictement nécessaire d'animaux, à la fois pour garder une puissance statistique dans le traitement de nos résultats, et pour palier l'abandon de certaines souris dans l'expérimentation. Ce travail permettra également de réaliser plusieurs collaborations, donnant lieux à des résultats plus reproductibles et réduisant considérablement le nombre d'animaux nécessaires par rapport à des travaux menés en parallèle par chaque équipes.

- « Raffiner » la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites (critères d'interruption) : Pour les différentes supplémentations qui seront testées, nous avons écarté le gavage afin de limiter toute forme de stress lié à la supplémentation. Ces molécules seront prodiguées via l'eau de boisson pour celles qui sont hydrosolubles ou directement incorporées dans la nourriture pour les autres. Les protocoles de gavages, risqués notamment chez des animaux âgés et source d'anxiété ne seront donc pas employés.

Pour tous nos protocoles nous prévoyons un temps d'habituation des animaux à l'utilisation des équipements (tapis roulants, rotarod, tunnels).

Comme pour chacun de nos protocoles expérimentaux, nous allons porter une attention particulière au bien-être de nos animaux. Les suivis quotidiens des animaux permettent d'identifier des signes de souffrance caractérisés par l'état du pelage, le comportement de la souris (agressivité / apathie), cris, mobilité, alimentation... Le report quotidien des poids corporels sera un paramètre intégré à nos protocoles. Dans le cas où un animal présenterait des signes manifestes de souffrance ou perte de poids excessive ($\geq 20\%$ du poids initial), il sera sorti des procédures expérimentales et euthanasié si les signes persistent dans les 24h. Les protocoles employés sont maîtrisés et n'entraîneront pas de douleurs chez les souris participantes.

19120 Nous menons des recherches sur des maladies génétiques de l'enfant caractérisées par une faiblesse musculaire très handicapante, voire mortelle, afin de comprendre leur origine et trouver des traitements, aujourd'hui inexistantes, pour les soigner. Ce projet concerne des maladies musculaires qui résultent du fonctionnement anormal d'une protéine appelée « canal sodique » qui est exprimée dans les muscles squelettiques et qui est nécessaire pour que ce dernier se contracte en réponse aux nerfs. Nous utilisons majoritairement des modèles cellulaires pour identifier des molécules qui stimulent le fonctionnement de cette protéine et qui pourraient servir de médicaments contre ces maladies. Cependant il n'est pas possible de répondre totalement à la première règle des 3 R, qui est de remplacer, pour mener à bien nos travaux car le muscle adulte ne peut pas être reproduit dans des modèles cellulaires, ainsi que son interaction avec le nerf. Aussi, des modèles animaux de ces maladies génétiques sont nécessaires pour valider l'effet bénéfique des molécules qui nous sélectionnons en amont par étude de modèles cellulaires. Nous avons choisi comme modèle le poisson zèbre car il permet de répondre au mieux aux deux autres règles des 3R pour le criblage de molécules pharmacologiques à moyenne échelle : il permet de réduire le nombre d'animaux et de raffiner les expériences menées car les connaissances biologiques que l'on a sur ce modèle sont importantes et ses conditions d'hébergement et de manipulation normalisées.

La procédure présentée ici consiste à déterminer la capacité de nage rapide des larves de poissons zèbres âgées de 5 à 6 jours qui sont mutantes pour la protéine d'intérêt en les comparant à des larves contrôles. La nage rapide des larves est obtenue en réponse à un stimulus sonore et sera étudiée à l'aide d'un équipement commercial. Le protocole, standardisé et d'une durée de 15 minutes par jour, est conçu de manière à limiter au maximum son impact sur les animaux. Les gestes contraignants (manipulation des larves pour les transférer du conteneur d'élevage au conteneur expérimental) seront réalisés (une seule fois) à l'âge de 4 jours, et des temps d'acclimatation seront aménagés avant chaque enregistrement réalisé à 5 et à 6 jours. Les animaux seront mis à mort post-enregistrement à l'âge de 6 jours et seront utilisés pour des études moléculaires complémentaires.

Un effectif total maximal de 400 larves est nécessaire et suffisant pour permettre d'obtenir des résultats scientifiquement robustes. Le nombre d'individus à utiliser a été calculé selon les règles de transmission génétique pour obtenir des résultats suffisamment robustes pour notre objectif et statistiquement significatifs.

19121 Chez l'Homme, trois types principaux de cristaux sont responsables de maladies rhumatologiques : les cristaux d'urate de sodium (UMS) sont responsables de la goutte, les cristaux de pyrophosphate de calcium (PPC) de la chondrocalcinose et les cristaux de calcium de phosphate (PC) du rhumatisme à hydroxyapatite. La prévalence de ces trois maladies est fréquente, dépasse 17. 5% chez des patients âgés de plus 75 ans pour la chondrocalcinose. Ces cristaux peuvent provoquer des crises inflammatoires aiguës récidivantes et handicapantes. Ces crises inflammatoires sont caractérisées par un gonflement local, une rougeur et une douleur intense responsable le plus souvent d'une impotence fonctionnelle.

Cette inflammation dépend principalement d'une protéine appelée interleukine 1b (IL-1b). Ces crises sont traitées par la colchicine, les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), les corticoïdes ou encore les anti-IL-1. Mais l'administration systémique de ces médicaments expose à de nombreux effets secondaires parfois mortels. En particulier, la colchicine, utilisée uniquement en administration systémique, a une fenêtre thérapeutique étroite. Sa dose maximale est rapidement

limitée, en particulier chez des patients avec une maladie rénale sévère, ce qui peut diminuer son efficacité qui est dépendante de sa concentration locale.

Nous avons récemment identifié dans le modèle de poche à air (décrit plus loin) que l'inflammation microcristalline est diminuée par un inhibiteur du transporteur GLUT1 de glucose (le SF-31). L'utilisation de cet inhibiteur peut être une alternative possible pour traiter les crises inflammatoires déclenchées par les cristaux. Mais son administration systémique expose à des effets secondaires dans la mesure où le fonctionnement des cellules nécessite la consommation du glucose, en particulier les cellules neuronales.

Pour diminuer les effets secondaires de la colchicine et de l'inhibiteur SF-31 de GLUT1 en administration systémique, nous avons mis en place un système d'encapsulation par des nanoparticules permettant une délivrance locale contrôlée.

Les objectifs de ce travail sont d'étudier i) l'efficacité de la colchicine encapsulée en injection locale au cours des crises inflammatoires déclenchées par les différents types de cristaux; ii) l'efficacité de l'inhibiteur SF-31 de GLUT1 encapsulé dans les crises inflammatoires microcristallines; iii) la pharmacocinétique et la libération systémique de ces traitements et iv) leur tolérance.

Pour répondre à ces questions, nous utiliserons in vivo le modèle murin de poche à air que nous maîtrisons et qui a permis l'identification des propriétés inflammatoires des cristaux de pyrophosphate. La poche, créée en injectant de l'air stérile sous la peau des souris, mime une cavité articulaire. Ce modèle décrit depuis les années 1990 est reconnu au niveau international et permet de mimer la réaction inflammatoire microcristalline observée chez l'Homme. Dans ce modèle, l'inflammation débute 4h après les injections de cristaux, atteint son maximum entre 6 et 18h selon les cristaux utilisés, puis s'arrête entre 48-96h. La réaction inflammatoire se déroule sans signe local apparent (pas de rougeur ni de gonflement) et sans douleur apparente des souris (pas de modification du comportement). Elle est authentifiée en analysant les protéines et les cellules contenues dans la poche. L'efficacité des différents traitements sera évaluée sur l'intensité de l'inflammation (infiltrat inflammatoire, production de médiateurs inflammatoires et nociceptifs) et la vitesse de résolution. La pharmacocinétique sera étudiée par une cinétique et permettra de caractériser la vitesse de libération de la colchicine et de l'inhibiteur SF-31 encapsulés et leur passage systémique.

Pour chaque expérience, 10 animaux/condition sont nécessaires, les nanoparticules seules et les injections de sérum physiologique seront utilisées comme témoin négatifs, et la colchicine en administration systémique et les corticoïdes en administration locale comme témoins positifs.

Ce nombre de 10 animaux/condition correspond à la quantité minimale nécessaire pour obtenir une puissance statistique suffisante (tests non-paramétriques de Mann-Whitney et Kruskal Wallis). Le nombre de souris sera réduit au minimum grâce aux expériences in silico. Pour réduire au minimum le nombre de souris, nous réaliserons le maximum de tests in vitro afin de déterminer la toxicité des nanoparticules. Des tests de modélisation sur la vitesse de libération permettront de tester une à 2 encapsulations et le minimum de doses de nanoparticules. Les expériences in vivo seront adaptées au fur et à mesure afin de limiter le nombre d'expérience et de limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés. Ces tests in vivo sont indispensables pour apprécier l'efficacité et la toxicité des nouvelles formulations et pistes thérapeutiques.

Le nombre total de 640 souris est nécessaire: 320 souris pour pharmacocinétique, 110 pour étude effet-dose, 110 pour comparaison avec traitement systémique et corticoïde local et 100 pour étude sur les cristaux de PPC et de PC.

Les souris seront, à la réception dans l'animalerie, réparties de façon aléatoire par groupes de 10 dans un environnement enrichi. La poche à air ne sera créée qu'après une semaine d'adaptation dans l'animalerie. La poche est utilisée 6 jours après sa création. La création des poches et les injections des microcristaux se font sous anesthésie par inhalation d'isoflurane. Chaque injection dure au maximum 30 secondes, les souris sont endormies pendant au maximum deux minutes. Le comportement des souris sera observé après la création des poches. Dans notre expérience, il n'est pas modifié par la présence d'une poche à air en sous-cutanée. Localement, nous n'avons jamais

observé de complication. Le poids des animaux sera relevé avant et 6 jours après la création des poches, juste avant les injections des microcristaux.

Les expériences et les injections des cristaux seront réalisées 6 jours après la création de la poche. Pour les tests thérapeutiques, tous les médicaments testés seront administrés 30 minutes avant les injections des cristaux dans la poche. Les prélèvements seront recueillis 6 heures après les injections des cristaux et aux différents temps de la pharmacocinétique (de 1 à 96 heures après l'injection des médicaments encapsulés). Les animaux seront mis à mort après les prélèvements.

Les résultats attendus permettront de proposer des traitements efficaces mieux tolérés.

19122 Ce projet d'équipe se focalise sur les mécanismes du remodelage cardiaque induits par des surcharge de pression, reproduisant les atteintes cardiaques humaines lors de pathologies telles que l'hypertension artérielle et le rétrécissement aortique. Nous cherchons à identifier les cibles cellulaires et les mécanismes altérés dans ces conditions de stress afin de définir de nouvelles cibles thérapeutiques. Nous focalisons tout particulièrement nos études sur les composantes inflammatoires, stromales et matricielles intervenant dans le développement et l'évolution défavorables de la pathologie vers l'insuffisance cardiaque.

Les souris subissent une intervention chirurgicale afin de réduire le diamètre de l'aorte transverse ce qui va produire une surcharge de pression au niveau ventriculaire et induire une augmentation de la taille des parois cardiaques. Au niveau tissulaire le remodelage se traduit par l'hypertrophie des cardiomyocytes, l'apparition de fibrose et d'un infiltrat inflammatoire. Malgré ces "remaniements" tissulaires et cellulaires, la fonction cardiaque est faiblement altérée pendant plusieurs semaines (4 à 8) puis elle se dégrade pour aboutir à l'insuffisance cardiaque. Nous étudions à la fois le remodelage cardiaque de souris avec un génotype "sauvage" et de souris génétiquement modifiées pour des protéines/enzymes intervenant dans les altérations de la structure et de la fonction cardiaques lors d'une surcharge de pression.

La règle des 3R sera appliquée dans le cadre de ce projet: Afin de comprendre les modifications tissulaires à l'échelle d'un organe, et plus généralement d'un organisme, l'utilisation d'animaux est incontournable. Cependant les études visant à comprendre la communication entre les différents types cellulaires constituant le cœur seront réalisées en partie, à partir de lignées cellulaires établies afin de réduire au maximum le nombre d'animaux. La règle des 3R sera appliquée pour les expériences, où l'utilisation d'animaux est indispensable. Les protocoles ont été élaborés de manière à en réduire au maximum le nombre d'individus. et toutes les précautions en termes d'analgésie et d'anesthésie sont prises afin de limiter et soulager la douleur des animaux au cours des expériences. La chirurgie, réalisée sous anesthésie générale, sera suivie d'un traitement avec un dérivé morphinique par injection sous cutanée, répété si besoin, jusqu'à complète récupération de l'animal. Les expériences font l'objet d'une procédure de suivi du bien-être des animaux et aux potentiels effets indésirables sur l'inconfort et l'état de santé global des animaux. Les souris sont surveillées fréquemment pendant les premières 24-48h post chirurgie puis quotidiennement, à la recherche de signes de souffrance ou de dégradation de l'état général (observation visuelle, pesée. . .) jusqu'à la fin du protocole. Dans le cadre du raffinement des igloo et des objets en bois sont placés dans les cages pour leur permettre de s'isoler et de se distraire. Dans une première approche, nous confirmerons l'intérêt de l'inactivation des différentes protéines sur une petite cohorte de 28 souris. L'expérience ne sera poursuivie que si la perte d'animaux lors de la première phase dite de faisabilité n'excède pas 10%. La mort des animaux survient généralement au cours de la chirurgie ou dans les premières 24h post opératoire. Nous prévoyons alors d'inclure au maximum 316 animaux pour l'ensemble du protocole. De plus, une utilisation optimale de l'ensemble des organes cibles (cœur et autres) sera effectuée sur la totalité des souris soumises au protocole afin de limiter le nombre de souris utilisées.

19123 La goutte est une maladie inflammatoire touchant les articulations. Elle est due à des dépôts de cristaux d'acides uriques au niveau des articulations. Lorsque les microcristaux d'acide urique dissous dans le sang, et donc présents dans tous les tissus, sont en trop forte concentration et que les conditions locales sont favorables (notamment acidité locale du milieu suffisante), ils précipitent.

Dans une articulation, cette précipitation entraîne une inflammation locale responsable de la crise de goutte.

Les crises, souvent très douloureuses, se caractérisent par un échauffement et un gonflement de l'articulation et peuvent durer plusieurs jours.

Cette pathologie touche environ 3% de la population et principalement les hommes. Elle débute par une phase aiguë où l'inflammation se résorbe d'elle-même sans traitement particulier. Au fil des années, les crises sont plus fréquentes et il persiste des douleurs articulaires. Cette articulation se déforme et finit par se détruire, donnant des douleurs moins intenses mais permanentes, on parle de goutte chronique. A ce stade, atteint après des années de phase aiguë, les dépôts d'acide urique dans les tissus sont majeurs. Les dépôts les plus dangereux sont ceux se formant dans le rein qui finit par ne plus fonctionner correctement conduisant à l'insuffisance rénale.

Les traitements actuels consistent au repos de l'articulation et à la gestion de la douleur. Les patients peuvent également être traités pour leur taux élevé d'urée dans le sang. Il s'agit de traitement de fond quotidien, administré durant la phase chronique, la pathologie n'évoluera plus mais les dommages articulaires seront irréversibles.

La complexité de ces maladies, dont la composante est multicellulaire, nécessite de pouvoir faire la preuve de concept et d'efficacité dans un organisme intégré comme l'animal. L'objectif de ce projet est d'évaluer de nouveaux candidats médicament dans le processus inflammatoire de la goutte. Pour cela deux modèles animaux seront mis en place chez le lapin. Le modèle aigu consistera en une seule injection intra-articulaire de cristaux d'acide urique. Le modèle chronique sera déclenché par l'injection répétée de cristaux afin de mimer les crises de goutte. Dans ces deux modèles, la douleur et la réponse inflammatoire seront étudiées. Chaque procédure sera composée de 7 groupes de 6 lapins. Les animaux seront euthanasiés à différents temps (3 temps définis par le sponsor) pour suivre l'évolution de l'inflammation. Enfin la douleur sera évaluée au cours des procédures 1 et 2.

Nous envisageons d'utiliser 42 animaux par an et par procédure soit 420 lapins sur la totalité du projet.

Dans le respect de la règle des 3R, et lorsque cela est possible ces candidats sont évalués sur culture cellulaire ou organe isolé préalablement aux tests animaux afin de remplacer ou de réduire le nombre d'animaux impliqués dans les protocoles. Nous utiliserons le nombre minimum de souris nécessaire à une analyse statistique (T tests, ANOVA) en prenant en compte la variabilité inter-individuelle. D'autre part, un raffinement des protocoles sera effectué en fonction des avancées technologiques dans le domaine. Les animaux seront hébergés selon les conditions de la nouvelle réglementation 2010/63, 2 par cage afin d'assurer leur sociabilité. Leur environnement sera également enrichi de jouets et de buchettes de bois. Chaque animal entrant dans une étude disposera d'une fiche individuelle de suivi sur laquelle tout traitement et observation seront reportés. L'état de santé des animaux sera évalué quotidiennement selon des critères d'apparence physique (perte de poids >20%, gêne respiratoire. . .) et comportementaux (animal prostré, agressivité...) définis en accord avec le comité de suivi du bien-être animal de notre établissement.

19124 Déterminer la capacité d'un poisson à croître, à fuir un prédateur ou à faire face aux fluctuations environnementales fait partie des challenges actuels. Aujourd'hui, la communauté scientifique cherche à disposer de proxys permettant d'évaluer l'état de santé global du poisson. De nombreuses études ont montré l'implication des mitochondries dans ces performances physiologiques. La mitochondrie, organite présent dans les cellules animales, joue le rôle de centrale énergétique en convertissant à partir de l'oxygène, les nutriments en une forme d'énergie utilisable par la cellule, l'ATP (l'adénosine triphosphate). Ainsi des individus qui présentent des mitochondries efficaces à produire de l'ATP améliorent leur croissance, peuvent maintenir une activité physique plus longtemps et résistent mieux au manque d'oxygène (hypoxie). La grande majorité des études du fonctionnement mitochondrial s'effectue après sacrifice de l'animal à partir d'un prélèvement de tissu d'une vingtaine de milligrammes voire plus. Des techniques récentes ont montré qu'il était possible de mesurer l'efficacité des mitochondries chez le poisson à partir de

seulement quelques milligrammes de muscle rouge. Il devient donc envisageable d'évaluer le fonctionnement mitochondrial à partir d'une biopsie musculaire ce qui n'implique plus la mise à mort de l'animal. Ainsi ce projet a pour but de vérifier l'absence d'effet délétère d'une biopsie de muscle rouge de truite sur les performances physiologiques au niveau musculaire (fonction mitochondriale) et au niveau global (croissance, nage, tolérance à un stress environnemental comme l'hypoxie).

60 truites arc-en-ciel seront utilisées dans ce projet.

Ce projet comprend 3 procédures :

- Procédure 1 (modérée) - Marquage individuel de tous les poissons par insertion de puce électronique et réalisation d'une biopsie musculaire. Les 60 poissons seront marqués sous anesthésie. 30 d'entre eux subiront une biopsie du muscle rouge tandis que les 30 restants serviront de contrôle. Chaque lot (« biopsié » et contrôle) sera divisé en 2 de manière aléatoire et rentrera dans les procédures 2 ou 3. Une étude morphométrique sera également réalisée pendant le temps de l'anesthésie (taille et poids)

- Procédure 2 (modérée) : Test de nage, (15 contrôles et 15 biopsiés). A la suite du test de nage des prélèvements de muscle rouge seront réalisés à proximité de la biopsie pour vérifier l'impact de cette dernière sur la fonction mitochondriale musculaire.

- Procédure 3 (sévère) : Tolérance à l'hypoxie (15 contrôles et 15 biopsiés)

Afin de ne pas multiplier les manipulations des poissons, le poids et la taille des animaux seront mesurés après les procédures 2 et 3 afin d'évaluer et comparer la croissance des 2 lots d'animaux (biopsié vs non biopsié).

A la fin des procédures 2 et 3 toutes les truites seront mises à mort par commotion cérébrale.

Cette étude sera conduite conformément à la règle des 3R,

- Remplacement : Notre but est de mettre au point une technique non létale de prélèvement tissulaire, puis de vérifier qu'elle n'a pas d'impact négatif sur l'animal entier : le remplacement n'est donc pas possible.

- Réduction : le nombre d'animaux a été réduit au minimum afin de pouvoir comparer statistiquement deux populations d'animaux (c'est-à-dire ayant subi une biopsie ou non).

- Raffinement : les poissons sont hébergés selon les normes de soins et d'hébergement (article R. 214-90 à R. 214-95 du code rural et de la pêche maritime). Un suivi rigoureux des animaux sera effectué tout au long du projet par une surveillance quotidienne des bonnes conditions de stabulation. Lors des procédures de marquage et de biopsie (procédure 1), les poissons seront anesthésiés. Enfin, pendant le test de nage (procédure 2) ou de tolérance à l'hypoxie (procédure 3) les poissons seront continuellement surveillés et seront retirés de la procédure dès l'atteinte d'un point limite.

19125 Le syndrome de relargage des cytokines (CRS, cytokine release syndrome), aussi appelé orage cytokinique, est une réponse inflammatoire systémique due à des complications d'une maladie, d'une infection ou d'un effet secondaire d'une thérapie biologique. Les symptômes cliniques sont une libération massive de cytokines pro-inflammatoires dans le système circulatoire général, à l'origine de dommages graves de différents organes, voire de leur défaillance pouvant entraîner la mort. Dans ce processus inflammatoire de type « orage cytokinique », observé par exemple chez les patients atteints de la COVID-19, peu ou pas de médicaments efficaces sont actuellement disponibles.

Notre équipe a développé une molécule de synthèse, que nous appellerons Mx. Cette molécule diminue le profil inflammatoire des macrophages in vitro, et a récemment démontré sa très grande efficacité in vivo dans un modèle murin de septicémie induit par le LPS, en restaurant complètement la survie des animaux. Ces résultats suggèrent que Mx pourraient être utilisés dans un très grand nombre de pathologies inflammatoires. Il est important de souligner, qu'à des doses efficaces, Mx n'induit aucune toxicité in vitro (dans des cellules humaines primaires en culture) et in vivo (chez la souris).

Actuellement, nous souhaitons valider l'activité biologique de notre molécule dans un modèle non infectieux d'orage cytokinique. Nous allons étudier l'efficacité de la molécule Mx en préventif et en curatif sur la symptomatologie des souris dans lesquelles un orage cytokinique aura été induit en réponse à un protocole particulier de vaccination anti-tumorale.

L'effet bénéfique escompté est une réduction significative de la symptomatologie des souris permettant d'envisager une nouvelle approche thérapeutique dans les complications sévères de maladies telles que l'infection au coronavirus SARS-CoV-2.

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

Remplacement : nous avons dans un premier temps réalisé des expériences in vitro qui nous ont permis d'étudier le mécanisme d'action de la molécule mais seul un modèle vivant tel que la souris, récapitulant la complexité du vivant permettra de vérifier l'efficacité thérapeutique de Mx au cours du CRS.

Réduction : Pour ces expériences nous aurons besoin de 208 souris. Ce nombre est le minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement valides, condition nécessaire pour une interprétation biologique des résultats.

Raffinement : les animaux seront surveillés dès leur entrée dans l'étude avec pesée et prise de température tous les jours. Tout au long des expériences, une surveillance régulière et rapprochée ainsi que la mise en place de soins supports permettront de limiter la souffrance des animaux; les points limites sont définis de façon à éviter rapidement toute douleur ou stress aux animaux.

19126 Les infections ostéo-articulaires (IOA) sont des infections qui posent un problème majeur de santé publique (> 40. 000 cas par an en France, plus d'un million dans le monde), et pour lesquelles les options de traitement actuelles sont insatisfaisantes.

Staphylococcus aureus (*S. aureus*), est la bactérie qui cause le plus d'IOA, créant une destruction osseuse et des inflammations localisées (ostéomyélite). De plus en plus de souches de *S. aureus* sont résistantes aux antibiotiques existants, et ce pathogène est désormais l'une des causes principales d'infections acquises en milieu hospitalier. .

Au-delà des difficultés diagnostiques, les chirurgiens font face à un problème de "précision" dans le traitement chirurgical de ces infections. Dans le cas d'une IOA nécessitant une amputation, il est actuellement impossible de savoir précisément où se situe le foyer infectieux au niveau de l'os, et donc où le sectionner. Le développement d'une technique d'imagerie adaptée qui permettrait une visualisation de l'os endommagé et du site infectieux représente un enjeu majeur pour minimiser l'ampleur de l'opération chirurgicale, et donc les conséquences qu'elles peuvent avoir sur la motricité du patient.

Ce modèle donne l'opportunité de tester l'utilisation d'IRM (et optimiser les séquences d'acquisition) pour révéler la présence passée ou présente de *S. aureus* dans l'os par la détection des dommages osseux. Il permettra de déterminer si des dommages osseux peuvent être détectés dans d'autres os que les fémurs. Il permettra aussi de déterminer si l'IRM peut permettre de mesurer l'étendue du foyer infectieux avant chirurgie. En plus de l'imagerie, un prélèvement sanguin permettra de mesurer la charge infectieuse et donc son éventuelle corrélation avec les dommages osseux. En analyse terminale après l'IRM, les os seront prélevés et la présence (et la charge) de bactéries au niveau de l'os sera mesurée pour chaque souris étudiée. Ceci nous permettra de conclure si une relation peut être établie entre les dommages osseux observés par IRM et la présence de bactéries au niveau de l'os, voire d'une partie de l'os.

Pour cette étude, nous utiliserons un modèle murin d'infection à *S. aureus* qui reproduit l'IOA associée à *S. aureus* chez la souris. Ce modèle déjà développé est utilisé dans plusieurs laboratoires européens. A la suite d'une infection par *S. aureus* (réalisée par voie intraveineuse sous anesthésie gazeuse), les souris subissent une perte de poids pendant les 3-5 premiers jours pouvant entraîner l'atteinte d'un point limite, et seront donc surveillées quotidiennement. Après le cinquième jour, elles commencent à reprendre du poids. Le modèle mimant les IOA, *S. aureus* entraîne également des destructions osseuses chez la souris, se caractérisant par une réduction de la densité osseuse. Ces dommages osseux ne touchent pas l'ensemble des os de la souris, mais

seulement ceux où les bactéries s'implantent. Ces dommages corporels peuvent entraîner, de manière rare, des difficultés pour se mouvoir. En cas d'observation de ces signes cliniques et afin d'améliorer le bien être des souris, nous pourrions mettre à disposition de l'eau et de la nourriture directement dans la cage. Après une surveillance quotidienne pendant la phase aiguë (jusqu'à J10), les souris sont ensuite surveillées deux fois par semaine.

L'utilisation de ce modèle murin d'ostéomyélite permettra de déterminer si une analyse par IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) permet de détecter finement les dommages osseux associés à une infection chronique à *S. aureus* et permet de mesurer l'étendue du foyer infectieux avant chirurgie. L'IRM est réalisée sous anesthésie 10, 20 ou 30 jours post-infection qui correspondent à différents temps de chronicité qui suivent la phase aiguë. L'IRM utilisée est semblable à celles utilisées en clinique, la séquence obtenue par IRM sera facilement transposable en routine clinique quotidienne chez l'homme.

Le projet nécessitera l'utilisation de 90 souris. Le choix du modèle souris est imposé par son utilisation dans les tests pré-cliniques des compagnies pharmaceutiques et par la nécessité de pouvoir utiliser des animaux génétiquement modifiés. La réponse immunitaire induite lors de l'infection par *S. aureus* et les dommages dans l'os causés par les bactéries sont des phénomènes biologiques complexes faisant intervenir de nombreuses cellules immunitaires différentes et une organisation spatiale qui rend impossible son étude dans des tests in vitro.

Des études préliminaires in vivo ont permis montrer que le pourcentage de souris dans lesquelles *S. aureus* persiste et l'infection devient chronique est proche de 50%. Le nombre d'animaux utilisés est réduit au minimum en tenant compte de cette donnée, afin que les groupes de souris soient suffisants pour l'interprétation statistique des résultats.

19127 Les troubles du spectre autistique (TSA) résultent d'anomalies du neurodéveloppement qui apparaissent précocement au cours de la petite enfance et persistent à l'âge adulte. Ils se manifestent par des altérations dans la capacité à établir des interactions sociales et à communiquer, ainsi que par des anomalies comportementales (réticence au changement, répétition de comportements). Avec près d'une naissance sur 100 en Europe, les cas de TSA représentent un handicap lourd non seulement pour l'enfant qui en est atteint mais aussi pour son cercle familial. Alors que la composante génétique est impliquée dans 25% des cas, le rôle des facteurs environnementaux ainsi que leur interaction avec les facteurs génétiques restent peu étudiés. Plusieurs facteurs ont ainsi été incriminés tels que des infections virales ou l'exposition à certains médicaments (acide valproïque (VPA)) au cours de la grossesse. Plus récemment, le rôle de certains polluants environnementaux dans l'émergence des TSA a été souligné dont les retardateurs de flamme organobromés parmi lesquels l'HexaBromoCycloDoDecane (HBCDD). Ce polluant est d'autant plus questionné que des résultats récents obtenus chez l'Homme et chez l'animal suggèrent l'existence de signes subtiles de neurotoxicité et que l'homme y est exposé via l'alimentation et l'ingestion de poussières domestiques. L'exposition moyenne journalière en France est estimée à 0,21ng/kg de poids corporel pour un adulte et à plusieurs dizaines voire centaines de ng/kg chez le nouveau-né, le bébé et le jeune enfant. Ce projet qui est le 3e d'une série de 4 s'inscrit dans un programme visant à étudier et établir le rôle d'une exposition précoce à l'HBCDD en tant que facteur de susceptibilité facilitant l'émergence d'un phénotype autistique dans un modèle pharmacologique d'autisme chez le rat qui est le modèle valproate. Le présent projet a donc pour objectif de développer un modèle de TSA via un schéma d'administration du VPA qu'il convient de valider sur la base des critères suivants : 1) administrer le VPA à une dose et selon une voie permettant d'obtenir les taux circulants de VPA induisant l'émergence d'un phénotype autistique tout en garantissant le bien-être de la femelle alors gestante et la survie des jeunes, et 2) valider l'expression des trois critères principaux d'expression d'un trouble autistique chez le raton que sont le déficit d'interactions sociales et la stéréotypie, l'atteinte de la sensorialité olfactive et de la somesthésie (perception des stimulations mécaniques ou thermiques) et l'hyperactivité et l'hyper-anxiété. Les doses et modalités d'administration ainsi que l'absence de toxicité chez les rates ont été validées dans les 2 projets précédents chez des animaux non gestants. Ce projet d'une durée de 3 ans inclura 40 rats femelles Wistar gestantes et 10 mâles reproducteurs ainsi que leurs

descendants. Chaque portée sera limitée à 10 ratons, soit un total 400 jeunes. A ce nombre il conviendra d'ajouter 18 rats de 45 jours (9 femelles et 9 mâles) qui seront utilisés dans un test de sociabilité. Le protocole impliquera donc un total de 468 animaux. Les 40 rates adultes seront réparties en 4 groupes expérimentaux (n=10 par groupe). Un groupe de 10 femelles sera administré quotidiennement par voie orale avec l'HBCDD pendant 42 jours (21 jours de gestation et 21 jours d'allaitement), les 3 autres groupes recevant un volume équivalent du véhicule qui est l'huile d'avocat. Au 12e jour de gestation, un des trois groupes véhicule recevra une dose unique de VPA par voie i. p. tandis que le second recevra par voie orale à raison de 3 administrations successives la même dose de VPA à une heure d'intervalle. Les groupes HBCDD et contrôle ne recevront que le véhicule du VPA (eau stérile). Le développement d'un phénotype autistique sera évalué via plusieurs tests comportementaux réalisés chez le raton (au cours des 3 premières semaines de vie postnatale, 2 procédures légères) et au stade de jeune adulte (au cours des 4 semaines suivant le sevrage, 3 procédures légères et 1 modérée). Les animaux seront mis à mort selon les recommandations éthiques au 21e jour de vie postnatale (les 40 mères ainsi que 240 ratons) et à l'issue des tests comportementaux (les 160 animaux restants) afin de prélever les organes. Raffinement : les rates gestantes puis allaitantes seront hébergées individuellement dans des portoirs ventilés. Les cages ont une surface de 1500 cm² et une hauteur 18 cm minimum. Les portées seront ensuite hébergées avec les mères jusqu'au sevrage des petits puis les mères seront retirées des cages. L'eau et la nourriture seront disponibles ad libitum. Les cages seront maintenues dans des conditions d'hébergement contrôlées (température 22+/-2°C, humidité 55+/-5%, cycle lumineux 12h/12h, lumière allumée à 19h). Le milieu sera enrichi avec des feuilles de papier absorbant, de manière à éviter le grignotage des matières plastiques des objets habituellement utilisés qui contiennent des substances pouvant interférer avec l'HBCDD. Les animaux seront surveillés quotidiennement et les points limites suivants relevés (diminution de la consommation alimentaire et hydrique, ralentissement de la prise de poids, modifications de l'apparence physique externe et du comportement de l'animal). Si l'un de ces points limites vient à apparaître, l'animal sera isolé et surveillé, voire mis à mort selon une méthode réglementaire (injection létale) en cas de persistance de l'état de mal-être de l'animal. Remplacement : ce travail nécessite le recours à l'animal entier pour mimer la complexité comportementale et cérébrale des TSA tels que ceux observés chez l'Homme, justifiant le recours à ce type de modèle pour cette étude. Réduction : le nombre d'animaux prévu pour cette étude est de 50 rats adultes (40 rates gestantes et 10 mâles reproducteurs) ainsi que la descendance obtenue (400 ratons) et 18 jeunes rats (9 femelles et 9 mâles) qui serviront d'intrus pour le test d'interaction sociale. Les 40 rates seront utilisées pour l'expérience proprement dite, nombre estimé juste, nécessaire et suffisant pour garantir la qualité des résultats tout en minimisant le nombre d'animaux qui sera utilisé pour l'expérience. Après le sevrage, les femelles seront mises à mort pour analyse des tissus. En ce qui concerne les mâles, ils seront renouvelés en fonction de l'avancement du plan d'expérience de manière à assurer un taux de reproduction maximal. Une mise en retraite ou réaffectation à d'autres projets (enseignement) pourront être envisagées.

19128 1. Objectif du projet :

Le Toll-like-récepteur-3 (TLR3) est exprimé par les cellules immunitaires et épithéliales normales ainsi que de très nombreux cancers solides. L'activation de ce récepteur entraîne la mort spécifique des cellules cancéreuses, ainsi qu'une inflammation ayant un effet antitumoral. La conjugaison de ces deux mécanismes induit une autovaccination contre la tumeur. Malgré cette efficacité clinique reconnue, aucun activateur de ce récepteur n'a jusqu'ici obtenu l'autorisation de mise sur le marché en raison de manque d'homogénéité (taille, structure...), d'effets toxiques ou de manque d'efficacité. Une nouvelle famille de médicament ciblant le TLR3 a récemment été découverte et brevetée (dont le candidat médicament de cette étude), car elle est homogène, active, spécifique et très peu toxique.

Les études d'efficacité doivent donc passer par des modèles possédant un système immunitaire complet, comme la souris. C'est ainsi qu'un premier modèle de cancer de la vessie (MBT2-C3H/HeN), a permis d'objectiver l'efficacité de ce nouveau médicament permettant à un tiers des

souris traitées d'être en rémissions tumorale complète, avec un fort allongement de la de survie. Surtout, près d'un quart des souris traitées sont autovaccinées à très long terme et résistent à des récurrences tumorales plus de 20 mois après leur traitement (sans traitement supplémentaire). Cependant, ces résultats ont été obtenus avec des administrations locales du candidat médicament, en injections intratumorales.

Dans ce contexte, ce projet consiste à administrer par perfusions intraveineuse le candidat médicament TL-532, à trois différentes doses. Pour ce faire, nous utiliserons le même modèle de cellules cancéreuse de vessie MBT2, injectées en sous-cutané sur le flanc, sur 63 souris C3H/HeN pré-cathétérisées.

Cette étude, preuve de concept, permettra d'analyser :

- 1/ l'efficacité en suivant les courbes de croissance tumorale,
- 2/ la toxicité éventuelle du composé,
- 3/ l'activité mécanistique de la molécule dans les prélèvements terminaux,
- 4/ les quantités de molécule dans le plasma, et arrivant dans la tumeur après traitement via des prélèvements de sangs.

2. Conformité aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement.

La règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer) sera respectée :

- La « Réduction » du nombre d'animaux sans mettre en péril une interprétation statistique des résultats sera respectée en utilisant les méthodes statistiques adaptées aux petits nombres.

- Le « Raffinement » sera respecté grâce à une définition précises de points limites, à la fois précoces et prédictifs, par le biais d'une grille de score déjà validée et particulièrement bien adaptée. Une surveillance quotidienne des animaux permettra d'éviter toute souffrance des animaux.

La cathétérissations permet d'effectuer les perfusions sur les souris vigiles, sans aucune contention. Ce système mimera parfaitement les injections effectuées en cliniques sur les Hommes. Deux types de prélèvements seront effectuées pour voir la toxicité éventuelle du composé : (i) Un prélèvement de 200ul de sang lors de la première et quatrième perfusion. Ce prélèvement, par le biais du cathéter, s'effectuera donc sur souris vigiles, sans contention, et ne causera aucune souffrance à l'animal. (ii) Les prélèvements sanguins terminaux seront pratiqués sous anesthésie générale avec antalgie, suivis d'une mise à mort sans réveil. Les tumeurs et organes lymphoïdes seront récupérés post-mortem pour des analyses poussées.

- Ces expériences sur petits animaux ne peuvent pas être "Remplacées". Seul un modèle in-vivo sera à même de mimer les effets une administration en perfusion intraveineuse et de démontrer l'efficacité antitumorale et autovaccinal de ce candidat médicament au cours des différentes étapes de la progression tumorale.

Ce projet s'inscrit donc dans le cadre de développement d'une application thérapeutique chez le patient.

19129 La sclérose en plaques (SEP) est une maladie auto-immune affectant le système nerveux central (SNC, comprenant le cerveau et la moëlle épinière). Dans une maladie auto-immune, le système immunitaire se dérègle et attaque l'organisme. La SEP se caractérise par des troubles moteurs (fonctionnement des membres), sensitifs (fonctionnement des sens) et cognitifs (fonctionnement mental, mémoire, apprentissages). Cette maladie touche plus de 2,3 millions de personnes dans le monde, avec environ 5000 nouveaux cas diagnostiqués en France chaque année.

Les patients atteints de SEP ont une qualité de vie extrêmement altérée selon l'intensité et la fréquence des poussées.

A ce jour, les traitements disponibles permettent de réduire les signes cliniques en bloquant l'inflammation. Ces traitements ralentissent la progression de la maladie, mais leur efficacité est limitée. Il n'existe pas de traitement efficace contre les formes chroniques de SEP. La découverte des cellules T régulatrices (Treg) a permis d'initier de nouvelles stratégies thérapeutiques, particulièrement pour les formes chroniques de SEP.

Il existe de nombreux modèles expérimentaux chez l'animal, comme l'Encéphalite Auto-immune Expérimentale (EAE) induite chez la souris. Dans ces modèles, les souris présentent une paralysie progressive des membres arrière puis des membres avant, accompagnés de la destruction de la gaine de myéline (démýélinisation). Les souris développent donc les signes d'atteintes neurologiques qui ressemblent aux signes cliniques de la SEP chronique chez l'humain (difficultés motrices). Dans ces modèles expérimentaux, il a été montré que ces cellules Treg étaient capables de réduire l'inflammation. De plus, il a également été démontré que les Tregs étaient capables de stimuler les processus de remýélinisation (réparation des lésions de la myéline), réduisant ainsi le nombre de lésions au niveau du SNC. Nous mettrons en place ces modèles expérimentaux dans 2 souches de souris.

Afin de rendre cette approche encore plus efficace, nous avons décidé de modifier génétiquement les cellules T régulatrices. Notre objectif est que ces cellules Treg génétiquement modifiées puissent agir de manière spécifique et locale au niveau du SNC. Nous espérons que ce ciblage précis des Tregs permettra d'augmenter le potentiel thérapeutique.

Pour donner suite à un précédent PEA autorisé par le ministère, nous souhaitons rajouter 2 procédures afin de compléter notre étude et obtenir les données précliniques demandées par les autorités sanitaires avant d'entrer en phase de test chez l'humain. Nous testerons cette nouvelle thérapie cellulaire dans les modèles humanisés d'EAE chez deux souches de souris immunodéficientes. Les animaux recevront des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) humains de donneurs sains et immunisés avec des antigènes de myéline. Le projet consiste donc à évaluer le bénéfice thérapeutique des Tregs génétiquement modifiés ainsi que leur distribution et éventuelle toxicité. Les règles d'expérimentation sont comme suit : (Remplacer) : l'emploi des modèles in vivo est nécessaire au projet car il n'existe pas à l'heure actuelle de méthodes alternatives permettant de reproduire in vitro la complexité des mécanismes immunologiques mis en place lors des maladies inflammatoires du SNC. (Raffinement) : Nous veillerons à optimiser les conditions d'hébergement pour limiter l'inconfort des animaux souffrant de paralysie des membres. Un accès facilité à la nourriture et à l'eau est prévu (croquettes humidifiées et gel hydrique) dès l'apparition d'animaux affaiblis et de paralysie. L'enrichissement est aussi réfléchi et adapté au modèle de pathologie en mettant des bâtonnets de coton facilitant le maintien du comportement naturel de la souris sans entraver leur mobilité dans la cage malgré la paralysie. Dans une approche éthique, nous prévoyons de limiter au maximum le nombre d'animaux avec des scores cliniques sévères et mettre en place des points limites adaptés. Pour les actes de prélèvement invasifs comme les prélèvements sanguins, nous utiliserons un anesthésique local pour limiter la douleur. (Réduction) : afin de réduire le nombre d'animaux utilisé, chaque groupe contiendra le nombre de souris minimum indispensable à l'obtention de résultats statistiquement significatifs. Seuls les Tregs génétiquement modifiés montrant l'activité désirée in vitro seront testés in vivo afin de réduire le nombre de souris utilisé. L'ensemble du projet nécessitera au maximum l'utilisation de 332 souris.

19130 Les fonctions du système nerveux central sont principalement expliquées par le rôle prépondérant que jouent des cellules nerveuses. De plus en plus de preuves scientifiques indiquent qu'outre les cellules nerveuses, les cellules immunitaires résidentes du système nerveux central pourraient jouer un rôle prépondérant dans l'équilibre du système nerveux central et sa capacité à modifier son fonctionnement pour maintenir un fonctionnement optimum en cas de changement de l'environnement (Ex perte de goût ou d'odorat. . .). Pourtant les mécanismes et les voies de signalisation par lesquelles les cellules nerveuses et immunitaires interagissent sont peu connus. Le but de ce projet est de déterminer le rôle des cellules immunitaires dans ces mécanismes de plasticité et du maintien de l'équilibre du système nerveux. Nous étudierons les cellules immunitaires grâce à un modèle de souris transgénique. Les mouvements des prolongements des cellules immunitaires seront étudiés par imagerie cellulaire sur des animaux vigiles habitués à la contention. L'étude des mouvements des cellules immunitaires nous permettra de mieux comprendre les mécanismes cellulaires qui se produisent pendant la réorganisation du système nerveux suite à des privations sensorielles.

Il s'agit d'un projet de recherche fondamental dont les résultats bénéficieront à la connaissance générale du système nerveux central, et permettront de mieux comprendre les interactions entre le système nerveux et le système immunitaire. Les résultats attendus de cette recherche permettront de mieux comprendre les processus cellulaires conduisant aux pathologies neurodégénératives du système nerveux central et aux troubles engendrés par l'auto-immunité.

Chaque animal recevra une chirurgie sous anesthésie générale permettant la pose d'un implant crânien, une analgésie est prodiguée aussi longtemps que nécessaire jusqu'à la récupération totale de la chirurgie en général 48 heures maximum. Les souris seront ensuite habituées à l'immobilité par renforcement positif (récompenses) afin d'être imagées au travers du crâne, notre approche est donc non invasive et à ce titre très bien tolérée par les animaux. Les différentes molécules seront injectées par voie intrapéritonéale. Les molécules sont issues de la pharmacopée utilisée chez l'homme et donc avec peu d'effets secondaires indésirables. Afin d'entraîner une plasticité des modalités sensorielles de façon physiologique, une privation de la vue temporaire sera réalisée. La procédure est classée modérée.

Cette étude sera réalisée en respectant la règle des 3R. Le nombre de souris utilisé sera contenu (280 souris pour 5 ans). Notre étude impose des conditions physiologiques et une absence d'inflammation ce qui nous contraint à l'utilisation d'un modèle *in vivo* non-invasif. Une fois les voies de signalisations identifiées, l'étude des mécanismes sera réalisée *in vitro* (Remplacer et Réduire). En termes de raffinement, il est à noter que ce modèle peu invasif ne semble pas induire de stress ou de souffrance des souris. Néanmoins, nous veillerons à limiter le mal être des animaux par un enrichissement de leurs conditions de vie, en raffinant notre procédé de contention et en réalisant des habituations de nos souris à la manipulation. En complément, le bien-être des animaux sera évalué de façon quotidienne (posture, poids, toilettage). Les privations visuelles peuvent être obtenues par différentes méthodes nous avons porté une attention particulière à cette procédure et choisi l'approche la moins traumatisante possible pour l'animal. Nous allons privilégier la prise orale des composés pharmaceutiques quand c'est possible, au lieu de l'administration par injection qui peut être une source de stress pour l'animal. Avec cette approche nous voulons tirer parti des avantages qu'apporte la souris (les modèles génétiques) pour améliorer notre compréhension des mécanismes cellulaires mis en jeu durant les sollicitations sensori-motrices.

19131 Ce projet s'inscrit dans l'étude des conséquences chez l'adulte d'une naissance à un stade prématuré et notamment l'apparition de maladies métaboliques comme le diabète et l'obésité. En effet il a été montré dans l'espèce humaine que les naissances prématurées dues à une infection de la mère ou du fœtus conduisent chez l'adulte à une augmentation de la prévalence du diabète de type 2 (DT2) et de l'obésité. Les causes sont encore mal connues mais une hypothèse est que l'exposition à des cytokines inflammatoires pendant l'infection peuvent perturber le développement cérébral du nouveau né ce qui peut avoir pour conséquence à l'état adulte de perturber en partie le contrôle nerveux de la balance énergétique et consécutivement induire un risque plus important de développer un diabète. Il existe un modèle original de souris qui mime l'inflammation postnatale que l'on trouve chez certains prématurés. Brièvement, pendant les 5 premiers jours après la naissance, les souriceaux reçoivent une injection quotidienne d'une interleukine (IL1) qui va reproduire ce qu'on observe dans l'espèce humaine. Ce sont ces souris devenues adultes que nous étudierons dans notre laboratoire. Ces souris que nous recevrons à 4 mois d'âge seront soumises à un régime standard ou hyperlipidique pendant 4 mois. Pendant cette période nous suivrons l'évolution de plusieurs paramètres métaboliques, tels que le poids, la consommation alimentaire, la tolérance au glucose, la sensibilité à l'insuline. Notre hypothèse est que les souris ayant reçu l'injection d'IL1 à la naissance auront plus de risque de développer une obésité et un DT2 lorsqu'on les soumettra à un régime hyperlipidique comparées à leurs congénères contrôles. Nous utiliserons 16 souris (8 souris contrôle injectées avec un placebo et 8 souris injectées avec IL1).

Ce travail s'effectuera bien sûr dans le respect de la règle des 3Rs. Nous ne pouvons malheureusement pas remplacer ces expériences précliniques. Nous sommes effectivement obligés d'utiliser des souris car nous suivons l'évolution de paramètres métaboliques pendant des mois et aucun système de remplacement n'existe actuellement pour reproduire ce qui se passe chez

un organisme entier. Nous réduirons le nombre d'animaux autant que faire se peut, notamment en estimant précisément le nombre d'animaux en fonction des paramètres mesurés pour permettre l'analyse statistique des résultats. Enfin, nous observerons quotidiennement les animaux et serons en contact étroit avec le personnel de l'animalerie pour veiller au bien-être des animaux et prévenir toute douleur ou mal-être.

19132 Titre du projet : Etude des bases neuro-physiologiques de la cognition sociale chez le primate

Durée : 5 ans

Type de projet : Recherche fondamentale

Mots-clés : Socialisation, amygdale, cortex cérébral, ocytocine, primate

Objectifs : La capacité remarquable de notre espèce à établir et entretenir des relations sociales repose sur des compétences affectives et cognitives complexes dont les mécanismes sont encore mal connus. Certains comportements tels que le contact oculaire, le suivi du regard ou l'attention conjointe, constituent des marqueurs précoces de la sociabilité adulte, de notre capacité à représenter les états mentaux et prédire les actions d'autrui et plus largement, à interagir de façon mutuellement bénéfique avec nos congénères. Plusieurs troubles neuropsychiatriques comme l'autisme, la dépression et les troubles anxieux sont en lien avec ce type de spécialisations cognitives. Ce projet a pour objectif d'améliorer la connaissance des circuits nerveux impliqués dans la perception et l'utilisation des signaux sociaux, de déterminer la contribution de structures clés, dont l'amygdale, le colliculus supérieur et certaines régions du cortex cérébral, et d'étudier le rôle régulateur de l'ocytocine, une neuro-hormone hypothalamique impliquée dans les comportements que nous observerons. A cette fin, nous associerons des approches électro-physiologiques (enregistrement de l'activité neuronale), pharmacologiques (perturbation temporaire de la signalisation ocytocinergique) et cognitives lors d'expériences menées chez le macaque, un primate non-humain dont le répertoire de comportements sociaux et les circuits cérébraux qui les sous-tendent sont proches des nôtres.

Bénéfices attendus : L'étude apportera des connaissances nouvelles sur la fonction des structures cérébrales étudiées en relation avec les comportements sociaux. Elle permettra en outre de mieux définir les cibles et l'action de l'ocytocine, qui sont encore mal connues chez le primate. A moyen et long terme, ces expériences auront des applications cliniques pour certaines conditions neuropsychiatriques touchant les émotions et les conduites sociales, dont les troubles du spectre autistique.

Espèce utilisée : Macaque rhésus (*Macaca mulatta*) et/ou macaques crabiers (*Macaca fascicularis*) au nombre de 12.

Niveau de sévérité : Niveau de sévérité : Les animaux seront soumis à une craniotomie et la pose d'implant pour effectuer des enregistrements neuronaux et des injections d'agents pharmacologiques. Ces procédures qui sont faites sous anesthésie générale, suivies des enregistrements/perturbation d'activité, conduisent à être classées comme modérées. Il n'est pas démontré que l'effet cumulatif de ces procédures soit délétère pour la santé des animaux. La finalité de projet nécessite une participation active et volontaire des animaux sur de longues périodes et la qualité des données recueillies dépend du maintien d'un niveau de bien-être élevé tout au long de leur parcours dans le projet. Ceci permet qu'à la fin des procédures, les implants soient retirés ne laissant que peu de séquelles des procédures (hormis la craniotomie sous la peau et une cicatrice) et que les animaux soient ensuite replacés en sanctuaire, sauf pour deux d'entre eux qui seront mis à mort afin de réaliser des analyses histologiques.

Application des 3R : (1) Remplacement. Dans notre cas, le remplacement des primates par d'autres espèces vertébrées ou non vertébrées, voire par d'autres espèces de primates n'est pas encore possible. Les humains ne peuvent pas être utilisés en raison de la nature invasive des méthodes expérimentales. (2) Réduction. La taille estimée de la cohorte pour cette étude a été définie en prenant compte de l'impératif éthique d'utiliser le moins d'animaux possible et en fonction des pratiques courantes du domaine pour obtenir des résultats significatifs et généralisables. (3) Raffinement. Plusieurs éléments de raffinement sont mis en œuvre : pré-entraînement des animaux

en salle de stabulation visant à réduire le temps et le stress induit par l'apprentissage en laboratoire ; recours à des implants moins invasifs sans ciment osseux, moins sensibles aux infections et réalisés sur mesure pour chaque animal; utilisation de microélectrodes à contacts multiples permettant d'augmenter le rendement des enregistrements et de réduire le nombre de sessions et l'impact cumulatif de la procédure, conduite d'expériences en conditions semi-éthologiques sans contrainte physique ; recours à l'imagerie (IRM et TEP), qui se substitue pour la plupart des animaux à l'histologie post-mortem et permet d'envisager leur remplacement en sanctuaire à l'issue des expériences.

19133 Dans la plupart des régions cérébrales, les neurones sont générés pendant l'embryogénèse. A l'inverse, dans le gyrus denté (GD) de l'hippocampe –une région clé pour la mémoire et la régulation des états émotionnels-, la majorité des neurones granulaires (NGs) est générée en période postnatale précoce et cette production neuronale se poursuit tout au long de la vie adulte, faisant du GD une structure singulière du cerveau. Le GD à l'âge adulte est donc composé de NGs ayant des dates de naissance différentes (vie embryonnaire, postnatale précoce ou adulte) constituant des sous-populations de NGs qui pourraient jouer différents rôles dans la physiologie de l'hippocampe et contribuer différemment aux fonctions du GD. Étonnamment, cette hypothèse a reçu peu d'attention et bien que la plupart des NGs soient produits pendant le développement, on en sait peu sur leurs propriétés par rapport aux neurones nés à l'âge adulte. Dans ce contexte, ce projet vise à mieux caractériser les NGs développementaux (nés en période embryonnaire et postnatale précoce) d'un point de vue comportemental et ainsi déterminer leur implication dans les fonctions de l'hippocampe.

Pour ce faire nous utiliserons deux lignées de souris transgéniques permettant de manipuler spécifiquement les NG développementaux. Ces deux lignées permettent de manipuler spécifiquement les populations d'intérêt par approche virale et d'en explorer le rôle fonctionnel en explorant les conséquences de ces manipulations sur la mémoire, l'état d'anxiété mais aussi le comportement social.

Pour ce projet, nous estimons utiliser 748 souris au total. Afin de respecter la règle des 3R, des procédures seront développées de façon à réduire au maximum le nombre et l'inconfort des animaux. Aussi, dans un souci de respect du R de réduire, nous prévoyons d'utiliser le nombre minimal de souris nécessaire pour obtenir des analyses statistiques fiables et cohérentes, nombre dépendant de la technique utilisée. Dans le respect du R de raffiner, un soin particulier sera accordé à l'observation des animaux et à leurs conditions d'hébergement, en particulier lors des périodes post chirurgicales. De plus, des traitements appropriés (anesthésie, anti-douleur) seront utilisés pour pallier la douleur associée aux opérations chirurgicales. N'existant pas de modèle in vitro permettant de reproduire l'environnement complexe caractéristique du gyrus denté, cette étude ne peut être réalisée que chez l'animal in vivo.

19134 Les leishmanioses sont des maladies parasitaires en pleine expansion du fait du réchauffement climatique et des mouvements de populations depuis les zones d'endémie. La leishmaniose cutanée est une zoonose transmise aux humains par un insecte volant, le phlébotome. La maladie se manifeste par des ulcérations cutanées localisées et disgracieuses, pouvant conduire à des surinfections. Cette maladie est liée à la pauvreté et se retrouve au Moyen Orient, Afrique du Nord et Sud saharienne, Sud de l'Asie centrale et Amérique du Sud. Entre 0.7 et 1.2 million de personnes sont atteints chaque année.

Les médicaments actuels sont toxiques, notamment les dérivés de l'antimoine qui sont injectés en intralésionnel et ils sont par ailleurs responsables de chimiorésistance. De ce fait, la recherche de nouveaux médicaments est urgente.

Dans le cadre de programmes de recherche, l'objectif étant de découvrir de nouveaux candidats-médicaments contre la leishmaniose cutanée, nous évaluerons l'activité de formulations préparées à partir de substances soit d'origine naturelle, soit de synthèse et qui sont des inhibiteurs de voies métaboliques spécifiques au parasite, à l'aide du modèle animal *Leishmania major* chez la souris BALB/c, avant de lancer le développement d'un nouveau traitement chez l'homme.

Au préalable, après un premier criblage de cytotoxicité et d'activité in vitro sur le parasite en culture, seules les substances les plus actives et les moins cytotoxiques, c'est à dire présentant un indice de sélectivité acceptable, seront formulées pour une administration orale, intraveineuse ou transcutanée selon le cas et évaluées pour leur capacité à réduire la charge parasitaire sur le modèle murin de leishmaniose cutanée à *L. major*. Ainsi, la capacité de ces substances formulées à réduire significativement la charge parasitaire chez des souris infectées sera appréciée en comparaison des groupes de souris témoins infectés et traités ou non avec un médicament de référence, la miltéfosine. Seul un modèle in vivo permet de vérifier la validité du concept. Le modèle in vivo est ainsi incontournable car les modèles in vitro ne permettent pas de prendre en compte les barrières pharmacologiques rencontrées chez l'animal, ainsi que la métabolisation, auxquelles sont soumises les substances à évaluer. Dans un premier temps, une appréciation de la dose maximale tolérée sera faite sur souris Swiss afin de ne pas traiter des lots d'animaux infectés à des doses toxiques; cette évaluation de dose maximale tolérée est incluse dans un autre projet APAFiS actuellement opérationnel. Les modèles de leishmanioses expérimentales couramment utilisés sont des souches de *Leishmania major* chez la souris BALB/c. La souris BALB/c est naturellement sensible à ce type d'infection, ce qui en fait un modèle de choix reconnu par la communauté scientifique internationale.

Nous estimons le nombre d'expérimentations annuelles à 12 (4 principes actifs évalués avec leurs formulations et expériences répétées 3 fois). Ainsi, 4580 souris BALB/c seront utilisées sur 5 ans. Les lots de souris infectées seront traités par voie intrapéritonéale dans un premier temps, puis orale, intraveineuse, ou par application topique selon le cas. Une planification statistique préalable permettra de réduire le nombre d'animaux tout en préservant la validité statistique de l'évaluation d'activité antileishmanienne.

Dans le cadre du bien-être des animaux, toute intervention invasive sera précédée d'une anesthésie afin d'éliminer la sensation de douleur. L'état général des souris sera contrôlé quotidiennement et des actions adaptées seront mises en place si nécessaire

19135 CONTEXTE :

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

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

OBJECTIFS :

L'objectif de ce projet est l'analyse de la part génétique dans la variabilité observée de la quantité de foie gras produite après stimulation de l'hyperphagie.

DISPOSITIF EXPERIMENTAL :

Cette saisine vient compléter un projet précédemment autorisé. En 2020, nous avons conduit un essai impliquant 552 animaux de généalogie connue afin d'estimer la part génétique de la variabilité de consommation et de poids de foie observée. Nous voudrions recommencer cet essai afin d'avoir une meilleure puissance d'évaluation de la part de la génétique dans la variabilité d'engraissement spontané du foie. Il est en effet préférable de recueillir les données sur deux générations successives pour confirmer les valeurs estimées.

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

- Un lot de 552 animaux de pedigree connu a posteriori, issus de la même population que précédemment sera analysé, afin de pouvoir estimer des paramètres génétiques avec suffisamment de précision. Cet effectif est indispensable pour compléter le lot élevé en 2020.
- Chaque lot est constitué de 12 loges de 46 animaux des deux sexes où les oies ont un accès à une mangeoire collective permettant la pesée quotidienne de l'aliment distribué et la part non consommée. Les animaux sont rationnés en fin de croissance (16 semaines) avant un relâchement de 10 semaines. Les oies sont toutes abattues la 27-ième semaine, à la fin de la période de relâchement. Un grand nombre de mesures et analyses seront conduites sur les carcasses et les tissus (foie, muscle, ...) prélevés sur les animaux abattus.
- Les cycles lumineux seront contrôlés, simulant la période pré-migratoire automnale par un raccourcissement de la durée du jour.
- Une prise de sang sera effectuée à 14 semaines pour doser des composants sanguins. Leur évolution sera constatée après dosage du sang recueilli à l'abattoir à la fin de l'expérimentation.

RESPECT DU PRINCIPE DES 3 R :

- Remplacement : L'étude, à visée agronomique, porte sur la faisabilité d'une alternative au gavage et ne peut se dispenser de mesurer les animaux concernés.
- Réduction : Par la modélisation du fonctionnement de la population concernée, nous avons déterminé quels effectifs mettre en place. Nous nous sommes attachés à garantir la qualité statistique des paramètres estimés (biais minimal, précision maximale) avec le moins d'animaux possible. Dans la mesure où le pedigree n'est connu qu'a posteriori au moyen de marqueurs moléculaires (ce qui permet la reproduction des parents au sol dans des parcs) la précision recherchée sera atteinte avec la mesure (autrement dit l'abattage) de 552 animaux de généalogie connue.
- Raffinement : Aucune procédure occasionnant douleur ou détresse ne sera appliquée aux animaux. Au contraire, les animaux sont élevés en groupes, au sol. Ainsi l'oie, qui est un animal hautement grégaire, peut exprimer des comportements sociaux. L'unique prise de sang sera réalisée par des personnes formées. Le faible volume prélevé sera sans incidence sur la santé de l'animal. Une contention douce sera réalisée en veillant à l'immobilisation des ailes pour éviter toute réaction pouvant occasionner des blessures. Le geste sera réalisé aussi rapidement que possible afin de ne pas prolonger le stress de contention.

19136 L'infarctus du myocarde (IM) survient à la suite d'une mauvaise ou absence d'irrigation sanguine d'une zone donnée dans le cœur (ischémie du muscle cardiaque). C'est la cause de mortalité et de morbidité la plus répandue dans les pays industrialisés. Le cœur des mammifères a une capacité de régénération limitée et les cellules musculaires perdues après l'ischémie sont remplacées par un tissu cicatriciel qui ne peut pas contribuer aux contractions et à la fonction cardiaque. L'infarctus du myocarde est suivi par un changement de taille, de forme, de structure et de physiologie du cœur. Ce processus appelé remodelage est associé à une dysfonction ventriculaire progressive. Une connaissance approfondie des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les événements suivant l'infarctus du myocarde est essentielle pour pouvoir proposer des moyens de contrôle du processus de remodelage post-ischémique, par redéveloppement de nouvelles cibles médicamenteuses. Dans le cadre d'un PEA antérieur, nous avons démontré que la signalisation de l'acide rétinolique est activée après un infarctus du myocarde et que cette activation protège les cardiomyocytes contre la mort cellulaire causée par l'infarctus. Deuxièmement, nous avons pu identifier une cible thérapeutique pour la prise en charge de l'infarctus du myocarde. Nous avons réalisé ces travaux grâce à des modèles de souris permettant la délétion des gènes impliqués dans la voie de signalisation d'acide rétinolique. Cette étude a été soumise pour publication. Elle est actuellement en révision et le présent projet répond à une demande expresse des reviewers. Les reviewers nous ont demandé de documenter l'effet de l'infarctus du myocarde dans un modèle de souris contrôles afin d'écarter la possibilité que nos résultats soient dus à un effet non spécifique

inhérent de cette lignée. La création de infarctus expérimentale nécessaire à nos investigations entraîne une certaine mortalité post-opératoire (environ 10 %) et des douleurs thoraciques plus ou moins sévères liées à la fois à l'acte chirurgical et aux conséquences de l'ischémie cardiaque.

Afin de supprimer et/ou d'atténuer ces effets nous mettons en place les mesures suivantes :

Remplacement : Des expériences seront réalisées sur des cultures primaires de tissu cardiaque pour répondre en partie aux questions des reviewers, cependant ce modèle ne permet pas de reproduire les interactions entre différentes populations cellulaires (cardiomyocytes, cellules endothéliales, fibroblastes, cellules musculaires lisses et péricytes).

Réduction : L'expérience acquise lors de la réalisation du précédent projet nous a permis d'améliorer le protocole d'anesthésie et de prise en charge de la douleur en pré et post-opératoire. Ces améliorations permettent de réduire de 50% la mortalité post-opératoire et d'utiliser moins d'animaux nécessaire pour atteindre nos objectifs scientifiques.

Raffinement : L'administration d'analgésiques et d'antalgiques avant, pendant et après la chirurgie permet de limiter au maximum les douleurs engendrées. Ces mesures sont accompagnées de la mise en place d'un protocole d'observation permettant de déceler précocement tout inconfort des animaux durant les expériences. Ce protocole inclue la mise en œuvre de points limites précoces et adaptés permettant de mettre un terme aux souffrances des animaux le cas échéant. À cet effet, nous allons devoir utiliser 60 souris pour l'ensemble de ces travaux.

19137 Le SARS-CoV-2 est le virus responsable de la Covid-19. Ce virus hautement pathogène a été découvert en décembre 2019 dans la ville de Wuhan en Chine. En mai 2021, en France plus de 5 millions de cas ont été signalés et ce virus a entraîné la mort de plus de 100 000 personnes. A l'échelle mondiale, près de 3.5 millions de décès ont à ce jour été recensés.

L'objectif de ce projet est d'optimiser la production d'anticorps capables de neutraliser le virus SARS-CoV-2, virus responsable de la pandémie de Covid-19. Des protéines cibles de la surface du virus ont été synthétisées et modifiées par ajout d'un segment particulier, 18 protéines ont été synthétisées et 6 d'entre elles ont entraîné la production d'anticorps neutralisants, seules ou en association. Nous souhaitons maintenant déterminer la voie ainsi que le calendrier d'injection optimal. Les précédentes études nous ont appris que 7 jours d'injection suffisent pour produire des anticorps neutralisants rapidement, et qui perdurent dans le temps.

Nous projetons d'utiliser 696 souris adultes femelles.

Toutes les souris seront identifiées par une bague à l'oreille. Elles subiront 2 procédures : plusieurs prélèvements sanguins seront effectués afin de récolter du sérum dans lequel se trouvent les anticorps, et elles subiront des injections par voie intraveineuse, intramusculaire, intragastrique ou intraveineuse chaque jour pendant 7 jours. Les souris seront hébergées par groupe de 6 souris dans des cages adaptées, elles auront accès à l'eau et la nourriture. Les cages seront enrichies une semaine avec un tunnel, puis une semaine avec un igloo en plastique rouge transparent. La production d'anticorps ne peut pas être étudiée in vitro (remplacement), et le nombre de souris prévues pour ce protocole est nécessaire et suffisant pour pouvoir exploiter toutes les pistes (réduction). L'injection de protéines modifiées pour induire des anticorps spécifiques a déjà fait l'objet d'études chez les souris BalbcByJ, et tout sera mis en œuvre pour assurer leur bien-être (raffinement). Les souris seront maintenues dans un cycle jour/nuit de 12h à une température et une hygrométrie comprise entre 20 et 24°C, 35 et 75% humidité. Un contrôle visuel sera effectué tous les jours. En cas de piloérection, ventre rentré, blessure non soignable, prolapsus, présence d'une masse, diarrhée, yeux opaques, inflammés ou fermés, la tête penchée, perte de poids >15% en 2 jours, absence d'alimentation, absence d'hydratation, température corporelle <31°C, étouffements, difficultés à respirer, rythme cardiaque bas, isolement, prostration, étirements, agressivité, perte d'équilibre, déplacement circulaires ou difficiles, tremblements, les souris seront mises à mort par une méthode réglementaire.

19138 La maladie d'Alzheimer (MA) est notamment caractérisée par le dysfonctionnement d'une protéine dans les neurones du système nerveux central : la protéine Tau. Cette protéine, dont la dégradation

normale est altérée dans la maladie, s'accumule et s'agrège de façon toxique dans ces neurones et finit par entraîner la dégénérescence du cerveau. Nous avons mis en évidence qu'une autre protéine appelée ProtX interagit physiquement et de façon fonctionnelle avec Tau. Nous avons constaté que le niveau d'expression de ProtX est faible dans le cerveau de patients atteint de la MA et que cette baisse est corrélée à l'apparition des formes pathologiques de Tau dans les neurones. De plus, nous avons détecté la présence de ProtX, conjointement avec la protéine Tau anormale, au niveau des lysosomes (vésicules impliquées dans la dégradation des protéines) suggérant un rôle potentiel de ProtX dans la dégradation de Tau. Nos données récentes in vitro sur des neurones en culture montrent une implication de ProtX dans le fonctionnement de cette voie de dégradation cellulaire et par conséquent sur l'accumulation de Tau.

Nous proposons dans ce projet d'étudier le rôle in vivo de ProtX sur la progression de cette maladie de Tau. Pour cela nous disposons au laboratoire d'un modèle de souris porteur d'une mutation du gène de Tau et générant une tauopathie (maladie de Tau). Les protéines Tau ainsi exprimées chez ces souris récapitulent certaines anomalies observées dans la pathologie humaine telles que l'accumulation et l'agrégation de Tau dans les neurones du cerveau et de la moelle épinière. Il s'ensuit une mort neuronale responsable notamment d'une paralysie des membres inférieurs commençant légèrement mais progressivement dès l'âge de 4 mois. Etant donné ce trouble moteur, des mesures d'expérimentation et d'observations ont été prises pour limiter la souffrance et le stress de ces animaux comme l'accès facilité à la nourriture dès l'âge de 4 mois. Pour mener à bien ce travail, nous envisageons de faire varier l'expression de ProtX dans ces souris au niveau du cerveau mais également de la moelle épinière afin de déterminer une amélioration potentielle de la maladie dans ces souris. Nous travaillons actuellement sur des neurones en culture issue de la moelle épinière de ces souris, ce qui ne nécessite pas de travailler sur souris vivante. La modulation de l'expression de ProtX dans ces cellules nous permet d'étudier l'impact éventuel de cette variation sur la toxicité cellulaire et sur l'accumulation et l'agrégation de Tau. Néanmoins, afin d'évaluer l'implication de ProtX sur une amélioration potentielle des altérations physiques et comportementales observées chez des souris malades, le passage sur souris vivante est nécessaire. Nous pourrions, à l'issue de cette étude, définir l'impact thérapeutique potentiel de la variation de ProtX dans ce modèle de tauopathie.

Dans un souci de répondre à la règle des 3R, l'ensemble des expériences se feront dans le respect maximum du bien-être des animaux (enrichissement du milieu, utilisation d'anesthésiques et d'analgésiques pour limiter la souffrance, ...). Dans l'objectif de limiter le nombre d'animaux nécessaires, les cerveaux et moelle épinières seront prélevés et étudiés sur les animaux testés au niveau comportemental. Dans ce projet, nous envisageons de travailler sur un nombre de 424 souris. Le nombre d'animaux utilisés est limité au minimum requis tout en permettant une analyse robuste de cette étude. Néanmoins, en cas de succès rapide de nos expériences, nous mettrons fin aux expériences plus tôt que prévu, limitant ainsi le nombre d'animaux utilisés.

19139 Les développements récents de l'immunothérapie basée sur la modification des cellules du patient (CAR-T cells) sont en train de révolutionner la prise en charge et le traitement des cancers du sang. Il s'agit de modifier ex vivo les cellules immunitaires du patient pour qu'elles expriment un récepteur synthétique (le CAR) dirigé contre l'antigène CD19, leur permettant alors de reconnaître et de tuer les cellules cancéreuses exprimant cet antigène tumoral à leur surface. Cependant, le coût élevé de ces traitements qui sont patient-spécifiques, la complexité technique de leur mise en œuvre, les effets secondaires observés mais surtout l'efficacité encore limitée dans le temps entraînent un accès restreint à ces nouvelles thérapies.

Notre innovation repose sur un lentivecteur codant pour le CAR CD19 encapsulé dans des polymères chargés positivement et négativement pour former des nanoparticules biodégradables autour du lentivecteur, peu immunogènes, non toxiques et à fort pouvoir de transduction spécifique des lymphocytes T. Cette formulation permet de stabiliser le vecteur lentiviral durant son temps de résidence dans la circulation sanguine et de le protéger des attaques d'anticorps neutralisants générés par le patient et qui impactent l'efficacité de transduction. Grâce à cette technologie de CARs in vivo, il n'est donc plus nécessaire de reprogrammer les lymphocytes T ex vivo, une simple

injection suffit, le patient devenant son propre incubateur de cellules T. Les étapes lourdes et complexes de sélection des lymphocytes du patient, leur activation et leur amplification deviennent inutiles ce qui réduit drastiquement le coût du traitement, généralise sa mise en œuvre dans les centres de soins et finalement le rend accessible à tous les patients. Ce protocole d'administration par simple injection intraveineuse permet également plusieurs cycles de traitement (ce qui n'est pas le cas avec la technologie actuelle) et donc potentiellement une meilleure efficacité sur le long terme.

Dans nos modèles cellulaires nous avons mis au point les conditions de formulation de notre produit permettant de transduire de manière robuste et reproductible (45 % de cellules modifiées) les cellules immunitaires murines et humaines avec différents transgènes (GFP, luciférase, mCherry, CAR-CD19). Nous avons également démontré qu'il était possible de modifier spécifiquement ces cellules pour qu'elles expriment en surface le CAR anti-CD19. Nous avons pu démontrer dans des tests de cytotoxicité que les lymphocytes modifiés avec ce CAR-CD19 sont capables d'éliminer des cellules cancéreuses exprimant l'antigène tumoral CD19 tout en restant inactives sur des cellules CD19-négatives.

Chez la souris nous avons déjà prouvé que l'administration répétée (jusqu'à 5 injections) par voie intraveineuse (bolus et perfusions) de lentivecteurs (où le CAR CD19 est remplacé par un gène rapporteur GFP) encapsulés dans les polymères produits dans notre laboratoire est parfaitement tolérée et que ces nanoparticules permettent effectivement de transduire de manière dose-dépendante les différents types de cellules mononuclées sanguines.

Le projet d'expérimentation animale présenté ici constitue une étape cruciale du développement préclinique de notre CAR in vivo ciblant le marqueur tumoral CD19 que nous souhaitons mener jusqu'à la démonstration de sa sécurité et de son efficacité thérapeutique dans des indications de type cancers hématologiques. Ces résultats sont un prérequis avant de lancer un essai clinique de phase I/II en 2022. Il s'agit d'évaluer l'efficacité anti-tumorale lorsque notre CAR in vivo est injecté et distribué entre les différents compartiments de l'organisme dans un modèle murin de lymphome à cellules B surexprimant à leur surface le récepteur CD19. Ce projet nous permettra également de démontrer chez l'animal que la modification des cellules sanguines est bien spécifique des lymphocytes T ciblés et que notre CAR in vivo est bien toléré lors d'administrations répétées à des doses croissantes. Ces problématiques ne peuvent être abordées que via l'expérimentation animale. Aussi nous explorerons l'efficacité anti-cancéreuse, la biodistribution et la sécurité de notre produit sur des souris immunocompétentes afin de mimer le plus possible les conditions physiopathologiques humaines. Le choix de la souris Balb/c est justifié car c'est un modèle de référence en oncologie, avec des souches dont le système immunitaire a été très largement caractérisé et dont la prédictibilité a été démontrée dans de nombreuses études en immunothérapie.

Après avoir induit chez la souris Balb/c un lymphome à cellules B par injection systémique de cellules de A20 préalablement modifiées pour exprimer le gène rapporteur de la luciférase, nous nous proposons d'injecter les lentivecteurs exprimant le CAR CD19 encapsulés dans les polymères produits dans notre laboratoire à des doses croissantes et de suivre par imagerie de bioluminescence l'évolution sur plusieurs semaines du nombre de cellules cancéreuses. Une diminution au cours du temps de la bioluminescence émise par les cellules A20 reflètera l'activité anti-cancéreuse du produit. Cette étude permettra également de suivre le devenir des lentivecteurs exprimant le CAR CD19 encapsulés dans les polymères au niveau cellulaire chez la souris par cytométrie en flux. Un marquage spécifique du transgène délivré par le lentivecteur permet de suivre notre produit au cours du temps dans les différents types cellulaires sanguins. La combinaison de ces différentes techniques permet de réaliser des analyses en longitudinal et réduisent de manière importante le nombre d'animaux puisque le produit sera suivi sur 24 jours minimum pour une même souris. A l'issue de l'étude, les animaux seront euthanasiés et les principaux organes seront collectés pour analyser quantitativement la répartition du produit par une deuxième méthode complémentaire de la cytométrie en flux (qPCR).

Le nombre d'animaux a été déterminé grâce à une étude approfondie permettant une interprétation précise et significative des résultats obtenus. Cette étude nécessite 205 animaux au total. Afin de minimiser la consommation inutile des 190 souris qui pourraient être exposées à des doses

dépassant la dose maximale tolérée, nous avons prévu 6 procédures qui seront lancées de manière séquentielle après avoir vérifié que les doses et protocoles d'injections de la procédure précédente ne présentent pas de toxicité macroscopique particulière.

De manière à assurer le bien-être des animaux tout au long de l'étude, nous prendrons les dispositions nécessaires en vue de réduire et d'éviter toute forme de souffrance à l'aide de compléments alimentaires et de traitement anti-douleur adaptés. Toutes les interventions et administrations par voie intrapéritonéale, intraveineuse ou perfusion se feront sous anesthésie générale ou locale. Les points limites établis seront strictement appliqués. L'hébergement des animaux se fera dans des conditions optimales avec enrichissement du milieu et un suivi quotidien.

19140 Avec plus de 650 millions de personnes touchées dans le monde en 2016, l'obésité – définie comme un excès de masse grasse – est devenue un problème majeur de santé publique. Les patients obèses ont un risque accru de développer des complications chroniques telles que le diabète de type 2, des maladies cardiovasculaires et plusieurs types de cancer. Traiter l'obésité réduirait considérablement l'incidence de ses comorbidités. Malheureusement, les traitements médico-chirurgicaux actuels ne sont pas suffisamment efficaces à long terme. En effet, ils entraînent une perte pondérale transitoire suivie d'un rebond pondéral, c'est ce que l'on appelle l'effet yoyo. Pour tenter de mettre au point des thérapies efficaces, il est nécessaire de mieux comprendre les mécanismes biologiques responsables de cette maladie. Nous savons que l'obésité est associée à un état inflammatoire biologique et tissulaire chronique. L'inflammation des organes périphériques persiste malgré le retour à un poids normal et est impliquée dans la reprise pondérale, faisant conclure à l'existence d'une mémoire immunitaire périphérique qui pourrait expliquer pourquoi les patients obèses présentent des difficultés à perdre du poids en changeant de régime alimentaire. L'obésité liée à l'alimentation induit également l'inflammation du système nerveux central, bien avant le développement d'une obésité clinique ou de l'inflammation périphérique. Cette inflammation du cerveau liée à l'alimentation riche en calorie est spécifiquement localisée au niveau de l'hypothalamus médo-basal qui joue un rôle important dans la régulation du métabolisme énergétique. Ainsi, étant donné les ressemblances immunitaires entre le système nerveux central et les tissus périphériques, notre projet vise à déterminer s'il existe une mémoire cérébrale de l'obésité observable au sein de cellules immunitaires de l'hypothalamus, en réponse à différents antécédents d'obésité induits par l'alimentation. Nous pensons que nos recherches permettraient d'identifier l'inflammation hypothalamique liée à l'alimentation comme une cible de la mémoire obésogène et donc cette inflammation pourrait-être la cible de nouvelles thérapeutiques ayant pour but de lutter contre l'obésité et les maladies métaboliques qui y sont associées.

Pour ce faire, nous comparerons des souris nourries avec une alimentation standard à d'autres nourries avec une alimentation riche en graisse pour les rendre obèses. Certaines souris n'auront qu'un seul épisode d'obésité, tandis que d'autres seront remises sous alimentation standard puis à nouveau sous alimentation hypercalorique pour provoquer un second épisode d'obésité et modéliser ainsi l'effet yo-yo. Pour certaines expériences, des souris transgéniques seront utilisées, qui permettront de rendre certains de leurs neurones fluorescents après un traitement pharmacologique, inoffensif pour l'animal. Cela nous permettra de visualiser les neurones afin d'étudier leur activité électrique *ex vivo*. Les autres souris non transgéniques nous permettront de réaliser des études post-mortem sur leur cerveau, après 1 ou 2 épisodes d'obésité.

Au total, nous utiliserons un maximum de 216 souris sur 5 ans. La souris est le modèle de choix pour notre projet car elle permet d'étudier des individus dont la physiologie générale est suffisamment proche de celle de l'homme. Ainsi, nous pourrions obtenir des informations pertinentes sur le plan médical. De plus, les mécanismes biologiques étudiés (poids corporel et régulation de la glycémie) impliquent un processus de communication entre le cerveau et le reste du corps. Un tel processus de communication est crucial pour la régulation de l'appétit, du taux de sucre dans le sang et du stockage des graisses. Par conséquent, il est absolument nécessaire d'étudier un organisme vivant entier et aucune méthode *in vitro* ou *in silico* ne peut remplacer nos modèles murins. Conformément au principe des 3R, nous avons cependant optimisé les protocoles afin de minimiser le nombre de souris utilisées : des tests de puissance statistiques ont été utilisés pour

prévoir avec précision le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir des résultats statistiquement fiables. Une attention particulière sera accordée au bien-être des animaux. Les souris seront hébergées par 3 dans des cages collectives dans une pièce réservée dans laquelle la température, l'humidité et la lumière y sont régulés. Avant les expériences, les animaux sont manipulés fréquemment afin de les habituer aux expérimentateurs et réduire ainsi leur stress. Ils seront surveillés quotidiennement par des personnels compétents et formés. Des points limites suffisamment prédictifs sont définis pour limiter la souffrance tout au long de la vie de l'animal. En cas de souffrance ou de détresse persistante, les animaux seront mis à mort dans des conditions qui évitent souffrance et stress.

L'ensemble des procédures proposées est en conformité avec les directives européennes 2010/63/UE et françaises, dans le respect des nouveaux standards de soin et de bien-être des animaux.

19141 Un grand nombre de polluants chimiques incluant des hydrocarbures, des pesticides, des métaux et certains médicaments sont connus pour altérer le développement, la croissance, la reproduction et le comportement des poissons. Les premiers stades de vie de poisson, notamment les embryons et les larves non autonomes, sont très sensibles aux toxiques et constituent à ce titre de bons modèles pour étudier la toxicité de nouvelles substances chimiques et évaluer l'impact de la pollution des milieux aquatiques. Ces stades de vie pourraient constituer une bonne alternative aux tests de toxicité normalisés sur poissons juvéniles ou adultes qui sont couramment utilisés pour vérifier l'innocuité des nouvelles substances chimiques avant leur mise sur le marché. Néanmoins, il faut s'assurer au préalable que ces stades précoces de développement répondent de façon similaire aux poissons adultes en termes de seuil de sensibilité mais aussi de nature et d'intensité des effets. L'objectif de ce projet est de comparer les réponses physiologiques et comportementales des embryons et larves non autonomes (vésiculées) avec celles des juvéniles de poissons exposés à des substances potentiellement toxiques comme des pesticides ou des microplastiques que l'on retrouve fréquemment en milieu aquatique. L'espèce choisie est le médaka japonais, *Oryzias latipes* qui est un poisson modèle très utilisé en toxicologie et écotoxicologie et qui présente l'avantage d'être facile à reproduire en laboratoire.

Le présent projet concerne l'étude des réponses comportementales sur juvéniles de médaka âgés de 1 à 3 mois exposés à des nouveaux produits phytosanitaires ou biocides et à des microplastiques. Ces animaux seront exposés aux produits à analyser (maximum 10 pesticides et 10 plastiques sur une période de 5 ans) soit par voie aqueuse (composé soluble dans l'eau) soit par voie alimentaire (composés non solubles). A la fin de l'exposition le comportement natatoire, la réponse de fuite mais aussi la croissance et l'état de santé général des poissons seront évalués. Ces données seront comparées à celles obtenues parallèlement sur des larves non autonomes de la même espèce de façon à évaluer la sensibilité relative de ces deux stades de vie.

Quatre concentrations du produit, un témoin négatif (eau ou solvant) et un contrôle positif seront testés pour chaque composé analysé afin de construire une dose réponse et permettre de déterminer précisément la concentration sans effet toxique. Afin de permettre une analyse statistique fiable des résultats, tout en répondant aux critères de la règle des 3R, 25 individus par réplication et trois répliques expérimentales seront utilisés pour chacune des six conditions expérimentales par produit testé. Au final ce projet nécessitera 450 juvéniles par produit testé et un total de 9000 animaux pour l'ensemble des vingt produits testés sur les cinq années du projet.

Tous les poissons seront élevés et exposés dans des conditions contrôlées de laboratoire respectant le bien-être et les besoins spécifiques de l'espèce utilisée. L'état de santé des animaux et les paramètres physico-chimiques du milieu seront suivis quotidiennement. La règle des trois R sera prise en compte pour limiter le nombre d'animaux au minimum requis et limiter la souffrance animale par la prise en compte des points limites, l'isolement et la surveillance des individus malades et l'utilisation d'anesthésique en cas de besoin. Les concentrations testées de chaque produit seront proches de celles retrouvées dans l'environnement et donc a priori peu susceptibles d'affecter la survie et l'état de santé générale des poissons.

19142 La maladie de Willebrand (MW) représente la maladie hémorragique congénitale la plus fréquente (environ 1 personne affectée sur 1000) et elle est associée à un défaut du facteur de Willebrand (FW). Le FW est une large protéine multimerique circulante, dont un des rôles majeurs est d'intervenir dans les premières phases de la réponse à une brèche vasculaire ce qui va permettre l'arrêt du saignement.

En conditions normales, physiologiques, un autre rôle important du FW est de transporter le facteur VIII de la coagulation (FVIII). Cette association du FVIII avec le FW protège le FVIII d'une élimination trop rapide. Par conséquent, quand des anomalies génétiques du FW empêchent l'association FW-FVIII, les patients sont atteints de MW et développent aussi une forme acquise de déficit en FVIII qui s'apparente à l'hémophilie A. Ils exhibent alors des symptômes hémorragiques similaires à ceux de l'hémophilie. Les traitements disponibles sont surtout basés sur l'administration des facteurs manquants/défectueux, ce qui reste très coûteux.

Récemment un anticorps thérapeutique qui peut se substituer au facteur VIII a été développé. Cet anticorps (emicizumab) a montré une très bonne efficacité chez les patients hémophiles A sévères et est désormais approuvé par les autorités de santé. Il est administrable par voie sous-cutanée 1-2 fois/mois.

A l'heure actuelle l'emicizumab n'est pas approuvé pour le traitement des patients atteints de la MW, mais quelques exemples d'utilisation dans ce contexte ont été reportés dans la littérature. Notamment il a été administré chez quelques patients avec MW sévère pour lesquels les traitements conventionnels avaient des contre-indications. Toutefois, aucune étude détaillée sur l'efficacité de cet anticorps dans la MW n'a été publiée.

Notre travail a pour but d'étudier l'efficacité de l'emicizumab dans un modèle murin de MW.

Le système de la coagulation est complexe, faisant intervenir de nombreux acteurs, autant des molécules procoagulantes que leurs inhibiteurs mais aussi des phospholipides membranaires. Actuellement les tests disponibles in vitro, même s'ils se sont beaucoup améliorés depuis quelques années, ne permettent pas de reproduire l'intégralité de ce processus. Par conséquent, afin de tester l'efficacité de l'emicizumab, il est crucial de pouvoir tester son effet dans un modèle animal de MW.

Le respect de la règle des 3Rs a été une préoccupation constante dans la préparation du protocole de notre étude et toutes les procédures ont été conçues pour le respecter. La mise en œuvre des études préliminaires pour bien valider les modèles pathologiques permettra de raffiner la procédure ultérieure pour décider notamment du bon timing d'administration de l'anticorps. On estime donc que 192 souris représente le maximum des souris nécessaires pour l'ensemble des procédures. Ce nombre pourra être réduit en fonction des résultats obtenus dans les expériences pilotes.

Tout sera mis en œuvre pour réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux utilisés. Nous adapterons la procédure en tenant compte des points limites à ne pas dépasser, en particulier une éventuelle perte de poids de l'animal ou un comportement indicateur d'une souffrance quelconque. Les souris sont placées en cage avec 3-4 animaux/cage dans des portoirs ventilés. Aucune souris isolée n'est admise dans nos protocoles. Pour le bien-être des animaux, une litière mélangée est utilisée et le milieu est enrichi par morceaux de bois à ronger et filaments de papier kraft pour faire un nid. Les souris recevront nourriture et boisson ad libitum. L'ensemble des expériences sera effectué par une personne habilitée à expérimenter sur animaux.

19143 Le projet vise à développer un pansement ayant une double action : diagnostiquer une infection bactérienne topique en temps réel, et traiter cette infection de manière optimale en adaptant la vitesse de libération des molécules actives (antibiotique ou antiseptique) en fonction de la charge bactérienne. Ce projet devrait permettre une avancée dans l'optimisation des traitements des infections cutanées à germes multirésistants, qui est un problème sociétal de plus en plus important. En effet ces infections à germes multirésistants prolongent la durée de séjour et aggravent le pronostic des malades hospitalisés. La prévalence de ces infections a augmenté ces dernières années en raison de la pression de sélection exercée par un mauvais usage des antibiotiques. Ainsi, le développement de systèmes de traitement permettant une meilleure utilisation des

molécules antimicrobiennes devient urgent afin d'éviter la prolifération de ces bactéries multirésistantes, voire de bactéries résistantes à tous les antibiotiques existants, qui ne pourraient plus être traitées.

Dans ce projet, le suivi de l'infection en temps réel (diagnostic) se fait en incorporant des nanoparticules d'or fluorescentes dans le pansement, dont l'intensité de fluorescence dépend de la concentration en bactéries. Le matériau du pansement sera constitué de polymères électrofilés qui libèrent des agents antimicrobiens (thymol, chlorhexidine) avec des cinétiques de libération contrôlées et variables. Les résultats attendus sont l'évaluation du système de diagnostic d'une infection cutanée (par la mesure de fluorescence produite par les nanoparticules), ainsi que l'évaluation de l'activité antibactérienne des pansements chargés d'antimicrobiens bactéricides ayant une vitesse de libération contrôlée.

En ce qui concerne le bien-être animal, la règle des 3R avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement a été prise en compte dans l'élaboration de ce protocole. Le remplacement des animaux est impossible car aucun modèle in-vitro ne permet de prendre en compte l'ensemble des paramètres déterminant l'efficacité clinique. Le nombre d'animaux a été réduit au minimum dans les groupes afin de détecter des différences statistiquement significatives entre les différents traitements testés. La réduction du nombre d'animaux a été rendue possible grâce à l'utilisation de bactéries bioluminescentes et d'un système d'imagerie tel que l'IVIS pour suivre l'évolution de l'infection. Tous ces aménagements contribuent à limiter le nombre total d'animaux utilisés dans ce projet à 72 souris mâles SKH-1 ayant 10 semaines. Ce modèle de souris sera utilisé car il a des caractéristiques idéales pour l'étude et a été parfaitement établi dans les travaux précédents. Pendant l'expérimentation, le raffinement est pris en compte et les infections se feront sur des animaux anesthésiés et sous analgésiques. Après l'infection, les conditions d'asepsies seront préservées et les animaux vigiles seront placés dans un environnement thermostaté, avec un libre accès à la nourriture et à l'eau, et une luminosité contrôlée avec une alternance veille/sommeil. Les animaux seront surveillés régulièrement et leur bien-être sera évalué à l'aide d'une grille de score avec des points limites définis pendant toute la durée d'expérimentation.

19144 Clostridioides difficile est la première cause de diarrhées bactériennes associées aux soins chez l'adulte dans les pays développés et en particulier en France (> 24000 cas par an, dont 14 % de formes compliquées). La sévérité du tableau clinique varie de la simple diarrhée aiguë aux colites pseudomembraneuses. La mortalité associée aux infections à C. difficile (ICD) est de l'ordre de 3%. Les ICD peuvent évoluer sur un mode épidémique avec la survenue de cas groupés d'infection voire de véritables épidémies locorégionales. Elles représentent un coût sanitaire important pour nos sociétés, en raison de l'augmentation des durées moyennes de séjours et des surcoûts liés à leur prise en charge spécifique.

Face à ce problème de santé publique, les traitements actuels se résument à l'administration d'antibiotiques qui déséquilibrent le microbiote intestinal, facteur de risque de rechute. La transplantation fécale semble prometteuse, néanmoins, le recrutement des donneurs et la mise en place à large échelle de ce type de traitement soulève de nombreux obstacles. Par ailleurs, peu de mesures efficaces existent pour prévenir la transmission, la colonisation ou les rechutes à C. difficile.

Ce projet a pour objectif de développer une nouvelle stratégie thérapeutique afin de traiter les formes sévères et de prévenir la survenue de l'ICD et de ses rechutes. Nous proposons de générer des anticorps monoclonaux ayant pour cible les protéines de surface du C. difficile, protéines intervenant dans les stades précoces de la colonisation. La spécificité des anticorps sélectionnés permettra de limiter au maximum des effets de traitement sur le microbiote intestinal et de mimer au plus près l'élimination naturelle d'un pathogène.

Des études préliminaires ont permis de générer les premiers anticorps monoclonaux ciblant les protéines de surface de C. difficile. Ces anticorps ont été identifiés à partir de souris immunisées. Après des étapes de séquençage, clonage et de production, la spécificité des anticorps a été confirmée et seuls les plus affins vis-à-vis des protéines de surface ont été conservés. L'activité

neutralisante des anticorps candidats a ensuite été évaluée sur différents critères de croissance et d'adhésion bactérienne sur un modèle de cellules intestinales humaines in vitro. Afin de tester l'efficacité in vivo des anticorps candidats, à la fois en terme de colonisation bactérienne et de survenue de signes cliniques délétères (diarrhée, perte de poids), nous avons besoin d'un modèle d'ICD chez la souris pré-traitée par des d'antibiotiques

Dans ce projet qui inclut des rongeurs (souris, hamsters), nous estimons avoir besoin d'utiliser au maximum 384 animaux au total (192 souris et 192 hamsters). Sur la base de notre expérience et de la littérature conséquente déjà disponible, nous avons déterminé le nombre d'animaux nécessaire et suffisant à l'obtention de résultats statistiquement robustes.

Nous réduisons également au maximum le nombre de répétition des essais.

Les procédures effectuées seront les suivantes: après induction d'une dysbiose chez les animaux, nous administrerons par voie orale une souche virulente de *C. difficile* afin de reproduire ce qui se passe chez l'homme. Deux procédures seront alors possible: 1) le modèle de traitement préventif des infections: les anticorps monoclonaux sont administrés en même temps que la souche virulente de *C. difficile* et 2) le modèle de traitement curatif, les anticorps monoclonaux seront administrés à distance de la souche virulente de *C. difficile*.

Dans tous les cas, l'état de santé des animaux sera surveillé quotidiennement afin de suivre l'évolution de l'infection et optimiser le bien-être des animaux. Des points limites ont été établis et mèneront à l'euthanasie des animaux si nécessaire. L'environnement des animaux est enrichi par l'ajout de feuilles de cellulose dans les cages.

Toutes les procédures de ce projet ont été conçues pour respecter le principe des 3 R (Réduction, Raffinement, Remplacement).

Remplacement : plusieurs tests in vitro en milieu de culture liquide et sur un modèle de cellules humaines intestinales ont permis de démontrer la présence d'une activité des anticorps testés vis-à-vis de l'adhésion de *C. difficile* aux cellules intestinales. L'étape de vérification de son activité in vivo est exigible réglementairement avant toute nouvelle phase de développement clinique. Le recours à l'animal est indispensable pour étudier tous les aspects d'un processus infectieux et valider la stratégie de prévention ou de traitement de ces infections car il n'existe à ce jour aucun modèle in vitro ou in silico capable de reproduire la complexité du processus infectieux dans son intégralité.

Réduction : une planification statistique minutieuse a permis de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en préservant la validité statistique de l'étude afin d'avoir une puissance statistique suffisante pour observer un effet. Les groupes contrôles des animaux ont été mutualisés aussi souvent que possible. Au total, un nombre maximal de 384 animaux (192 souris et 192 hamsters) sera nécessaire pour les différentes procédures de cette étude.

Raffinement : les animaux seront surveillés quotidiennement et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer que les animaux subissent le minimum de stress possible. En particulier, les litières seront changées quotidiennement et les animaux auront un accès direct et illimité à l'eau de boisson et à la nourriture. La procédure sera pratiquée si nécessaire en utilisant des anesthésiques permettant de limiter la souffrance des animaux qui bénéficieront d'une procédure d'euthanasie anticipée et une sortie d'étude prématurée en cas d'atteinte des points limites éthiquement non acceptables. Les résultats de cette étude permettront d'envisager de nouvelles stratégies de prévention de l'infection à *C. difficile* ainsi que des récidives associées.

19145 La myopathie de Duchenne est une maladie génétique qui touche le muscle chez l'enfant, provoquant une faiblesse musculaire généralisée et évolutive. Les patients sont contraints à l'usage du fauteuil roulant vers l'âge de 10 ans, et décèdent d'insuffisance respiratoire ou cardiaque vers l'âge de 30 ans. Il n'existe pas, à ce jour, de solution thérapeutique sur le marché pour la myopathie de Duchenne. De récentes études soulignent le rôle de l'épuisement en NAD⁺ (Nicotinamide Adénine Dinucléotide), coenzyme qui intervient à de très nombreux niveaux dans nos cellules, dans l'évolution des dystrophies musculaires rares, dont celle de Duchenne (DMD). Un bénéfice obtenu

par une restauration en NAD+ dans des modèles murins a pu être démontré. Il existe différents modèles de myopathie de Duchenne, pour travailler sur l'élaboration des médicaments, depuis les modèles in vitro, jusqu'aux modèles animaux. Le modèle murin mdx est largement utilisé dans les étapes d'amont, mais son atteinte clinique est peu marquée. De ce fait, il devient limitant lorsqu'il s'agit d'identifier un bénéfice fonctionnel qui permettra d'envisager un essai clinique. En complément, le chien GRMD (golden retriever muscular dystrophy), atteint spontanément par cette maladie, reproduit de manière fidèle les manifestations cliniques rencontrées chez les patients, dans un organisme de grande taille, pouvant être suivi sur le long terme. Lorsqu'un médicament a fait ses preuves sur des modèles in vitro puis dans le modèle murin, et qu'il a des chances réelles d'arriver au chevet du patient, son efficacité chez le chien GRMD permet d'envisager un passage en clinique prometteur. Une restauration du NAD+ par voie pharmacologique des muscles de souris mdx (modèles de myopathie de Duchenne) a permis d'apporter un bénéfice fonctionnel. Chez le chien GRMD, une diminution forte et précoce de la quantité de NAD+ dans les muscles striés a été démontrée, et les voies de synthèse et consommation du NAD+ ont été caractérisées. Ces données suggèrent qu'une façon de restaurer le NAD+ dans les muscles serait de compléter en Nicotinamide (Vitamine B3). Avant d'envisager une étude d'efficacité thérapeutique sur le long terme, il apparaît nécessaire de vérifier, sur quelques animaux, qu'une supplémentation par voie orale en nicotinamide permet effectivement d'augmenter la quantité de NAD+ et de rééquilibrer les voies de ce métabolite essentiel, dans les muscles de chiens GRMD. Afin de répondre à cette question, nous administrerons pendant un mois du nicotinamide par voie orale (comprimés) à cinq chiens sur lesquels des biopsies musculaires seront effectuées avant et après traitement. Cette étude s'inscrit dans le respect de la règle des 3R. Remplacement : l'analyse poussée des voies du NAD+ permettant de déterminer que le nicotinamide pourrait s'avérer efficace a été réalisée sur des prélèvements stockés et sur des cultures cellulaires. Seule la supplémentation in vivo par voie systémique peut maintenant répondre à la question de l'efficacité de cette vitamine pour augmenter le niveau de NAD+ dans les tissus malades. Réduction : nous avons réduit le nombre de chiens inclus dans ce projet au strict minimum permettant d'établir des conclusions. Raffinement : les biopsies musculaires seront prélevées sous anesthésie générale, et une analgésie adaptée sera mise en place. Des points limites précis et suffisamment précoces pour éviter à ces chiens toute souffrance prolongée et inutile ont par ailleurs été définis et conduiront à l'euthanasie anticipée des animaux si l'un de ces points limites était atteint. Les chiens seront hébergés en petits groupes d'âges proches et de tempéraments compatibles, avec accès à un lieu de couchage, des plateformes et des jeux variés. Ils seront sortis quotidiennement en groupes plus larges dans des espaces extérieurs. Des moments d'interactions avec l'homme seront ménagés quotidiennement (temps de jeux, caresses). Ils bénéficieront d'un suivi vétérinaire quotidien afin de suivre au plus près les éventuelles complications liées à leur maladie. Cette étude permettra de disposer de bases solides pour construire un essai thérapeutique visant à restaurer les niveaux de NAD+ dans les muscles des chiens GRMD.

19146 Nous avons eu une autorisation pour 5 ans à partir d'octobre 2015, pour la production d'ascite (référéncé sous le numéro 03948. 02). Nous souhaitons renouveler notre demande.

Biotem est une entreprise de développement d'anticorps monoclonaux à visée diagnostique (pour laboratoires pharmaceutiques ou vétérinaires) et recherche (laboratoires de recherche publique ou privée).

Nous appliquons la règle des 3R:

1) Remplacer : Ce type de production est de plus en plus remplacé par des productions in vitro (culture cellulaire) mais, bien que la production d'ascite tende à disparaître, elle ne peut pas être toujours remplacée par la production in vitro:

- certains clones sont de très mauvais producteurs in vitro
- les clients ayant déposé des brevets ou AMM sur les anticorps produits en ascite doivent continuer sur les mêmes anticorps / difficulté à changer de procédé.

Cependant, nous privilégions les méthodes de production in vitro :

- culture d'hybridomes

- production d'anticorps recombinants en cellules CHO, prestation que nous avons mis en place il y a 2 ans et qui est de plus en plus utilisée

De plus, notre service commercial ne propose plus les productions en ascite à nos clients pour les nouveaux projets.

2) Réduire : il n'est utilisé à des fins d'ascite que le nombre d'animaux strictement nécessaire à la production demandée (calcul de rendements pour limiter le nombre d'animaux) si absence d'alternative

3) Raffiner : chaque production est notée et consignée afin d'avoir un visuel sur les éventuelles demandes futures. Les souris sont hébergées selon les normes en vigueur. Les mâles sont mis jusqu'à 5 ou 6 par cage et les femelles jusqu'à 10 par cage. Afin d'améliorer le bien-être des animaux, du papier essuie-tout est introduit dans chaque cage. Ils sont euthanasiés si le point limite de souffrance est atteint.

Ce projet nécessite l'utilisation de souris. 2956 souris ont été utilisées pour le projet précédent (années fin 2015, 2016, 2017, 2018, 2019, début 2020) (5000 souris étaient prévues sur 5 ans, nous en avons utilisé moins)

Pour cette nouvelle demande, nous estimons un total d'environ 1500 souris (sur 59 mois), soit une moyenne de 25 à 26 souris par mois.

19147 L'expérimentation animale est régie par un cadre réglementaire européen et national qui impose une démarche éthique à l'égard des animaux et une obligation de formation pour toute personne ayant à pratiquer des procédures expérimentales sur l'animal. Cette habilitation à l'expérimentation animale est dispensée sous forme d'une formation théorique réglementaire dans l'année qui suit la prise de fonction mais la part consacrée à la pratique est minime. La formation pratique est donc généralement assurée sur le terrain, sous forme de tutorat, par des personnes compétentes pour les gestes enseignés.

Au sein de notre institut, de nombreux doctorants ou de nouveaux entrants sont amenés à réaliser des expérimentations animales dans le cadre de leur sujet de recherche. Une fois leur formation réglementaire validée, un enseignement pratique est indispensable et le recours à l'animal à ce stade de leur parcours de formation est incontournable.

Pour cela, nous souhaitons mettre en place un système de formation interne et d'entraînement pour ces personnes afin de les sensibiliser à la démarche éthique et au bien-être animal et de les former aux gestes techniques de base sur rongeur (préhension, contention, tranquillisation, administrations et prélèvements, anesthésie, mise à mort). Ils seront supervisés dans l'accomplissement de ces gestes par un tuteur présentant les qualifications et l'expérience adéquates, jusqu'à ce qu'ils aient acquis les compétences et l'autonomie requise pour la pratique de ces gestes.

Ces formations seront mises en place à la demande pour un nombre très restreint de personnes (1 ou 2). Elles seront dispensées par un personnel qualifié et compétent, soit un membre de l'équipe de recherche à laquelle est rattachée la personne, soit un personnel de l'animalerie. Dans un souci de réduction, nous n'achèterons pas d'animaux mais utiliserons des animaux reclassés issus des élevages classiques ou de lignées transgéniques et destinés à être mis à mort car n'ayant pas le génotype ou le sexe adéquats. Les procédures d'enseignement seront sans réveil c'est-à-dire qu'elles auront lieu sur animaux anesthésiés et ces animaux seront mis à mort à la fin de la séance, sans retour à la conscience, afin d'éviter d'éventuelles douleurs liées au processus d'apprentissage. Seules les administrations par voie orale seront sur animal vigile. Les animaux seront hébergés en groupe dans un environnement enrichi. On évalue à 675 souris et 75 rats pour 5 ans le nombre d'animaux nécessaire.

19148 Notre projet consiste à mieux caractériser les dimensions comportementales et de mieux comprendre les mécanismes neurophysiologiques mis en œuvre lors de l'acquisition et de la régulation de comportements automatisés et répétitifs. Ces comportements automatisés sont essentiels au quotidien mais peuvent également devenir pathologiques lorsqu'ils sont mal régulés.

Nous estimons le nombre total de 240 souris nécessaires pour l'ensemble du projet. Nous utiliserons des modèles murins, et notamment des souris génétiquement modifiées, qui expriment des comportements répétitifs pathologique. Nous utiliserons des techniques d'enregistrement et de neuromodulation de l'activité neuronale de circuits cérébraux identifiés comme étant essentiels à l'acquisition et la régulation des comportements répétitifs. Cette approche permettra de mieux identifier le rôle de ces circuits dans l'espoir de pouvoir ensuite utiliser ces résultats notamment dans des pathologies où les comportements répétitifs sont mal régulés et exagérés tels que le trouble obsessionnel compulsif, le syndrome de Gilles de la Tourette ou encore les addictions. Afin de respecter la règle des 3 R, nous envisageons de: 1) Remplacer : les méthodes utilisées nécessitent l'utilisation de modèle murin, notamment pour la neuromodulation qui ne peut être remplacé par une autre approche ex vivo pour répondre aux objectifs du projet. 2) Réduire : en réalisant des tâches comportementales ciblées utilisant des boîtes opérantes automatisées que nous avons mises en place et permettent d'obtenir des résultats très consistants entre animaux et ainsi de réduire le nombre d'animaux à utiliser. 3) Raffiner : L'animalerie où sont hébergés les animaux est agréée, donc les conditions de température et d'hygrométrie sont contrôlées. Les animaux sont hébergés par 5 et ont accès à l'enrichissement (coton pour faire un nid). Pour chaque mesure expérimentale, des points limites sont établis pour éviter la souffrance et garantir le bien-être de l'animal.

19149 Dans le cadre du DUT (diplôme universitaire de technologie) Génie biologique option analyses biologiques et biochimiques (ABB), régi par un programme pédagogique national, 28 étudiants sont amenés à "mettre en œuvre les techniques d'expérimentation animale pour mieux comprendre le fonctionnement, la physiologie des systèmes/appareils des organismes animaux". Une introduction à l'expérimentation animale est assurée en semestre 1 (S1: mai/juin année 1), reposant sur un cours magistral (CM) de 2h puis un travaux pratiques (TP) de 4h. Dans le cadre du CM, les étudiants sont sensibilisés au respect de l'animal de laboratoire, à la détection de la douleur, de la souffrance, du stress des animaux de laboratoire et à l'importance des protocoles d'anesthésie et analgésie. L'objectif du TP est de faire découvrir l'animal de laboratoire aux étudiants, de leur apprendre différentes techniques de contention, et les différentes voies d'administration et de prélèvements. En S2, 3 TP de physiologie animale sont dispensés et permettent d'aborder des techniques de dissection sur animaux euthanasiés. Ces TP du S1 et du S2 ont déjà été validés par le comité d'éthique. En S3, un TP de pharmacologie appliquée permet de prolonger les notions abordées lors des cours magistraux de pharmacologie. Ainsi nous abordons les effets de psychotropes sur le comportement des souris. Un total de 42 souris (6 souris par binôme réutilisées pour la séance de l'après-midi) seront utilisées. A la fin de la journée, celles-ci seront euthanasiées et congelées pour être utilisées lors des TP d'anatomie/dissection. A travers ces TP, les étudiants réalisent l'importance des règles d'éthique enseignées. En effet, leur formation est complétée par le module "Règlementation éthique-Cultures cellulaires - Méthodes alternatives à l'expérimentation animale" afin de sensibiliser les étudiants à la règle des 3R.

Ce projet se déroulera sur 5 ans et nécessitera 210 souris. L'approche de ces travaux pratiques repose sur l'évaluation comportementale d'un psychotrope, la caféine.

L'ensemble des souris qui seront utilisées dans ce projet ne présentent pas un phénotype dommageable. La conformité avec les exigences de réduction, raffinement et remplacement seront pris en compte :

1) Remplacement : Nous utilisons autant que possible des approches in vitro lors des travaux pratiques enseignés en DUT.

2) Réduction : Pour ces travaux pratiques, nous n'utiliserons que le nombre d'animaux nécessaire et suffisant pour chaque sous-groupe de traitement pour chaque étudiant.

3) Raffinement : Les méthodes et les mesures choisies visent à diminuer au maximum les contraintes imposées aux animaux. Une période d'acclimatation d'au moins 5 jours dans les mêmes conditions environnementales que celles qui prévaudront lors du protocole expérimental est prévue afin de stabiliser les animaux au point de vue physiologique et comportemental et de diminuer le

stress. Les signes extérieurs de souffrance (prostration, poil hérissé, saignements) seront les critères de points limites à partir desquels nous procéderons à l'euthanasie de l'animal.

19150 Le système nerveux central des mammifères est constitué de deux types cellulaires: les neurones et les cellules gliales. Parmi ces cellules gliales les astrocytes en sont un type majeur. Les astrocytes sont importants pour l'activité neuronale en procurant les facteurs neurotrophiques nécessaires au bon fonctionnement des neurones, et régulent leur activité synaptique. Les astrocytes occupent la moitié du volume de la matière grise, et ont aussi un rôle important dans le maintien structurel du cerveau. La dérégulation du volume astrocyte est un signe important dans diverses pathologies tels que la maladie d'Alzheimer ou encore dans les œdèmes dus à des accidents vasculaires cérébraux. Ces changements dans le volume des astrocytes vont causer des changements dans la corrélation spatiale entre astrocytes et neurones, et va ainsi affecter la transmission neuronale. Jusqu'ici les mécanismes sous-jacents de la régulation du volume des astrocytes sont encore peu connus. De plus les astrocytes ont leur activité codée sous formes de signaux calciques qui sont altérés dans des conditions pathologiques. De ce fait la régulation du volume des astrocytes de par leurs activités calciques reste encore peu connue. Ce projet a donc pour but de se concentrer sur l'étude de la régulation du volume des astrocytes, en conditions normales et physiopathologiques. Des expériences concrètes seront donc menées dans un modèle murin, et se focaliseront sur la régulation du volume des astrocytes de manière dépendante de leur activité. La pertinence dans la déformation structurelle du cerveau observée au cours du développement de la maladie d'Alzheimer sera aussi étudiée chez un modèle murin. Les résultats attendus vont procurer de nouveaux éléments quant à la compréhension du rôle de la dynamique volumique des astrocytes dans les physiopathologies liées au cerveau. Cela permettra in fine d'identifier de nouvelles cibles moléculaires afin de contrôler les changements de volumes des astrocytes en conditions pathologiques.

Pour parvenir à nos fins, les modèles murins sont donc indispensables. Ni les modélisations mathématiques, ni les cellules cultivées in vivo ne permettent les expériences proposées. Cependant nous prévoyons une méthodologie multidisciplinaire afin de minimiser le nombre d'animaux utilisés sur ce projet. Afin de suivre l'activité et moduler l'activité des astrocytes, des outils pharmacogénétiques seront utilisés. Ceci sera fait via l'expression de vecteurs viraux dans le cerveau des souris via injection stéréotaxique. Afin d'imager la dynamique de volume des astrocytes, une manipulation in vivo non invasive sera appliquée (application périphérique d'un colorant fluorescent). Un modèle murin de la maladie d'Alzheimer sera aussi utilisé afin d'examiner l'évolution de l'activité et du volume des astrocytes dans un état pathologique.

La règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner) est vigoureusement considérée tout au long de l'élaboration de ce projet. Le nombre de souris utilisées durant ce projet a été soigneusement calculé (120 souris avec 50% de souris saines et 50% de souris pathologiques) afin d'atteindre des résultats scientifiques significatifs. Les souris utilisées pendant ce projet seront nées et élevées en captivité. Les animaux seront hébergés avec un cycle jour/nuit adapté et avec boisson et nourriture ad libitum. Ils feront l'objet d'un contrôle quotidien par une personne compétente. Afin de réduire ou supprimer la douleur, et la souffrance de l'animal, des anesthésies et analgésies appliquées généralement ou localement seront effectuées. En plus, le schéma expérimental sera toujours adapté pour améliorer ou accroître les données collectées.

19151 La Covid-19 est une maladie infectieuse potentiellement mortelle causée par un nouveau coronavirus appelé SARS-CoV-2 et responsable d'une pandémie mondiale. Fin mars 2021, le virus a infecté plus de 130 millions de personnes et causé la mort de près de 3 millions d'entre elles (dont près de 100.000 en France), principalement chez des personnes âgées ou souffrant de maladies préexistantes telles qu'une obésité importante, un diabète ou des maladies inflammatoires chroniques. A l'inverse, la grande majorité des personnes infectées développent des symptômes minimes ou modérés. Malgré la quantité considérable de travaux réalisés depuis mars 2020 sur l'infection par le SARS-CoV-2, beaucoup de questions restent sans réponse pour comprendre les mécanismes de la Covid-19 et pour en limiter les effets.

Des études récentes ont identifié quelques variants génétiques de l'homme associés à une forme plus grave de Covid-19 mais le décours de l'infection est certainement influencé par d'autres gènes de l'hôte qui restent à découvrir. Le rôle d'autres facteurs tels que le microbiote intestinal est suspecté mais les preuves manquent encore. Malgré des progrès notables dans le traitement des patients hospitalisés, un travail considérable reste à faire pour trouver de nouveaux médicaments efficaces. De même, si les premiers vaccins disponibles ont été immédiatement déployés à grande échelle, d'autres doivent être développés pour améliorer leur efficacité, réduire leur coût et faciliter les aspects logistiques. Enfin, la circulation du virus dans la population humaine s'est accompagnée de l'apparition de nouveaux variants viraux plus contagieux et donnant des formes plus graves de la maladie, certains permettant même au virus d'infecter de nouvelles espèces et faisant craindre l'apparition de nouveaux réservoirs pour le virus.

L'objectif de ce projet est de contribuer à répondre à ces différentes questions. Les phénomènes biologiques que nous devons étudier se développent au niveau de l'organisme entier (développement de l'infection, réponse immunitaire) et imposent donc de recourir à des modèles animaux vivants, tout en utilisant des cultures de cellules à toutes les étapes du projet où cela est possible. Notre expérience sur ce virus montre que les résultats obtenus avec des cultures de cellules ne prédisent pas systématiquement ce qui se passe dans un organisme entier. Les modèles animaux utilisables sont peu nombreux (primates non-humains, furets, hamsters et souris). Nous étudierons ces questions chez des souris car cette espèce permet de réaliser des études génétiques puissantes à l'aide de lignées génétiquement modifiées, de manipuler le microbiote intestinal et d'étudier facilement la transmission entre animaux. Elle permet également de tester l'efficacité de médicaments et de vaccins. Nous serons attentifs aux éventuelles variations entre mâles et femelles tout en ajustant les effectifs au minimum nécessaire pour parvenir à des conclusions statistiquement significatives à chaque fois que cela sera recherché. Uniquement lorsque ce sera indispensable, certaines procédures seront répétées pour conforter la validité des conclusions.

Le projet qui s'étalera sur 5 ans, s'articule autour de 10 procédures de sévérité modérée. L'état de santé de toutes les souris infectées sera suivi selon une grille d'évaluation déjà établie qui comporte des points limites au-delà desquels les souris seront mises à mort. Dans la plupart des cas, l'infection aura un impact très modéré sur l'état de santé des souris, avec une perte de poids faible et transitoire. Dans d'autres cas, les souris pourront développer une perte de poids plus importante et des difficultés respiratoires. Un suivi quotidien permettra de décider sans délai d'une interruption prématurée de la procédure si l'issue de l'infection ne fait pas de doute.

La 1ère procédure aura pour objectif d'étudier des nouveaux variants du virus pour leur capacité à infecter la souris et caractériser le développement de l'infection dans cette espèce. Elle utilisera au total 2840 souris mâles et femelles jeunes adultes ou âgées de plusieurs mois. La 2ème procédure étudiera l'impact de la composition génétique des souris sur leur sensibilité à l'infection en étudiant une collection de lignées présentant une grande diversité génétique. Elle utilisera au total 1740 souris mâles et femelles jeunes adultes. La 3ème procédure aura pour objectif d'identifier des gènes contrôlant une partie des variations observée dans la procédure précédente. Elle utilisera au total 1040 souris mâles et femelles jeunes adultes. La 4ème procédure vise à identifier des gènes modifiant la sévérité de l'infection dans un modèle de souris portant le récepteur humain du virus. Elle utilisera au total 700 souris mâles et femelles jeunes adultes. La 5ème procédure testera la capacité de nouveaux variants pouvant infecter la souris à se transmettre par contact direct ou indirect (via les fèces) entre souris infectées et souris non infectées. Elle utilisera au total 1800 souris mâles et femelles jeunes adultes. La 6ème procédure visera à évaluer l'impact d'une modification du microbiote sur la sévérité de l'infection. Elle utilisera au total 360 souris mâles et femelles jeunes adultes. La 7ème procédure évaluera l'efficacité de médicaments déjà commercialisés sur la quantité de virus retrouvée dans les poumons et la sévérité de l'infection. Elle utilisera au total 600 souris mâles et femelles jeunes adultes. La 8ème procédure permettra de tester l'efficacité d'anticorps de synthèse ou de sérums de patients convalescents sur l'infection par SARS-CoV-2, en particulier sur des nouveaux variants. Elle utilisera au total 1200 souris mâles et femelles jeunes adultes. La 9ème procédure permettra d'évaluer la capacité de 10 candidats

vaccins à induire une réponse immunitaire contre le virus SARS-CoV-2. Cette réponse sera mesurée par le niveau des anticorps dirigés contre le virus qui sera mesuré in vitro. Elle utilisera au total 1680 souris mâles et femelles jeunes adultes. La 10ème et dernière procédure permettra d'évaluer l'efficacité des 5 meilleurs candidats vaccins à protéger contre une infection par trois variants du virus. Elle utilisera au total 1200 souris mâles et femelles jeunes adultes.

Au total, le projet utilisera donc jusqu'à 13160 souris sur 5 ans. Il permettra de faire progresser des connaissances fondamentales importantes pour comprendre le développement de la maladie et d'évaluer de nouvelles pistes de traitement ou de prévention. Il s'agit d'enjeux considérables au regards de la situation critique causée par la Covid-19 au niveau mondial.

19152 L'antibiorésistance est responsable de millions de décès dans le monde. Ponctuelles au départ, ces résistances se sont répandues mondialement et sont devenues préoccupantes. Certaines souches bactériennes sont multi-résistantes, c'est-à-dire qu'elles résistent à plusieurs familles d'antibiotiques. D'autres sont même devenues toto-résistantes, c'est-à-dire résistantes à quasiment tous les antibiotiques disponibles. Ce phénomène est en augmentation constante, et place souvent les médecins dans une impasse thérapeutique, sans aucune solution pour traiter les patients infectés. La colonisation de l'Homme par les bactéries résistantes aux antibiotiques (BRA) s'opère en deux étapes : d'abord la contamination par ingestion, puis l'implantation dans le microbiote intestinal (Ensemble des micro-organismes présents naturellement dans le système digestif). Par ailleurs, les animaux de rentes (Animaux élevés ou gardés pour leur rentabilité) ayant reçu au cours de leur vie des antibiotiques sont une des voies de contamination humaine.

Dans ce projet, nous émettons l'hypothèse que la contamination d'aliments contenant des traces d'antibiotiques pourrait favoriser l'implantation de BRA dans le microbiote intestinal humanisé chez la Souris.

Le recours aux animaux est indispensable à notre étude, car la régulation du microbiote intestinal est un processus complexe qu'il n'est pas possible de reproduire in vitro. Notre étude nécessite un total de 500 animaux sur une période de 5 ans, ce nombre a été calculé selon les différentes concentrations d'antibiotiques nécessaires et de leur famille. Pour réduire le nombre d'animaux au maximum, l'ensemble des analyses sera fait sur les mêmes groupes d'animaux traités. Ainsi, les animaux dont nous aurons prélevés les fèces seront mis-à-mort et leur microbiote intestinal pourra être étudié le long du tractus gastro intestinal. Ce nombre est réduit au maximum conformément à la règle des 3R, et les animaux, suivis quotidiennement, sont hébergés dans des conditions conformes à la réglementation et adaptées à leurs besoins, en accord avec le Personnel de l'Animalerie. Dans un objectif de raffinement, nous avons choisi d'utiliser la souche C57Bl/6J femelle utilisé dans l'étude décrivant le protocole que nous utiliserons afin de minimiser la quantité de souris lors de la procédure de tests. Dans cette étude, aucun signe clinique n'est attendu, et l'administration de BRA et d'antibiotiques ne devrait a priori causer aucune douleur, cependant l'élimination du microbiote risque de causer des diarrhées ainsi qu'une souffrance. Les animaux seront surveillés quotidiennement par un personnel qualifié, en vue de détecter un éventuel signe d'inconfort. Les souris seront gavées par du personnel compétant et entraîné, qui a été formé aux gestes techniques.

Nous nous attacherons à respecter les points limites suivants : perte de poids supérieure à 20% du poids initial, diarrhées abondantes de plus de 2 jours, souris montrant des signes de détresse. Cette étude utilisera l'intégralité des 500 animaux et nous permettra de vérifier l'hypothèse de départ. A l'issu du projet, nous préleverons l'appareil digestif des souris afin d'analyser la composition du microbiote le long cet organe.

19153 Le contrôle des rythmes biologiques est un mécanisme permettant à l'organisme d'anticiper les variations d'activités survenant au cours des 24 heures du cycle journalier (activité physique, repas, repos...). Pour ce faire, chaque organe et chaque cellule de notre corps possède sa propre horloge interne qui doit être en adéquation avec notre activité socio-comportementale. Un dérèglement de l'horloge circadienne au niveau des tissus métaboliques semble être associé à la survenue de maladies cardio-métaboliques (diabète, obésité, stéatose et fibrose hépatique, insuffisance

cardiaque...). Dans ces contextes pathologiques, de nombreuses études semblent indiquer que certains récepteurs nucléaires (RN) comme REV-ERB alpha, PPAR alpha, FXR et THR présentent une activité perturbée. Ces RN, acteurs majeurs de l'interconnexion entre l'horloge circadienne et le métabolisme, possèdent une activité modulable par un traitement pharmacologique ou une approche nutritionnelle. Ainsi dans le cadre de ce projet, nous souhaitons mettre en place plusieurs modèles pathologiques soit par un changement nutritionnel soit par traitements chimiques à l'aide de molécules pro-fibrotique, pro-inflammatoire ou inductrices de stress. Dans un second temps nous administrerons des modulateurs de ces RN dans le but de resynchroniser l'horloge circadienne afin de corriger les dysfonctionnements métaboliques observés dans ces contextes pathologiques. Toutefois, ces RN n'étant pas exprimés dans les mêmes fenêtres temporelles, ses expériences seront réalisées sur 2 créneaux horaires afin d'ajuster l'administration de la drogue avec la présence de sa cible. En parallèle, nous chercherons à mettre en évidence la possibilité de resynchroniser l'horloge circadienne par une approche nutritionnelle en limitant l'accès à la nourriture à la période d'activité physiologique des animaux (nuit). Afin de visualiser l'impact de ces approches sur l'horloge circadienne nous avons choisi d'utiliser des animaux transgéniques permettant un suivi de rythme circadien en temps réel sur des animaux vivants (anesthésiés) à l'aide d'un gène rapporteur bioluminescent. Enfin, le rythme circadien et l'activité de ces RN présentant un dimorphisme sexuel marqué, ces expériences seront donc réalisées sur des individus mâles et femelles. Seul un modèle animal permet d'avoir un suivi global du rythme circadien et de son altération dans un contexte de pathologies cardio-métaboliques et de sa resynchronisation via des approches pharmacologiques ou nutritionnelles. Afin de réduire le nombre d'animaux nécessaire au projet celui-ci a été déterminé statistiquement. La mise en place de ce projet nécessitera l'utilisation d'environ 2496 souris au cours des 5 prochaines années. Les animaux utilisés seront de jeunes adultes (10-12 semaines) mâles et femelles afin de prendre en compte le dimorphisme sexuel des RN et de la régulation circadienne. Toutefois, dans le but de remplacer au maximum les animaux utilisés nous disposons de modèles cellulaires au laboratoire qui seront utilisés pour mettre en évidence les mécanismes moléculaires impliqués. Enfin, nous étudierons les conséquences de cette désynchronisation de l'horloge circadienne sur un grand nombre d'organes (foie, cœur, cerveau, intestin, muscle et tissu adipeux) en impliquant l'ensemble des équipes constituant notre unité dans le but d'utiliser au maximum le matériel biologique généré au cours de cette étude (raffinement). Afin de limiter la douleur ressentie, nous utiliserons des antalgiques dès que nécessaire et nous utiliserons de l'enrichissement dans les cages pour réduire le stress éventuel.

19154 Le cancer du pancréas sera la 2ème cause de mortalité par cancer en 2030. Le stade précoce de la maladie est cliniquement silencieux et le diagnostic tardif contribue à un taux de survie à 5 ans de seulement 8%. Il est urgent de mieux comprendre les causes de l'initiation de la maladie afin de concevoir une meilleure approche pour une intervention précoce.

L'objectif du projet est d'identifier un nouveau gène impliqué dans la régénération du pancréas après une inflammation et qui pourrait contribuer à l'initiation du cancer du pancréas quand il est inactif. Ceci pourrait permettre de découvrir de nouvelles cibles pour le développement de médicaments chez l'homme.

Le projet consiste à réaliser des injections dans la cavité abdominale des souris d'un produit chimique qui est couramment utilisé pour induire une inflammation réversible du pancréas et analyser la capacité de régénération dans le contexte où le gène d'intérêt est inactivé ou non. Le projet consiste également à analyser si l'apparition de lésions pré-cancéreuses est favorisée lorsque ce gène est inactif, à l'aide de souris génétiquement modifiées. Les souris seront des mâles et des femelles adultes. Toutes les souris impliquées dans ce projet seront euthanasiées à l'issue de la procédure expérimentale.

L'utilisation de la souris a un double intérêt : (1) répondre à la problématique par l'utilisation d'animaux génétiquement modifiés (2) associer les phénotypes de ces animaux avec les pathologies humaines (développement et physiologie comparable). Les procédures seront réalisées dans les meilleures conditions possibles afin de limiter les procédures invasives et de conserver au maximum le bien-être de l'animal, en conformité avec les exigences de remplacement,

de réduction et de raffinement. Ce projet se déroulera sur une période de 4 ans dans des locaux agréés et nécessitera un nombre total de 120 animaux. La conformité avec les exigences de remplacement, réduction, et raffinement est prise en compte : 1) remplacement : les connaissances issues de cette étude sur l'animal ne peuvent pas être actuellement obtenues par d'autres méthodes compte-tenu de la complexité physiologique de la régénération et du développement du cancer du pancréas, nous obligeant à travailler à l'échelle d'un organisme. Des études sur cellules en culture sont également prévues pour compléter cette partie d'expérimentation animale sans pouvoir le remplacer ; 2) réduction : nous avons déterminé le nombre d'animaux nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement exploitables. Le nombre d'animaux est fixé à 5 par groupe et 24 groupes de 5 animaux sont nécessaires dans cette étude. Ces groupes sont définis pour chaque stade nécessaire aux analyses et pour les différentes analyses à réaliser (analyse par imagerie, histologique ou moléculaire). 3) raffinement : les méthodes et les mesures choisies visent à diminuer au maximum les contraintes imposées aux animaux. Les souris sont placées dans des portoirs ventilés, 5 individus par cage. La température, l'hygrométrie, la nourriture et l'eau sont contrôlées tous les jours. En plus de la litière, les cages sont enrichies avec 1 bâtonnet en bois, des cotons et du kraft. Des points limites suffisamment précoces et prédictifs ont été définis pour éviter toute douleur, souffrance et angoisse infligée aux animaux. L'inflammation du pancréas induite par la procédure est réversible dès l'arrêt du traitement. Les souris sont analysées dans le cadre des phases très précoces de cancer (observation de lésions microscopiques, phase indolore pré-cancéreuse) et sont euthanasiées avant de développer un cancer.

19155 Le diabète est un enjeu de santé majeur touchant près de 4,5 millions de personnes de la population française, dont 3,5 millions personnes déjà sous traitement, selon le Centre Européen d'Etude du Diabète. L'insulinorésistance (diabète de type 2) touche plus de 90% des personnes diabétiques. Surtout des facteurs liés à nos modes de vie expliquent son accroissement constant : surpoids, obésité, manque d'activité physique, constituent les principales causes. Dans le diabète de type 1, très souvent diagnostiqué avant l'âge adulte, l'organisme ne produit plus d'insuline ; les cellules du pancréas fabriquant l'insuline ayant été attaquées et totalement ou partiellement détruites par le système immunitaire. Sans aucun traitement, l'organisme ne peut pas métaboliser le sucre correctement. Même sous traitement, le malade peut connaître de nombreuses complications telles que la rétinopathie, la neuropathie et la néphropathie occasionnées par la difficulté de l'organisme à assurer une régulation stricte du taux de sucre dans le sang. Les origines de la maladie sont à la fois environnementales et génétiques. Du fait de la complexité de cette pathologie, la plupart des facteurs génétiques impliqués dans la maladie restent encore inconnus, et ce malgré un effort scientifique considérable. La similitude remarquable de la maladie chez l'homme et chez la souris nous mène à poser l'hypothèse que les mêmes réseaux de gènes sont impliqués dans le développement du diabète chez ces deux organismes. L'expérimentation chez la souris comporte de nombreux avantages parmi lesquels notre aptitude à mieux contrôler les conditions environnementales. Pour ces raisons, des modèles souris comme la «Nonobese Diabetic (NOD) mouse» sont devenus indispensables pour mener les études sur le diabète. Notre équipe a identifié un gène candidat, *Arntl2*, potentiellement impliqué dans le diabète de type 1 et aussi dans l'insulinorésistance. Après validation de ce gène dans des systèmes cellulaires, il reste essentiel de comprendre son rôle biologique et moléculaire. Une implication d'*Arntl2* dans le diabète peut uniquement être prouvée dans un modèle in vivo sur le fond génétique approprié. Dans ce but, nous souhaitons analyser des souris porteuses d'un gène inactivé ou d'un gène porteur d'allèles protecteurs.

L'utilisation d'animaux dans notre projet est imposée par l'absence d'alternatives comme des cultures cellulaires. Après conception du projet avec aide d'un biostatisticien, visant à réduire le plus possible le nombre d'animaux requis, celui-ci est estimé à 1260 souris adultes pour 5 ans, suivant 3 procédures légères (700 souris) et 2 procédures modérées (560 souris). Les animaux seront hébergés dans des cages ventilées, installées dans une animalerie agréée. Ces animaux seront suivis de manière hebdomadaire par mesure de glucose (glycosurie) dans une goutte d'urine. Des animaux qui présentent une glycosurie, donc indiquant la présence de diabète, seront mis à mort avant l'apparition d'éventuelles signes de souffrances. Nous envisageons des prélèvements

d'organes uniquement sur animaux mis à mort, des prélèvements de sang sur des souris anesthésiées, et l'injection de cellules immunitaires (essentiellement des cellules T) dans le sinus rétro-orbitaire sous anesthésie. Tous les animaux seront mis à mort en fin d'expérimentation ou dès la déclaration d'hyperglycémie.

19156 La leptospirose est une zoonose ré-émergente causée par des bactéries pathogènes du genre *Leptospira*. Ces bactéries se retrouvent dans le sol et les eaux après avoir été excrétées via les urines de mammifères infectés, le plus souvent porteurs asymptomatiques (rongeurs, animaux sauvages). Au contact d'un environnement souillé, l'Homme comme d'autres mammifères se contaminent de façon accidentelle. Il n'existe à ce jour aucun vaccin universel, capable de conférer une protection durable et croisée contre les 350 types de leptospires identifiés. De plus, l'antibiothérapie est inefficace pour éradiquer l'infection dès lors que les leptospires sont nichés dans les reins de l'hôte. Le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques contre l'infection est une nécessité tant en santé publique humaine que vétérinaire.

Une thérapie aux résultats prometteurs consiste à pré-stimuler les récepteurs du système immunitaire avec un composé pharmacologique de synthèse, capable de mimer l'action d'un pathogène (composés pharmacologiques synthétiques) pour induire un effet mémoire protecteur, non spécifique, chez l'hôte. Nous souhaitons évaluer cette stratégie prophylactique, qui booste la réponse inflammatoire de l'hôte face à différents types d'infection, comme nouveau moyen de lutte contre la leptospirose.

La période néonatale, caractérisée par un système immunitaire immature constitue une fenêtre temporelle idéale pour administrer le traitement. Les agonistes contribueraient à « éduquer et entraîner » les cellules immunitaires du nouveau-né et ainsi, augmenter les capacités défensives de son système immunitaire à l'âge adulte.

Dans ce projet, nous proposons d'injecter des agonistes à des souriceaux, puis d'évaluer l'effet de cette stratégie prophylactique contre une infection expérimentale par *Leptospira* chez la souris devenue adulte. Le bénéfice attendu est une réduction significative du nombre de bactéries après infection chez les souris traitées.

Le modèle animal que nous utilisons repose sur l'utilisation de souches de leptospires génétiquement modifiées pour émettre de la lumière, ce qui permet de suivre chez le même animal la cinétique d'une infection par imagerie.

La dose d'agonistes injectés est définie pour n'induire aucun effet délétère chez l'animal.

La dose de leptospires utilisée pour l'infection expérimentale est susceptible de provoquer une septicémie, nécessaire pour mener à une colonisation rénale mais elle est temporaire et, le plus souvent, sans signes cliniques graves.

Ce projet nécessite un total de 624 souris, indifféremment femelles ou mâles, âgés de 8 jours au moment de l'administration du traitement et de 6 semaines au moment de l'infection. Conçu pour une durée de 5 ans, il comporte 2 procédures de sévérité modérée.

Au terme de chaque expérience, les souris seront mises à mort selon les règles établies et leurs organes prélevés pour tirer le meilleur parti de chaque animal mis en expérimentation.

Ce projet est défini dans le respect des 3 valences de la démarche 3R. Remplacement : Les relations hôte-pathogène sont investiguées, au maximum possible, grâce à des expériences *in vitro*. Cependant, ces dernières n'intègrent ni dans leur totalité, ni dans leur complexité les mécanismes qui régissent la relation hôte-pathogène. Réduction : L'imagerie *in vivo* sur petit animal permet de réduire considérablement le nombre de souris utilisées. Seules les expériences donnant des résultats encourageants seront répétées ; le minimum d'animaux nécessaire à l'obtention de données statistiquement robustes sera utilisé. Ce nombre a été défini d'après notre expérience, et avec l'aide d'un biostatisticien. Des tests statistiques de type Mann-Whitney et ANOVA, seront appliqués pour déterminer la significativité des données. Raffinement : Répartis, après sevrage, par groupes de 5 souris de même sexe et de même fratrie, la plupart du temps jamais séparés au cours de la procédure et manipulés par le même expérimentateur, les animaux sont hébergés et manipulés selon les règles et protocoles établis, avec un suivi strictement défini et régulier. Des

points limites sont définis et spécifiques de la maladie, ils permettent d'anticiper de façon fiable toute souffrance animale inutile.

19157 Chez tous les vertébrés, on trouve des tissus spécialisés dont la surface est couverte de cellules dotées de cils vibratiles qui battent de manière coordonnée pour permettre un mouvement liquidien dirigé. Ces cellules multiciliées jouent un rôle crucial dans divers processus physiologiques tels que l'évacuation du mucus et des particules nocives inhalées par les voies respiratoires, la circulation du liquide céphalo-rachidien dans le cerveau, ou encore la migration de l'ovule au lieu d'implantation dans l'utérus. Ainsi, plusieurs pathologies humaines, causées par des dysfonctionnements des cellules ciliées, se manifestent par des difficultés respiratoires chroniques, des troubles cérébraux, ou reproductifs. Toutefois, la recherche peine à expliquer la biologie des cellules multiciliées par manque de modèles simples d'accès.

Le projet a pour but d'étudier l'épiderme cilié de l'embryon de xénope, présent dans les soixante-douze premières heures du développement de l'embryon. L'embryon de xénope se prête facilement à l'analyse de la fonction des gènes impliqués dans la mise en place du tissu, la micro-injection de molécules dès la fécondation, permet d'inhiber ou d'activer des gènes d'intérêt. L'épiderme cilié est particulièrement bien adapté à l'analyse fonctionnelle, puisqu'il peut être ciblé spécifiquement et se trouve à la surface de l'embryon, facilitant grandement l'imagerie par microscopie à fluorescence ou électronique. Ce tissu peut également être facilement exposé à des composés pharmacologiques ou à des protéines recombinantes à divers stades de son développement, et soumis à la transgénèse pour suivre et manipuler les différents types de cellules qui le composent. Le projet requiert l'utilisation d'animaux adultes pour l'obtention des embryons.

Nous utilisons une méthode de fécondation in vitro qui requiert la mise à mort du mâle pour le prélèvement des testicules. Celle-ci est réalisée chez l'animal anesthésié (le prélèvement nécessite que l'animal soit vivant pour préserver l'intégrité des spermatozoïdes).

Les femelles en revanche sont réutilisées après la ponte qui est obtenue par stimulation hormonale. La stimulation sera induite tous les quatre mois environ (au minimum trois mois). Cette fécondation in vitro nous permet d'obtenir des lots d'embryons se développant de manière synchrone.

Notre projet se fera dans le respect de la règle des 3R. Nous avons notamment établi une lignée cellulaire multiciliée, qui sera utile pour développer des approches de biochimie, mais ne permettra pas de remplacer notre modèle animal puisque les cils produits par ces cellules ne battent pas, nous interdisant toute étude des paramètres hydrodynamiques du système.

Une femelle de xénope peut être stimulée plusieurs fois par an (entre deux et trois fois) avec des variations sur chaque ponte de quantité (de rien à quelques centaines d'œufs) et de qualité (certaines pontes sont inutilisables). Chaque femelle sera donc stimulée trois fois par an et quinze fois sur cinq ans, ce qui réduit considérablement le nombre d'animaux utilisés.

Pour réaliser ce projet, nous utiliserons au total 100 femelles et 240 mâles sur cinq ans soit 340 animaux au total.

Notre animalerie xénope est dotée d'un système multiportoirs, composé d'une unité de traitement de l'eau connectée (pH constant à 7,5, conductivité de 1100uS/cm et température de 20°C) à une série de portoirs qui abritent trente-six aquariums de vingt-sept litres, garantissant des conditions micro-environnementales constantes, et permettant l'hébergement de 300 à 400 individus de l'espèce *Xenopus laevis*.

Les aquariums de couleur brunâtre, confèrent aux animaux un environnement optimal en matière de luminosité, limitant leur stress, et inhibant la croissance des algues. L'éclairage est réglé sur un cycle jour-nuit 12h/12 h. La pièce est thermo-régulée à 20°C toute l'année.

Les animaux sont nourris 3 fois par semaine avec des granulés destinés aux animaux aquatiques par un agent dédié qui vérifie également l'état sanitaire des animaux quotidiennement.

L'ensemble de ces facteurs combiné à un enrichissement des aquariums (cachettes en plexiglas) permettent de limiter le stress des animaux et d'améliorer leur qualité de vie au quotidien.

Les procédures expérimentales, à savoir injections sous cutanée hormonales chez la femelle et ablation des testicules chez le mâle seront réalisées par des personnes expérimentées, et après anesthésie (chez le mâle).

19158 Nous étudions le rôle d'une protéine qui est indispensable aux étapes précoces du développement de l'embryon de mammifère et qui est essentielle pour maintenir les capacités des cellules souches embryonnaires à se différencier en tous les types cellulaires. L'absence de cette protéine entraîne l'arrêt du développement de l'embryon, juste après son implantation dans l'utérus. On ne connaît rien sur son rôle éventuel à d'autres stades de la vie. Par contre, on sait qu'elle est ré-exprimée chez l'adulte lors des processus métastatiques associés à l'état tumoral. Ainsi des mécanismes similaires semblent réguler le développement précoce de l'embryon de mammifère, la maintenance et le renouvellement des tissus dans l'organisme adulte et sont au centre de nombreuses situations pathologiques. Par conséquent, connaître et comprendre le rôle de notre protéine d'intérêt dans des contextes aussi différents revêt un intérêt majeur.

L'objectif de l'étude que nous entreprenons est d'explorer si cette protéine joue un rôle dans le développement post-natal précoce, si ce rôle est comparable à celui qu'elle exerce dans l'embryon et s'il fait intervenir des mécanismes similaires à ceux utilisés dans l'embryon.

Le développement de l'organisme nécessite des interactions moléculaires et spatiotemporelles précisément coordonnées. Juste après la naissance les poumons deviennent fonctionnels, la méiose assure la formation de gamètes matures, la thyroïde contrôle le métabolisme et la croissance du corps ainsi que le développement du cervelet. Aucun modèle d'invertébrés ou de culture cellulaire ne pourrait reproduire la mise en place de ces fonctions majeures qui permettent la vie post-natale.

Ces considérations rendent indispensable une exploration in vivo pour évaluer le rôle de notre protéine. Notre modèle animal sera la souris, dont la physiologie est très proche de celle des autres mammifères, Notre projet a été conçu dans le respect de la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner) et du bien-être des animaux.

Le génome de la souris peut être modifié : nous utiliserons une approche d'inactivation conditionnelle pour éliminer le gène à des jours précis du développement du nouveau-né puis nous comparerons les groupes de souris mutantes à des groupes de souris témoins. Dans un souci de sécurité nous ferons une étude préliminaire avec un petit nombre d'animaux pour valider l'approche méthodologique et son utilisation chez le nouveau-né. Dans un second temps nous déclencherons la mutation chez des nouveau-nés de différents âges et nous identifierons le jour où un changement de phénotype est détecté. Puis nous caractériserons ce phénotype en utilisant des techniques d'imagerie 3D, de biologie cellulaire et de biologie moléculaire.

L'objectif final de ce projet est de créer des données « omiques » (par exemple l'expression des gènes (transcriptome)) à partir des nouveau-nés mutants. L'analyse comparative de ces analyses avec celles d'autres stades de développement ou d'états pathologiques permettra d'identifier la nature des mécanismes perturbés par la mutation et de découvrir le rôle joué par notre protéine d'intérêt durant la période néo-natale. Nous espérons mettre en évidence de nouvelles interactions moléculaires impliquées par exemple dans le contrôle de la différenciation ou de la migration cellulaire, interactions qui régissent des moments clefs du développement et du processus métastatique, et identifier de nouveaux biomarqueurs.

- Nous prévoyons d'utiliser pour cette étude 600 souris sur 3 ans. Le nombre d'animaux prévus pour ce projet a été réduit à l'effectif minimum permettant d'effectuer toutes les expériences nécessaires à l'obtention de résultats scientifiquement et statistiquement fiables. Nous effectuerons une étude préliminaire avec quelques nouveau-nés afin d'évaluer la stratégie.

- Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux. Les souris seront élevées dans des cages où elles trouveront différents objets et matériaux qu'elles pourraient trouver dans leur environnement naturel : des nids et des tunnels en fibre végétale dans lesquels elles pourront s'isoler, des boules de coton avec

lesquelles elles pourront enrichir leur nid. Leur état de santé sera surveillé quotidiennement tout au long de l'expérience ce qui permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de stress ou de souffrance. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. Ce projet est prévu pour une durée de 3 ans. Au cours de cette période les expériences seront menées successivement et tout protocole induisant un stress ou une souffrance inattendue lors des premières expérimentations sera évidemment arrêté.

19159 Ce projet couvre l'ensemble des études très précoces réalisées sur l'ensemble des candidats médicaments de notre recherche, études pour lesquelles il n'existe pas d'alternative validée scientifiquement, éthiquement et réglementairement à l'utilisation d'animaux. Ces études sont réalisées conformément aux principes éthiques. Au cours du développement de tout nouveau médicament, des études sont requises par les autorités pour évaluer sa sécurité d'utilisation chez l'Homme, rechercher les mécanismes liés à une toxicité éventuelle et proposer des mesures d'accompagnement pour renforcer le bénéfice/risque à utiliser ces médicaments. La réglementation impose l'utilisation d'espèces rongeurs et non-rongeurs. Les primates non-humains (macaque cynomolgus) ne sont utilisés que si les autres non-rongeurs ne permettent pas de répondre aux objectifs du projet en tenant compte des éléments suivants:

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

Les études incluses dans ce projet ont une durée de 1j à 4 semaines selon le mode d'administration prévu chez l'Homme. Les voies d'administrations (orale ou parentérale) sont celles prévues chez l'Homme. Des examens réguliers, à l'aide de matériel adapté à chaque espèce, incluent observations cliniques, prise de température corporelle (mesure rectale), prélèvements de sang pour vérifier les paramètres hémato-biochimiques et vérifier le passage du médicament dans le sang, examen cardiologique (ECG ou mesure de pression artérielle généralement par télémétrie non invasive), collecte d'urines (via des entonnoirs placés sous les unités d'hébergement), examen ophtalmologique.

Pour mener à bien ces études, il peut être nécessaire de manipuler les animaux sur une très courte durée ; les animaux sont régulièrement entraînés à ces manipulations et des procédures de renforcement positifs (récompenses, jeux) sont régulièrement mises en œuvre. Certains animaux peuvent être ré-utilisés si les conditions sont conformes à la réglementation. Les autres animaux sont sacrifiés en fin d'étude pour identifier les organes qui pourraient être l'objet d'effets adverses. Le nombre d'animaux utilisé dans ces études préliminaires est inférieur à celui des études réglementaires et est choisi en fonction de la variabilité des paramètres examinés afin de permettre d'atteindre les objectifs de l'étude. Le degré de sévérité de ces études ne doit pas dépasser le stade modéré : des grilles de points-limites sont appliquées, sous contrôle d'un vétérinaire, afin de prendre des décisions très rapidement chaque fois que cela s'avère nécessaire et éviter ainsi toute souffrance inutile.

Le bénéfice apporté par ce projet est de permettre d'optimiser le développement de candidats médicaments en évaluant très précocement leur toxicité éventuelle (réduction ainsi du nombre d'études réglementaires) et en ajustant au mieux les doses et le schéma expérimental des études réglementaires (diminution des contraintes pour l'animal dans les études réglementaires). Le projet est prévu pour 5 ans. Selon le nombre de candidats médicaments qui atteindront l'étape de validation « in vivo », chaque année, un maximum de 2000 rongeurs ou de 100 non-rongeurs sera utilisé (50 chiens et/ou 50 PNH) (dont des animaux ré-utilisés).

19160 L'audition nous permet, non seulement d'identifier et de localiser les sources sonores dans l'environnement, mais elle est également primordiale pour notre communication dans la société. A ce titre, les surdités ont un impact socio-économique colossal. La cochlée est l'organe sensoriel auditif des mammifères. Elle joue un rôle essentiel dans la perception des sons. La cochlée analyse

les sons, c'est-à-dire qu'elle décompose tout son complexe en sa fréquence fondamentale et ses harmoniques. Comme exemple de son, le « La » du diapason peut être obtenu aussi bien par un violon que par un piano : cette note que nous percevons correspond à la fréquence fondamentale tandis que le timbre de l'instrument provient des harmoniques. La cochlée nous permet donc de percevoir la hauteur des sons ainsi que leur timbre, ce qui est essentiel pour distinguer différentes voix ou plus généralement différents sons de hauteur voisine. L'analyse du son par la cochlée repose à la fois sur ses propriétés mécaniques et sur l'organisation spatiale des milliers de cellules qui la composent, dont les cellules sensorielles auditives qui convertissent la stimulation sonore en influx nerveux se propageant jusqu'au cerveau. Les mécanismes moléculaires et cellulaires à l'origine du développement de la cochlée en analyseur fréquentiel du son restent un mystère. Le déchiffrement de ces mécanismes revêt un intérêt majeur pour guider les études visant à fabriquer des organoïdes sensoriels auditifs à partir de cellules souches, à des fins thérapeutiques.

L'objectif de ce projet de recherche est d'utiliser les outils issus de la thérapie génique afin de modifier l'expression de gènes qui ont un rôle majeur au cours du développement cochléaire. Cette approche offre un meilleur contrôle spatial et temporel que les outils génétiques classiques, et elle permettra une compréhension détaillée des mécanismes moléculaires et cellulaires qui sous-tendent le développement de la cochlée en analyseur des fréquences sonores. Ces résultats ouvriront la voie à de nouvelles approches visant à fabriquer des organoïdes cochléaires ayant des propriétés proches de celles d'une cochlée dans le but ultime de remplacer les animaux de laboratoire par un modèle *in vitro* suffisamment élaboré pour avoir une pertinence fonctionnelle. Enfin, ces résultats ouvriront également la voie à de nouvelles approches thérapeutiques dans le but de rétablir l'audition chez des patients atteints de surdité héréditaire.

Ce projet ne comporte aucune restriction (par ex. hydrique, alimentaire, contention prolongée) par rapport aux conditions habituelles d'hébergement. Le raffinement mis en place consistera à administrer un analgésique et un antibiotique à l'animal, un gel énergétique, dit *diet gel*, sera mis à la disposition des souris qui ont été opérées, et un suivi régulier et des points limites spécifiques et précoces seront mis en place afin de réduire la souffrance de l'animal. Dès le point limite atteint, il sera procédé à la mise à mort de l'animal.

Ce projet comprend 3 procédures (2 de sévérité moyenne concernant 756 souris, et la 3ème de sévérité légère concerne 648 souris) et au total 1404 souris sur une durée de 5 ans. Afin d'optimiser le nombre d'animaux, nous avons pris en compte la variabilité possible des résultats en se basant sur l'expérience acquise. Ces souris sont élevées et hébergées dans les conditions optimales. Les souris mâles et femelles seront utilisées sans distinction.

19161 Ce projet couvre l'ensemble des études précoces réalisées sur les candidats médicaments grâce à l'utilisation d'animaux, en l'absence de méthode alternative pertinente disponible. Les études réalisées dans ce cadre ont pour but d'aider à choisir les doses pour les études réglementaires précliniques et, à terme, permettre de sécuriser la première administration du candidat médicament chez l'humain. Dans le cadre de ce projet, différentes entités moléculaires pourront être testées en fonction des études réglementaires qui seront demandées : petite molécule chimique ou biologique, thérapie génique, anticorps... Plusieurs axes thérapeutiques seront visés en fonction des demandes qui seront formulées par les départements de recherche concernés. Cela pourra donc inclure l'évaluation de candidats-médicaments avec indication en cardiologie, en oncologie, en neuropsychiatrie ou pour le traitement de pathologies métaboliques et maladies auto-immunes.

Au cours du développement de tout nouveau médicament, des études sont requises par les autorités pour évaluer sa sécurité d'utilisation chez l'humain, rechercher les mécanismes liés à une toxicité éventuelle et proposer des mesures d'accompagnement pour améliorer le rapport bénéfice/risque à utiliser ces médicaments. Actuellement il n'existe pas d'alternative validée scientifiquement, éthiquement et réglementairement à l'utilisation d'animaux pour beaucoup de ces études. La réglementation imposant l'utilisation d'espèces rongeurs et non-rongeurs dans le cadre de ces études, le primate non-humain (macaque *cynomolgus*) peut être utilisé uniquement si les autres espèces non-rongeurs ne permettent pas de répondre aux objectifs du projet et ce, en tenant compte des éléments suivants :

- La tolérabilité du candidat médicament chez l'espèce non-rongeur
- La similarité des paramètres cinétiques (biodisponibilité, exposition) ou du métabolisme (métabolites produits) entre l'espèce non-rongeur et l'humain
- La présence et la répartition connue de la cible thérapeutique chez l'espèce non-rongeur
- La sensibilité au mécanisme d'action du candidat médicament comme par exemple le risque de réaction immunogène (« réaction allergique ») lié au type de candidat médicament testé (chimique ou biologique)
- La spécificité anatomique et physiologique de l'espèce non-rongeur ou la présence d'une pathologie spécifique à l'espèce et/ou au candidat médicament testé.

Les études incluses dans ce projet ont une durée de 1j à 4 semaines selon le mode d'administration prévu chez l'humain. Les voies d'administrations (orale ou parentérale) sont celles prévues chez l'Homme. Des examens réguliers seront faits à l'aide de matériel adapté à l'espèce et incluent : observations cliniques, prise de température corporelle (mesure rectale), prélèvements de sang pour vérifier les paramètres hémato-biochimiques et vérifier le passage du médicament dans le sang, examen cardiologique (ECG ou mesure de pression artérielle généralement par télémétrie non invasive), collecte d'urines (via des entonnoirs placés sous les unités d'hébergement), examen ophtalmologique (sous anesthésie, technique non invasive).

Pour mener à bien ces études, il peut être nécessaire de manipuler les animaux sur une très courte durée. Ils sont donc régulièrement entraînés à ces manipulations et des procédures de renforcement positifs (récompenses) sont régulièrement mises en œuvre. Certains animaux peuvent être réutilisés si les conditions sont conformes à la réglementation ou au type de candidat médicament utilisé. Les autres animaux peuvent être euthanasiés en fin d'étude pour identifier les organes cibles et ainsi permettre de proposer des méthodes de suivi des patients pour s'assurer que le traitement n'a pas, chez eux, d'effet adverse sur les organes cibles identifiés. Le nombre d'animaux est choisi en fonction de la variabilité des paramètres examinés afin de permettre d'atteindre les objectifs de l'étude et est largement inférieur à celui des études réglementaires.

Afin d'éviter toute souffrance inutile, des grilles de points-limites sont appliquées sous contrôle d'un vétérinaire afin de prendre des décisions très rapidement chaque fois que cela s'avère nécessaire. Ainsi, le degré de sévérité est suivi de manière approfondie et ne doit pas dépasser le stade modéré.

L'objectif de ce projet est d'évaluer très précocement la toxicité éventuelle de candidats-médicaments en ajustant au mieux les doses et le schéma expérimental des études réglementaires (diminution des contraintes pour l'animal). Détecter le plus précocement possible des effets potentiellement toxiques des candidats-médicaments en développement permettra en plus d'assurer la réduction du nombre d'animaux qui seront utilisés à des fins de recherche pour sécuriser in fine l'utilisation chez les patients.

Selon le nombre de candidats médicaments nécessitant l'utilisation du primate non-humain, un maximum de 95 animaux sera utilisé sur l'année.

19162 Les bovins sont régulièrement utilisés pour la recherche biomédicale dans les domaines du médicament vétérinaire. L'objectif de ce projet est de suivre les paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques ce qui permettra de connaître davantage la molécule. A cette posologie, on ne s'attend pas à avoir des observations particulièrement dommageable pour l'animal.

Dans ce projet, 12 animaux dont 3 animaux réserves seront inclus. La molécule test à administrer (classe thérapeutique : antivirale) sera administrée par voie sous-cutanée, en une seule injection.

Trois formulations différentes seront testées. Les 9 animaux administrés seront repartis dans 3 groupes de 3 animaux, une formulation sera testée dans chaque groupe.

Le volume d'administration pour chaque formulation sera de 10 mL et l'administration sera faite au niveau de l'encolure des animaux en un seul point d'injection. Les administrations seront réalisées par un personnel expérimenté et selon les bonnes pratiques vétérinaires.

La zone au point d'injection sera observée jusqu'à 28 jours après administration. Le gonflement, l'oedème, l'érythème, la douleur ou l'induration seront des points particulièrement observés.

L'observation générale des animaux sera faite quotidiennement, la température corporelle des animaux sera mesurée une fois par semaine jusqu'à 28 jours après administration.

Afin d'évaluer les paramètres pharmacocinétiques des formulations administrées, des prélèvements sanguins seront réalisés sur l'animal. Le volume de sang prélevé sera de 2 mL par prélèvements. Il y aura 7 prélèvements sur 24h puis 21 prélèvements étalés sur 28 jours.

Afin d'évaluer les paramètres pharmacodynamiques de la molécule administrée, des prélèvements hématobiochimiques seront réalisés juste avant administration, à Day 14 et Day 28 post administration.

Les prélèvements sanguins seront réalisés par un personnel expérimenté et toujours conforme à la réglementation en vigueur et aux bonnes pratiques vétérinaires. Les prélèvements sanguins seront toujours réduits au minimum. Ils seront réalisés par ponction directe sur animal vigile.

Aucune méthode alternative ne permettant actuellement de reproduire la diffusion d'un produit dans le sang des animaux ni d'évaluer les effets d'une molécule sur un ou plusieurs paramètres pharmacodynamiques au niveau de

l'organisme entier, il est indispensable de recourir à l'animal entier. L'animal ne peut pas être remplacé.

Dans ce projet, 9 animaux seront administrés, et 3 animaux réserves sont prévus si besoin. C'est le nombre d'animaux minimal pour avoir des résultats interprétables.

Les animaux seront hébergés en groupe avec un enrichissement du milieu adapté. Une attention particulière sera alors portée au raffinement (exemple: alternance des sites de prélèvements de sang au maximum...) et à l'enrichissement du milieu (contact entre congénères, paillage, surface suffisante de l'hébergement, accès à des pâtures extérieures...)

Au total, 12 animaux dont 3 animaux réserves seront utilisés en 1 an dans ce projet.

19163 La myopathie de Duchenne est une maladie génétique qui touche le muscle chez l'enfant, provoquant une faiblesse musculaire généralisée et évolutive. Les patients sont contraints à l'usage du fauteuil roulant vers l'âge de 10 ans, et décèdent d'insuffisance respiratoire ou cardiaque vers l'âge de 30 ans. En marge de ce tableau clinique musculaire, les patients présentent, pour certains, des troubles cognitifs à des degrés variables, pouvant se manifester par des troubles de la mémoire verbale court terme, de la mémoire visuo-spatiale long terme, et de l'aisance verbale. Des symptômes plus marqués du spectre autistique, de déficit de l'attention, ou de dyslexie peuvent également être présents. Même si l'enjeu actuel pour cette maladie est d'améliorer les fonctions musculaires squelettique et cardiaque, l'atteinte cognitive, parfois invalidante et source de diminution de la qualité de vie, est également un élément du tableau clinique à ne pas négliger dans le développement thérapeutique.

Il existe différents modèles de cette maladie pour travailler sur l'élaboration des médicaments, depuis les modèles in vitro, jusqu'aux modèles animaux. Toutefois, seul le contexte du chien atteint spontanément par cette maladie, notamment le chien GRMD (golden retriever muscular dystrophy), reproduit de manière fidèle les manifestations cliniques et fonctionnelles rencontrées chez les patients. Lorsqu'un médicament a fait ses preuves sur des modèles in vitro puis dans le modèle murin, et qu'il a des chances réelles d'arriver au chevet du patient, son efficacité chez le chien GRMD permet d'envisager un passage en clinique prometteur. De nombreuses méthodes d'évaluation non-invasives ont été développées dans ce modèle et permettent de suivre précisément les effets d'un traitement sur les fonctions locomotrice, respiratoire et cardiaque, mais à ce jour l'existence d'anomalies de la cognition chez ces chiens n'a jamais été investiguée.

L'objectif de cette étude est d'évaluer si une dysfonction cognitive peut être identifiée chez les chiens GRMD, au travers de la tâche du "holeboard", une tâche visuo-spatiale permettant de mesurer de nombreux paramètres de performance cognitive dont la mémoire de travail (mémoire immédiate) et la mémoire de référence (mémoire à long terme).

Cinquante chiens, sains et GRMD, âgés de 6 mois à 5 ans, participant à d'autres programmes sans interférence avec la présente étude, seront inclus dans ce projet, sur avis vétérinaire. Après une

phase d'habituation progressive au dispositif du holeboard, le test proprement dit sera réalisé. Le chien sera conduit dans la salle de test, dans laquelle le holeboard aura été installé. Il s'agit de 9 plots contenant chacun une gamelle. Au cours de la phase d'habituation le chien aura été familiarisé avec les plots et avec le fait que ceux-ci sont récompensés par un morceau d'aliment appétent. Lors du test, seuls quelques plots seront récompensés. Le chien aura un premier accès au holeboard, au cours duquel il pourra librement explorer l'ensemble des plots et mémoriser ceux qui sont récompensés. Puis, le chien sera sorti de la pièce le temps de remettre des récompenses aux mêmes endroits. Le chien sera ensuite de nouveau conduit dans la salle et son schéma d'exploration des différents plots sera évalué afin de déterminer si la mémorisation au cours de la première visite a été effective.

Ce projet sera conduit dans le respect de la règle des 3R:

Remplacement : L'évaluation de performances au cours de tâches cognitives telles que celle du holeboard ne peut s'affranchir du passage par l'animal.

Réduction : Nous n'utiliserons pas d'animaux spécifiquement pour ce projet, mais recruterons des chiens inclus dans d'autres projets non interférants. Des données issues de jeunes chiens sains de propriétaires seront collectées en parallèle et pourront permettre d'augmenter la quantité de données de référence.

Raffinement : Tout sera mis en oeuvre afin que le test du holeboard ne soit pas générateur de stress pour les animaux. Ainsi un protocole d'habituation très progressive à la salle, au holeboard et au fait d'être seul dans la pièce sera mis en oeuvre. Si malgré cela la situation s'avérait stressante pour le chien (pas de progrès en phase d'habituation), ce dernier serait exclu de l'étude.

Les données collectées au cours de cette étude pourront également servir de référence pour la mise en oeuvre du test du holeboard dans le cadre du suivi du syndrome de dysfonction cognitive canine, associée au vieillissement chez le chien.

19164 Les trypanosomes africains sont des parasites unicellulaires flagellés transmis aux mammifères par la piqûre infectante de la glossine ou mouche tsé-tsé. Ils sont responsables de la maladie du sommeil chez l'homme et de nombreux hôtes mammifères. Les trypanosomes prolifèrent d'abord librement dans le sang, puis passent la barrière hémato-méningée pour envahir le cerveau après plusieurs semaines ou plusieurs mois selon l'espèce de parasite et la susceptibilité immunogénétique de l'hôte. Les étapes précoces de l'infection de l'hôte restent cependant peu connues. Durant les 5 premiers jours après la piqure, la localisation précise (derme, ganglions lymphatiques,...), le comportement des parasites (prolifération, différenciation, migration,...), ainsi que l'initiation de la réponse immunitaire sont des éléments cruciaux qui déterminent le développement de l'infection. Une meilleure connaissance de ces mécanismes précoces permettrait donc d'envisager de nouvelles cibles diagnostiques, thérapeutiques et / ou vaccinales.

Pour comprendre ces mécanismes, le recours à l'animal est indispensable. Nous suivrons donc par des méthodes de cytométrie en flux les premières étapes de l'infection de la souris après injection intra-péritonéale ou injection intra-dermique de *Trypanosoma brucei brucei* (non-infectieux pour l'homme).

Les expériences sont conçues dans le respect des règles des 3R, avec les stratégies suivantes :

- **Remplacement** : C'est par une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques de l'interaction hôte – parasite que l'on pourra apporter de meilleures solutions thérapeutiques ou vaccinales contre les pathogènes tel que les trypanosomes. Les méthodes disponibles *in vitro* ne permettent pas de prendre en considération toute la complexité de la réponse immune en réponse à l'entrée du parasite dans l'organisme suite à une piqure d'insecte. Il est nécessaire d'utiliser un modèle *in vivo* afin de tenir compte de toute la complexité des tissus infectés et d'avoir toute la chaîne de mise en place de la réponse immunitaire à savoir la réponse innée dans le tissu puis la réponse adaptative dans les organes lymphoïdes.

- **Réduction**: Une planification statistique préalable a permis de réduire le nombre d'animaux tout en préservant la validité statistique des essais vaccinaux. Chaque groupe de souris comprendra 6 animaux. Dans chaque expérience, un groupe de souris contrôle négatif non-infecté sera inclus

(injection de sérum physiologique) afin de garantir la spécificité des observations. Au total, notre projet utilisera 288 animaux (souris).

- Raffinement :

- a. Différentes voies d'infection peu invasives ;
- b. Suivi des signes de souffrance ou douleur, et des actions adaptées selon l'analyse clinique, (p. ex. l'utilisation d'analgésique et anti-inflammatoire) ;
- c. Anesthésie locale ou systémique lors des interventions considérées comme invasives ;
- d. Utilisation des méthodes les moins douloureuses de prélèvement sanguin

La procédure sera identique dans tous les cas : après infection, chaque individu sera suivi quotidiennement pendant 5 jours, puis tous les 4 jours sur une durée maximum trois semaines en tout. Toutes les étapes d'infection, de prélèvements sanguins à la queue pour suivre la parasitémie avant la mise à mort, seront réalisées sous anesthésie générale et analgésie.

Au total, au maximum 288 souris mâles adultes seront incluses dans une seule procédure de classe de sévérité modérée sur une durée totale de 5 ans. D'après la littérature et nos expériences préliminaires : (1) aucune réaction inflammatoire localisée n'est observée au site de l'infection, (2) les symptômes de la maladie ne s'installent chez la souris qu'après au moins 3 semaines, (3) la mort ne survient qu'à partir de 5 à 8 semaines. Dans nos conditions d'observation d'une durée maximum de 3 semaines, aucun dommage évident n'est donc attendu.

Ces études déboucheront sur la première observation intégrée des étapes précoces de l'infection des trypanosomes et sera déterminante pour améliorer le diagnostic précoce et le traitement de cette maladie qui est toujours mortelle en l'absence de traitement.

19165 L'inflammation pulmonaire est une caractéristique importante et potentiellement grave de plusieurs pathologies aiguës comme la pneumonie, la détresse respiratoire aiguë survenant par exemple dans les cas graves d'infection au COVID-19, ou chroniques, telles l'asthme ou certaines pathologies des bronches. De nombreuses stratégies thérapeutiques ont été développées. Une de ces stratégies cible les cytokines et leurs récepteurs. En bloquant ces molécules ou leurs interactions, on peut médier la réponse immunitaire pulmonaire, diminuer l'inflammation et améliorer l'état voire la survie du patient.

L'objectif de ce projet est d'évaluer la tolérance et l'efficacité de nouvelles thérapies contre l'inflammation pulmonaire dans un modèle pathologique chez le lapin.

Le projet comportera 2 phases : 1) la mise au point et la caractérisation du modèle par différentes techniques d'induction, 2) l'évaluation comparative des traitements de biothérapie.

On estime qu'un nombre de 110 lapins seront utilisés pour les 5 ans de la demande, soit environ 20 lapins par an.

Principe des 3R :

- Remplacement : La mise au point, l'évaluation et l'optimisation des traitements nécessitent l'utilisation d'un système in vivo reproduisant les conditions cliniques pathologiques : anatomie et physiologie, cibles thérapeutiques, critères d'évaluation, régime de traitement.
- Réduction : En amont, des méthodes in vitro sont utilisées pour vérifier l'affinité, le mécanisme d'action ou la cytotoxicité des produits testés. Le nombre d'animaux utilisés pour chaque étude est estimé d'après les données de la littérature, l'expérience de notre établissement et les guides réglementaires sur le nombre d'individus nécessaire pour réaliser une analyse statistique pertinente, classiquement compris entre 4 et 6 animaux par groupe d'étude.
- Raffinement : Les animaux seront hébergés dans des cages individuelles. Le milieu est enrichi par des plateformes, morceaux de bois pour que les animaux puissent jouer, ainsi que des carottes et du persil. Une visite quotidienne est effectuée. Un protocole de suivi des animaux est mis en place, avec évaluation de la douleur, traitement analgésique systématique et symptomatique et points-limites.

19166 Ce projet s'inscrit dans une démarche translationnelle entre le développement préclinique et le développement clinique pour une visée thérapeutique dans le contexte de la leucémie aigüe. Il se concentre sur l'évaluation préclinique et l'accompagnement du développement clinique d'un nouveau traitement inducteur de mort cellulaire dans les leucémies (cancer du sang). Cette nouvelle molécule déjà testée dans le cancer du sein paraît intéressante pour traiter les leucémies.

Les résultats *in vitro* au laboratoire indiquent que cette molécule est active sur les lignées cellulaires leucémiques et sur des cellules de patient traitées *ex-vivo* ce qui induit la mort cellulaire. De plus il a été mis en évidence des effets accrus lorsqu'elle est utilisée avec des thérapies anti-leucémiques conventionnelles. En effet cette molécule permet d'améliorer l'efficacité des traitements de référence seuls.

Pour mener à bien ce projet, nous allons mettre en place un modèle murin développant une leucémie humaine, modèle expérimental se rapprochant le plus de la pathologie humaine. Pour cela, des souris dépourvues de système immunitaire, afin d'éviter tout rejet de greffe, vont recevoir par voie intraveineuse une injection d'une lignée cellulaire leucémique humaine (2 lignées différentes seront testées afin d'éprouver la pertinence des résultats obtenus). Dans un second temps, ces souris recevront, par voie intra-péritonéale ou orale (gavage avec une sonde souple) ou intra veineuse les différents traitements seuls ou combinés les uns aux autres. Ces traitements correspondent à la molécule que nous souhaitons évaluer dans la leucémie aigüe, et aux deux agents étant utilisés classiquement pour soigner les patients atteints de leucémie aigüe. Les traitements par gavage seront donnés 5 jours par semaine pendant 3 semaines, le traitement par voie intrapéritonéale sera donné 5 jours par semaine pendant la première semaine seulement, et enfin le traitement par voie intraveineuse sera donné une fois par semaine pendant 3 semaines; aucun moyen de délivrance des traitements entrainera de la douleur et par conséquent nécessitera l'anesthésie préalable des souris. Le début du traitement débutera 3 jours après l'injection des cellules tumorales. L'efficacité des stratégies thérapeutiques utilisées sera évaluée par suivi de la présence des cellules tumorales dans le sang de manière hebdomadaire par prélèvement de quelques gouttes de sang dans la veine mandibulaire ; cet acte ne sera pas non plus réalisé sous anesthésie

En accord avec la règle des 3R, nous avons réalisé le maximum d'expériences *in vitro* afin de valider l'efficacité de notre molécule thérapeutique, seule ou en combinaison. Néanmoins, il est nécessaire de vérifier ces résultats dans un modèle *in vivo* intégrant la plupart des caractéristiques de la pathologie humaine telles que l'hétérogénéité des cellules tumorales, l'existence de tissus sains, la présence de barrières limitant l'efficacité des traitements. De plus cette étude est un préalable indispensable à toute utilisation en médecine humaine. Nous avons réduit le nombre de souris utilisées au minimum nécessaire et suffisant pour valider scientifiquement notre étude du point de vue de l'analyse statistique. Ce projet nécessitera donc l'utilisation de 320 souris, sur une durée d'un an pour répondre au besoin du projet. En effet 10 souris par groupe sont nécessaires pour avoir une puissance statistique interprétable, il y a 8 groupes par expérience (groupe contrôle = 1, groupes avec chaque molécule seule = 3, groupes avec l'association de deux molécules = 3, groupe tri-thérapie = 1), L'expérience sera faite deux fois (pour valider la reproductibilité des résultats), et il y a deux modèles (deux lignées cellulaires différentes utilisées).

Une attention toute particulière sera portée au bien-être des animaux par une surveillance journalière assurée par le personnel de l'animalerie et les expérimentateurs. Nous veillerons, par ailleurs, à réduire au minimum l'intensité et la durée des souffrances ressenties par les animaux, en utilisant une grille d'évaluation prenant en compte l'apparence physique, le poids et le comportement des animaux. Nous avons ainsi défini des critères d'arrêt qui lorsqu'ils sont atteints conduisent à l'euthanasie de la souris. Le suivi des souris en expérimentation se fera sur une période maximale de 4 mois après l'injection des cellules tumorales, à l'issue de laquelle tous les animaux seront euthanasiés.

19167 La pollution de l'air est un enjeu majeur de santé publique. Elle est responsable de 400 000 décès chaque année en Europe. Selon l'Agence européenne de l'environnement (AEE), les maladies cardiovasculaires et les crises cardiaques sont les principales causes (80%) de décès prématurés

due à la pollution de l'air en Europe, avant les maladies pulmonaires et le cancer. Il est aujourd'hui clairement établi qu'une exposition à l'air pollué, même relativement brève, est associée à une hausse de l'incidence de l'infarctus du myocarde, des accidents vasculaires cérébraux, d'arythmies comme la fibrillation auriculaire ainsi qu'à une aggravation de l'insuffisance cardiaque. Il est également bien documenté que l'exposition chronique à la pollution de l'air accélère le développement de plaques graisseuses dans les artères, augmente la pression artérielle et favorise la formation de caillots sanguins, trois importants facteurs de risque de maladie cardiovasculaire.

L'un des principaux challenges dans le contexte de l'étude des effets sur la santé de la pollution atmosphérique résulte de l'extrême complexité du mélange atmosphérique où des milliers de polluants ayant une diversité chimique énorme coexistent, produisant ainsi une réactivité chimique instantanée qu'il est impossible d'estimer avec les méthodes classiques de la chimie organique. En outre, cette réactivité est hautement modulée avec le temps du fait de la transformation rapide de nombreuses espèces sur des échelles de temps allant de la seconde à la minute. La pollution atmosphérique est ainsi constituée d'un mélange complexe de plusieurs milliers de composants qui évoluent dans le temps. Du point de vue de la santé, les constituants de la pollution atmosphérique les plus souvent associés à des effets délétères sont les polluants gazeux (comme l'ozone, le monoxyde de carbone, les oxydes d'azote, ...) et les particules. Cependant, et comme évoqué plus haut, la pertinence d'une telle approche basée sur l'étude des composants isolés de la pollution est entamée du fait de l'absence de considération de la synergie suspectée entre les différents constituants de la pollution atmosphérique. Pour répondre à ces interrogations, nous disposons d'un système unique permettant de soumettre des animaux à des atmosphères polluées complexes, système permettant d'aborder de manière pertinente et réaliste la problématique des effets du mélange de polluants de l'air sur la santé.

Nous nous intéressons particulièrement aux effets de la pollution atmosphérique sur l'ischémie des membres inférieurs chez la souris adulte. L'ischémie des membres inférieurs est obtenue par ligature d'un gros tronc artériel (l'artère fémorale) qui entraîne en aval une diminution de l'apport en sang et en oxygène dans la jambe. Nos objectifs consistent à déterminer l'impact d'une pollution atmosphérique complexe sur la revascularisation et la régénération du muscle après une lésion ischémique.

Nous travaillerons ainsi sur une atmosphère polluée modèle, représentative de la pollution atmosphérique présente dans une zone urbaine très polluée (Pékin). Les souris seront exposées à l'atmosphère de Pékin (pendant 10 jours continus) grâce au couplage de la chambre de simulation atmosphérique avec une armoire de stabulation permettant l'hébergement des souris dans leur cage ventilée, sans modification de leur environnement proche. Une partie de l'armoire a été isolée de façon à y faire entrer de l'air contrôlé non pollué (filtré à l'entrée). Quatre lots de souris seront constitués : 1. un lot exposé à l'atmosphère polluée pendant 10 jours avant l'induction de la lésion ischémique, 2. un lot exposé à l'atmosphère contrôlée pendant 10 jours avant l'induction de la lésion ischémique, 3. un lot exposé à l'atmosphère polluée pendant 10 jours juste après l'induction de la lésion ischémique et 4. un lot exposé à l'atmosphère contrôlée pendant 10 jours juste après l'induction de la lésion ischémique. Après l'induction de la lésion ischémique, les animaux seront suivis sur 6 périodes de temps (0, 2, 5, 10, 14 et 28 jours après la lésion ischémique). Nos objectifs sont de déterminer si l'exposition à un air pollué accélère le développement de lésion ischémique ou aggrave une lésion ischémique déjà établie.

Les principes de remplacement, réduction et raffinement ont été pris en compte pour construire les protocoles expérimentaux de ce projet. Quand l'observation le permet, une approche préalable de remplacement par l'utilisation de cultures cellulaires est employée, ce qui permet par la suite de réduire le nombre d'expériences incontournables réalisées sur l'animal. Pour réduire, nous utilisons le minimum statistiquement possible de souris par groupe et nous favorisons l'utilisation de la patte controlatérale comme contrôle sans lésion. Enfin pour raffiner, nous réduisons la souffrance des souris en utilisant des sédatifs et analgésiques au cours des procédures. Et nous améliorons également la qualité de l'élevage en enrichissant les cages expérimentales avec du coton, du carton et des maisonnettes en cellulose.

Notre étude fera appel à 144 souris au total réparties sur 1 seule procédure expérimentale.

19168 Malgré l'existence d'un vaccin préventif, l'infection chronique par le virus de l'Hépatite B (VHB) demeure un problème de santé majeur et représente l'une des premières causes de cancer du foie dans le monde. En effet, les estimations actuelles indiquent que plus de 250 millions de personnes sont infectées de façon chronique par le VHB au niveau mondial et que parmi celles-ci, environ 10 à 20 millions sont susceptibles de développer un cancer du foie. Les traitements utilisés actuellement en clinique permettent uniquement de réduire la réplication du virus mais pas de façon définitive et doivent donc être administrés de façon continue. En effet, la persistance du virus au sein des cellules du foie et sa capacité à reprendre la réplication virale lors de l'arrêt du traitement permet au virus de se maintenir de façon stable dans l'organisme et de continuer à produire des protéines virales pouvant modifier les fonctions des cellules du foie. Nous souhaitons dans ce projet tester, chez des souris au foie humanisé et stablement infectées par le VHB, 2 molécules inhibant des protéines exprimées par les cellules du foie impliquées dans le cycle viral du VHB. Ces molécules pourraient présenter un potentiel anti-viral qui permettrait d'aboutir à la découverte de nouveaux traitements plus efficaces.

Remplacer : Afin de remplacer les études in vivo sur animaux vivants, nous avons procédé à de nombreuses études in vitro sur des lignées de cellules du foie ainsi que sur des cellules du foie issues de patients.

Réduire : Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux inclus dans cette étude, nous n'utiliserons que des groupes relevant nous permettant de conclure quant à l'activité antivirale de nos molécules. Le nombre d'animaux inclus par groupe sera suffisant pour arriver à une conclusion claire de l'action de nos molécules. Nous utiliserons un total de 68 animaux répartis en 6 groupes de 6 animaux et 16 couples reproducteurs.

Raffiner : Afin de raffiner au mieux notre méthodologie, le protocole expérimental est planifié en amont, l'environnement des animaux est enrichi, des points limites que sont la perte de poids, une modification de l'activité des animaux, une posture prostrée et un dos voussé, l'apparition de signes de mal être et de douleur sont appliqués, et une méthode de mise à mort appropriée est utilisée. Les données obtenues grâce aux animaux de ce projet seront analysées avec des tests statistiques classiques.

19169 La transplantation d'îlots pancréatiques constitue aujourd'hui une alternative à l'insulinothérapie chez le patient diabétique de type 1. Cependant, le manque de donneurs, ainsi que le recours aux immunosuppresseurs limitent le succès à long terme et le déploiement à grande échelle de cette thérapeutique. C'est pour dépasser ces limites que des dispositifs d'encapsulation, appelés pancréas bioartificiels, ont été mis au point. Parmi eux, notre dispositif de macroencapsulation permet d'encapsuler des cellules sécrétrices d'insuline, à l'aide de membranes sélectives qui sont imperméables aux molécules impliquées dans le rejet mais perméables au glucose, à l'insuline, à l'oxygène et aux nutriments. En forme de petit disque plat implantable composé de matériaux biocompatibles il peut être rempli avec des cellules sécrétrices d'insuline de différentes origines en absence de traitement immunosupresseur, le dispositif étant immunoprotecteur.

La fonction du dispositif a déjà été validée in vivo et a conduit à des améliorations de différents composants du dispositif permettant aujourd'hui de disposer de la version finale, destinée à être implantée chez le patient lors des futurs essais cliniques. Parmi les types cellulaires qui pourraient remplacer les îlots issus de pancréas Humains, les îlots d'origine porcine sont particulièrement étudiés. L'insuline porcine a historiquement prouvé son efficacité et sa sécurité lorsqu'elle était utilisée chez les patients lors des premiers traitements par insuline. Enfin, les îlots de porc peuvent être produits en quantité suffisante afin de traiter la totalité des patients ayant besoin d'une transplantation d'îlots pancréatiques. L'autre source consiste en des cellules souches Humaines différenciées en cellules sécrétrices d'insuline, dont les données publiées par les différents producteurs montrent une fonctionnalité qui se compare à des îlots Humains. Les résultats attendus de ce protocole devraient nous permettre de valider, chez le rat diabétique, la sécurité et l'efficacité de la combinaison du dispositif avec des îlots porcins et/ou des cellules souches humaines différenciées. Cela permettra de valider les cellules les plus efficaces dans notre dispositif, pour préparer les premières phases cliniques. Le rat a l'avantage d'avoir des caractéristiques

physiologiques proches de l'Homme et de bien supporter les interventions chirurgicales. Ainsi, des dispositifs d'encapsulation seront implantés chez des rats mâles diabétiques pour une durée de six semaines. Ce délai laisse à l'animal le temps de cicatriser et permet le développement de vaisseaux sanguins autour du dispositif. Une fois ce délai écoulé, des îlots porcins ou cellules seront injectés dans les dispositifs via des chambres implantables et des cathéters placés en sous-cutanée. Les îlots ou cellules vont alors réguler de manière autonome et physiologique la glycémie de l'animal. Le dispositif implanté sera identique pour l'ensemble des groupes expérimentaux, mais des îlots porcins ou cellules souches différenciées de différentes sources seront utilisés. Ils diffèrent, dans le cas des îlots porcins par l'âge du porc au moment du prélèvement du pancréas (nouveau-né, juvénile, adulte) ou encore par la souche de porc pouvant porter des modifications de certains gènes afin d'augmenter la sécrétion d'insuline des îlots. Dans le cas des cellules différenciées, la principale différence entre les sources résidera dans le protocole de différenciation utilisé. Afin d'obtenir une meilleure régulation de la glycémie avant l'injection des cellules dans le dispositif, des implants délivrant de l'insuline en continu sont implantés sous la peau des rats diabétiques, et seront enlevés au moment de l'injection des cellules. 21 rats diabétiques avec notre dispositif rempli d'îlots porcins ou de cellules différenciées et 9 rats diabétiques recevant notre dispositif contenant du milieu seul seront utilisés pour chaque source d'îlots de porc et de cellules humaines. A ces deux groupes s'ajoutent les groupes contrôles suivants : 9 rats diabétiques sans dispositif recevant les cellules en intrapéritonéal et 9 rats non diabétiques ayant la même chirurgie que pour implanter un MailPan®, mais sans mise en place de dispositif. Ces effectifs par groupe sont justifiés par la variabilité liée à la fois au modèle de diabète, à l'implantation de dispositifs, ainsi qu'à la durée du suivi allant jusqu'à plusieurs mois. Ces effectifs permettront d'obtenir suffisamment de données pour réaliser des analyses statistiques et valider l'étude. Au total, 156 rats diabétiques seront nécessaires (240 implantés avec le dispositif et 72 recevant les îlots en intrapéritonéal), ce qui nécessite, au vu des 70% d'efficacité du modèle d'induction du diabète utilisé, l'emploi de 446 rats sains. A cela s'ajoutent 72 rats non diabétiques sans dispositif, pour un total de 518 rats utilisés pour l'étude. Remplacement : La compatibilité et la fonctionnalité des différentes sources d'îlots porcins avec notre dispositif aura été préalablement vérifiée in vitro. Cependant, leur sécurité et leur efficacité une fois placés dans le dispositif ne peuvent être évaluées que sur un modèle animal diabétique.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisés est réduit au minimum tout en permettant, grâce à des tests statistiques adaptés, de mettre en évidence des différences significatives au niveau des paramètres étudiés. L'effectif des différents groupes prend en compte des sources de variabilité importantes de l'étude que sont : le modèle de diabète, l'implantation de dispositifs et la durée du suivi allant jusqu'à plusieurs mois

Raffinement : Il intervient au niveau de l'anesthésie, réalisée au gaz pour un meilleur contrôle, et de la prise en charge post-opératoire par l'administration d'un anti-inflammatoire et anti-douleur. Il intervient également un niveau de l'hébergement avec un enrichissement des cages à l'aide de cylindres en PVC rouge, qui servent de refuge aux animaux et permet ainsi de diminuer leur stress. Afin de réduire les risques d'infection, les chirurgies sont réalisées sous hotte à flux laminaire, avec l'utilisation d'un protocole de désinfection de la peau spécifique, ainsi que des champs opératoires stériles. Le raffinement est aussi présent dans le suivi des animaux réalisé quotidiennement durant toute la durée de l'étude, avec l'utilisation d'une grille d'évaluation adaptée aux procédures, qui permet de détecter rapidement la souffrance, la douleur chez les animaux et de mettre en place les traitements adaptés. En accord avec cette grille d'évaluation, des points limites prédictifs ont été déterminés afin de soustraire les animaux aux procédures expérimentales.

19170 L'arrêt de la castration chirurgicale des porcelets mâles, qui est une intervention invasive avec des conséquences négatives en termes de douleur et de santé, pose des problèmes de bien-être liés au comportement spécifique de ces animaux. Les problèmes les plus cruciaux sont liés au comportement sexuel car les chevauchements à répétition peuvent entraîner des chutes, elles-mêmes à l'origine de blessures importantes, comme des boiteries sévères ou des paralysies partielles de l'arrière train. De plus ces montes provoquent de l'agitation et peuvent être à l'origine de comportements agressifs. Une solution serait d'inhiber le comportement sexuel par un traitement

à base d'extrait d'une plante issue de la pharmacopée traditionnelle. Après un premier essai prometteur montrant une réduction des comportements sexuels et de la concentration plasmatique de la testostérone (hormone qui régule ces comportements) mais sans atteindre le seuil de signification statistique, nous souhaitons compléter l'effectif pour atteindre ce seuil. Nous souhaitons également commencer à décrire la cinétique de l'effet en réalisant la mesure de la concentration des hormones sexuelles à deux stades. L'essai sera conduit sur 18 porcs mâles non castrés par traitement expérimental, soit 36 au total. Le traitement sera appliqué pendant les 5 dernières semaines de la phase d'engraissement, soit de 135 à 170 jours d'âge environ. Des observations comportementales seront réalisées à différents stades pour quantifier la fréquence des comportements sexuels et deux prises de sang seront effectuées vers 135 et 170 jours d'âge. La règle des 3 Rs a été prise en compte :

-remplacer : le projet concernant spécifiquement le comportement sexuel et sa régulation physiologique, son utilisation ne peut être remplacée par une approche in vitro ou de modélisation,

-réduire : le nombre de porcs prélevés est limité à 18 porcs par traitement (pour obtenir une puissance statistique satisfaisante). Le nombre de prises de sang est réduit à deux par porc pour décrire, de façon minimale, la cinétique de l'effet du traitement. La première prise de sang permettra de déterminer si cet effet commence à se faire sentir après 2 semaines de traitement et la seconde permettra de valider l'effet du traitement au bout de 5 semaines.

-raffiner : la douleur liée aux prises de sang est réduite en limitant la durée de la contention à 2 minutes au maximum (en pratique la durée moyenne est de 30 secondes) grâce à une manipulation appropriée des animaux avant et pendant la prise de sang, réalisée dans un local confortable et suffisamment grand pour faciliter les manipulations. Par ailleurs, la taille des aiguilles est adaptée au gabarit des animaux. Après les prises de sang, les animaux sont très rapidement retournés dans leur case d'hébergement collectif.

19171 La vaccination est le moyen médical le plus efficace et le plus économique pour prévenir les maladies infectieuses et leurs conséquences souvent mortelles. Entre 2010 et 2015, elles ont permis d'éviter au moins 10 millions de décès. La protection conférée par les vaccins résulte de mécanismes complexes impliquant toutes les composantes de la réponse immunitaire. Alors que certains vaccins, tels que le vaccin contre le tétanos ou contre la fièvre jaune, induisent une très forte protection chez quasiment toutes les personnes vaccinées, d'autres induisent des réponses variables entre les individus. C'est le cas en particulier du vaccin contre la grippe saisonnière dont l'efficacité globale est d'environ 50%. Différents facteurs peuvent expliquer ces variations, tels que l'âge, des pathologies chroniques affaiblissant les réponses immunitaires, des facteurs génétiques ou l'état du microbiote intestinal. Dans ce projet, nous voulons étudier l'influence du microbiote, de l'alimentation et de la génétique de l'individu, seuls et en combinaison, sur l'intensité de la réponse vaccinale. Le rôle du microbiote dans les réponses immunes fait l'objet de nombreux travaux pour analyser et comprendre l'influence de la prise d'antibiotiques sur le développement du système immunitaire. Une alimentation riche en lipides peut également perturber la réponse immunitaire. L'influence de ces facteurs dépend toutefois de la composition génétique de l'individu. La spécificité de ce projet est de s'intéresser aux effets d'une altération du microbiote (par l'alimentation ou un traitement antibiotique) dans les premières semaines de la vie en interaction avec la diversité génétique. Nous nous concentrerons sur la réponse au vaccin antigrippal saisonnier utilisé chez l'homme.

L'étude de phénomènes aussi complexes que le développement au cours du temps du système immunitaire et d'une réponse vaccinale sous l'influence combinée de facteurs génétiques, alimentaires et microbiens ne peut être réalisée en dehors d'un organisme vivant entier. La souris est une espèce de choix en raison de la connaissance approfondie de son système immunitaire et de sa génétique, et des outils d'analyse disponibles. De nombreuses lignées de souris existent, qui couvrent une diversité génétique comparable à celle de l'homme. Nous avons déjà produit des données chez la souris qui garantissent la faisabilité du projet et réduiront au minimum les phases de mise au point. Nous avons en particulier mis au point les protocoles de perturbation du microbiote au sevrage par une alimentation riche en lipide ou par un traitement antibiotique. Nous avons

également montré que la composition génétique des souris influence considérablement leur réponse au vaccin antigrippal et avons identifié des lignées fortes ou faibles répondeuses. Enfin, il est possible de maîtriser parfaitement les conditions expérimentales (en particulier le statut sanitaire des animaux) pour réduire la variabilité des expériences.

Ce projet aura un impact modéré pour les souris utilisées car il consistera en des immunisations (deux par souris, réalisées sous anesthésie gazeuse) et des prélèvements sanguins très espacés. Les traitements (antibiotiques, régime hyperlipidique) n'ont aucun impact sur le bien-être des animaux. Les nombres d'animaux utilisés ont été ajustés en fonction de nos données antérieures pour assurer une puissance statistique suffisante et la reproductibilité de nos résultats.

Le projet comporte 4 procédures de sévérité modérée pour un total de 1662 souris. Elles comporteront toute la vaccination des souris par voie intramusculaire avec le vaccin utilisé chez l'homme et plusieurs prélèvements de sang pour mesurer les taux d'anticorps et des molécules de la réponse immunitaire. Dans certaines procédures, les souris immunisées auront été exposées depuis leur conception jusqu'à leur sevrage à un régime induisant une perturbation du microbiote intestinal et une dérégulation du développement immunitaire.

La première procédure aura pour objectif de tester l'impact de 3 régimes (alimentation riche en matières grasses, traitement antibiotique et une combinaison des deux), auxquels des souriceaux auront été exposés depuis leur conception jusqu'au sevrage, sur la réponse à la vaccination antigrippale réalisée à l'âge adulte. Cette procédure utilisera 236 souris et permettra d'identifier le régime le plus approprié pour la suite des études.

La seconde procédure visera à sélectionner 6 lignées de souris présentant une grande étendue de réponse à la vaccination en l'absence de traitement. Elle utilisera 147 souris.

Dans la 3ème procédure, des souris des 6 lignées identifiées dans la procédure 2 seront soumises au régime sélectionné à l'issue de la procédure 1 puis vaccinées pour caractériser l'impact de ce régime sur la réponse vaccinale chez des souris faiblement, moyennement ou fortement répondeuses au vaccin antigrippal. Elle utilisera 624 souris.

La dernière procédure aura pour objectif de rechercher, à l'aide de croisements, des facteurs génétiques qui contrôlent le niveau de réponse vaccinale en l'absence de régime et des facteurs génétiques qui contrôlent l'intensité de l'impact du régime sélectionné sur la réponse à la vaccination. Cette procédure utilisera 655 souris.

Au total, ce projet permettra de réaliser des progrès importants dans la compréhension de certains mécanismes qui contrôlent les variations d'efficacité vaccinale, avec des retombées sur la conception et les modalités d'administration des vaccins.

19172 La fièvre jaune est une maladie hémorragique virale aiguë transmise par des moustiques infectés. Le terme «jaune» fait référence à la jaunisse présentée par certains patients. Le virus est endémique dans les régions tropicales d'Afrique, d'Amérique centrale et d'Amérique du Sud. L'OMS estime chaque année à 200 000 le nombre de cas de fièvre jaune et à au moins 30 000 le nombre de décès dus à cette maladie dans le monde. Le virus est transmis à l'homme par la piqûre de moustiques appartenant aux genres *Aedes* et *Haemagogus*. Il existe un vaccin vivant atténué (17D) très efficace, mais la couverture vaccinale reste trop faible dans plusieurs zones d'endémie.

Plusieurs cas de transmission au nourrisson de la souche virale vaccinale 17D ont été rapportés suite à la vaccination de femmes allaitantes, certains nourrissons infectés développant des symptômes neurologiques. Cependant, ces observations ne permettent pas de conclure catégoriquement sur la capacité de transmission du virus 17D par le lait maternel, et il est très difficile d'évaluer une transmission directe de la mère à l'enfant du virus sauvage en période épidémique car les moustiques vecteurs sont également présents.

Afin de mieux évaluer le potentiel de transmission du virus de la fièvre jaune par allaitement, nous allons tenter de répondre aux questions suivantes (pour le virus sauvage et la souche vaccinale):

- Présence de virus infectieux dans les glandes mammaires et le lait de souris infectées
- Infectabilité de souriceaux par voie orale

- Transmission du virus de mères infectées (post-partum) à leurs souriceaux par allaitement

Cette évaluation du potentiel de transmission par allaitement est essentielle pour adapter les conseils donnés aux mères infectées. De plus, notre étude sur la présence et la forme de virus infectieux dans le lait sera associée à des expériences in vitro évaluant notamment les effets de facteurs comme la congélation du lait sur le potentiel infectieux de celui-ci.

Ce projet comporte 4 procédures et utilisera au maximum 1928 animaux. Les procédures 1 et 2 seront de sévérité modérée, les procédures 3 et 4 sévères (en raison de la difficulté à prévenir l'apparition de symptômes sévères chez certains souriceaux malgré un suivi régulier et adapté).

La procédure 1 (140 souris) visera à identifier et quantifier la présence de virus infectieux dans les glandes mammaires de souris femelles infectées.

La procédure 2 (768 souris) visera à identifier et quantifier la présence de virus infectieux dans les glandes mammaires et le lait de souris allaitantes infectées.

La procédure 3 (480 souris) visera à comparer l'efficacité d'infection de souriceaux par voie orale, sous-cutanée et intrapéritonéale. La dissémination du virus dans différents organes dont le cerveau sera également étudiée, ainsi que la pathogénicité comparée selon la voie d'infection.

La procédure 4 (540 souris) visera à mesurer l'efficacité de transmission du virus de souris infectées post-partum à leurs souriceaux, ainsi que la dissémination du virus dans différents organes dont le cerveau.

Respect des exigences de remplacement, de réduction et de raffinement :

L'infection par le virus de la fièvre jaune de ce modèle d'étude conduit, lorsque la dose infectieuse est suffisante, à la mort de l'animal. Des points limites adaptés seront utilisés pour pouvoir mesurer précocément la pathogénicité liée à l'infection tout en limitant au maximum la souffrance des animaux et sans attendre la mort de l'animal.

Ce projet fait suite à une étude in vitro actuellement réalisée dans notre laboratoire visant à mesurer l'infection et le franchissement d'un modèle de barrière intestinale par le virus. Cependant, ce modèle in vitro ne permet pas de déterminer si ce passage conduit à l'infection de l'organisme entier ni l'efficacité d'infection et la pathogénicité engendrées.

Un projet précédent publié sur la maladie Zika a permis d'affiner pour ce nouveau projet les tailles d'échantillon nécessaires en terme de mères et de souriceaux. Celles-ci sont suffisantes pour atteindre une puissance statistique permettant de détecter les tailles d'effet attendues.

Les souris A129 ou jeunes souris de génotype sauvage sont des modèles couramment utilisés pour étudier l'infection par ce virus. De par sa nature, ce projet impose l'utilisation de souris adultes femelles, et les deux sexes dans les portées de souriceaux (âgés de 2 à 21 jours). La sévérité des procédures est due aux effets de l'infection, notamment pour les procédures 3 et 4 où l'infection des souriceaux dure suffisamment longtemps (entre 6 et 10 jours au maximum) pour induire des symptômes qui apparaissent parfois brutalement chez les jeunes souriceaux.

Deux formes de raffinement seront utilisées dans toutes les cages : des igloos ainsi que du coton afin notamment que les mères puissent construire des nids pour leurs portées de souriceaux. Tous les gestes techniques effectués sur les mères allaitantes et leurs portées ont été discutés avec la structure du bien-être animal et adaptés spécifiquement afin de garantir un maximum de bien-être pour tous les animaux durant toutes les expériences. Les expérimentateurs changeront également de gants entre les manipulations de chaque portée pour ne pas perturber la reconnaissance (par l'odorat) des souriceaux par leur mère.

19173 La nécrose des fibres musculaires (Myonécrose) est un processus commun à de multiples dystrophies musculaires (DMs) et engendre une perte de fonction musculaire. Les DMs d'origine génétique sont généralement dues à une perte de fonction de certaines protéines musculaires et sont caractérisées par une grande variabilité phénotypique. Pour la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD), celle-ci va jusqu'à la perte complète de mobilité, l'insuffisance respiratoire et la mort du patient.

Alors que la régénération musculaire est relativement bien connue, le processus lésionnel l'est très peu et combine différents facteurs cytotoxiques comme la contrainte mécanique sur les fibres musculaires, le stress inflammatoire et probablement d'autres paramètres inconnus. L'étude de la myonécrose requière donc un système in vivo.

De nouveaux mécanismes de mort cellulaire régulée (nécroses régulées ; NR) ont récemment été découverts et leurs rôles sont maintenant identifiés dans certaines maladies dégénératives neurologiques. L'application de ces découvertes dans le système neuromusculaire reste à mettre en œuvre. Une meilleure connaissance des NRs à l'origine de la myonécrose, et de leur régulation serait un atout dans la lutte contre les pathologies dégénératives du muscle.

L'objectif général de ce projet est de caractériser les NRs du muscle et de tester le potentiel de leur inhibition dans des modèles animaux de DMs.

Démarche expérimentale :

Les NRs étant de nouveaux mécanismes, leurs voies de signalisation restent peu connus et ne bénéficient pas encore de marqueurs moléculaires validés. Dans le domaine de la mort cellulaire, l'étude des NRs nécessite donc une démonstration par inhibition fonctionnelle.

Un facteur limitant à l'étude de la myonécrose in vivo est la quantité suffisante de cellules nécrotiques à observer au même moment. La plupart des études et des modèles d'étude de nécrose in vivo implique l'induction synchronisée de mort cellulaire. Or dans les DMs, la myonécrose est variable et requière donc ce processus de synchronisation.

Procédure 1 : nous utiliserons les 2 méthodes les plus décrites dans la littérature pour induire la myonécrose (432 souris). Dans le cas de modèles animaux myopathes, les lésions musculaires sont souvent minorées par leur sédentarité des animaux. Les animaux seront soumis à un régime de course sur tapis roulant afin de synchroniser la dégénérescence musculaire (Procédure 2- incluant 1200 souris).

Une fois un modèle de synchronisation de la myonécrose généré, l'inhibition des voies de signalisation associées à la mort cellulaire permettra ensuite de démontrer fonctionnellement leurs implications. Celle-ci sera conférée par une inhibition génétique (Procédure 3- incluant 540 souris) et par une voie pharmacologique (Procédure 4- incluant 816 animaux). La procédure 4 inclura essentiellement des souris mais également un groupe de rats DMD.

Tout au long de ces études in vivo, nous allons respecter la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). Nous limitons le projet aux seules expériences considérées comme absolument indispensables chez l'animal et permettant la validation d'hypothèses déjà testées in vitro. La procédure 2 vise à réduire limiter la variabilité des réponses biologiques obtenues et ainsi réduire le nombre d'animaux. L'utilisation de souris contrôles sera optimisée et partagée à différents protocoles. Nous utiliserons des anti-douleurs lors des procédures douloureuses comme l'induction de lésion musculaire et l'accès à la nourriture et l'eau sera facilité. L'environnement sera enrichi avec des maisons en plastique et du coton pour que les animaux puissent faire des nids. Lors des expérimentations, les animaux mâles ou femelles seront hébergés maximum par 4 et par 2 après les lésions musculaires pour leur permettre un comportement social tout en limitant les éventuelles altercations.

19174 La création récente d'un nouveau parcours au sein de la licence de biologie de notre université, centré sur la santé et l'impact de stress environnementaux sur la biologie et la physiologie animale, nécessite la conduite d'un certain nombre de travaux pratiques sur des rongeurs, permettant de former les étudiants i) aux démarches, techniques et bonnes pratiques de l'expérimentation animale et ii) à la compréhension de grandes fonctions biologiques et physiologiques du mammifère et à leurs modulations au cours d'un stress. Ces travaux pratiques ne sont pas destinés à l'intégralité des étudiants de la promotion de la licence biologie, et font exclusivement partie du cursus des étudiants de troisième année s'inscrivant dans le parcours Biologie-Santé et optant pour l'unité d'enseignement optionnelle « TP de Physiologie Animale » (10 à 20 étudiants selon les années). Ceci permet notamment de réduire le nombre d'animaux utilisés pendant les TP. Ces travaux pratiques seront réalisés dans une salle spécialement étudiée et adossée à une animalerie agréée.

Par ailleurs, ils sont encadrés par deux enseignants (tous deux formés à l'expérimentation animale, niveau 1) et un ingénieur d'étude (niveau 2). Enfin, afin de respecter au mieux la règle des 3R exprimée ci-dessous, un seul animal par binôme sera utilisé et les expérimentations seront réalisées sur animaux anesthésiés ou sur organes isolés placés en cuve à organe. Au total, environ 20 à 40 rats (selon le nombre d'étudiants inscrit dans l'option) et 10 à 20 souris seront utilisés chaque année dans le cadre de ces Travaux pratiques, soit sur une période de 5 ans, un total de 300 animaux (200 rats et 100 souris).

- Raffinement: Les animaux seront hébergés en cages collectives (3 animaux par cage) afin de maintenir le caractère social de l'espèce. Les expérimentations sont réalisées sous anesthésie. Par ailleurs, les cages seront enrichies par l'ajout d'igloos, de tubes et de matériaux de nidification. Enfin, un suivi journalier des animaux sera réalisé. Enfin, au cours des procédures dites "sans réveil", les animaux sont placés sous des lampes légèrement chauffantes afin de permettre un maintien de la température corporelle. L'anesthésie des animaux est contrôlée tout au long de la procédure et adaptée en cas de besoin en modulant le pourcentage d'isoflurane.

- Réduction: Cette unité d'enseignement étant optionnelle, le nombre d'animaux utilisés sera rationalisé. Par ailleurs, les étudiants n'utiliseront qu'un animal par binôme.

- Remplacement: L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe, à ce jour, aucune méthode de substitution in vitro permettant l'étude de la physiologie des grandes fonctions.

19175 La migraine est un désordre neurovasculaire caractérisé par des crises récurrentes de céphalée accompagnées de troubles neurologiques variables dont l'allodynie cutanée céphalique (sensation douloureuse au toucher léger). Ce symptôme est le plus fréquent chez les patients atteints de migraine. Il affecte 60 à 80% des patients souffrant de migraine chronique. De plus, l'apparition de l'allodynie est considérée comme un facteur de risque de chronicisation de la migraine.

Parmi les nouvelles cibles thérapeutiques potentielles, les inhibiteurs doubles des enképhalines (IEnk) constituent des candidats intéressants sachant que les études préliminaires ont déjà montré une activité anti-allodynique très significative d'un IEnk chez le rat.

L'allodynie mécanique céphalique est mesurée dans un modèle de migraine chronique, chez le rat, déclenchée par l'injection répétée systémique (intrapéritonéale, 1 injection /jour/6 jours) d'un donneur de NO (monoxyde d'azote).

En effet, les résultats récents ont permis de montrer que l'administration répétée de l'IEnk par voie orale (traitement prophylactique) réduit fortement l'allodynie.

Dans ce projet, et dans le but de comprendre le mécanisme d'action de l'IEnk, nous souhaitons mieux caractériser son site d'action central versus périphérique. En effet, des données récentes ont permis de montrer que le blocage pharmacologique des récepteurs opioïdes périphériques n'altère pas l'action antalgique de l'IEnk sur l'allodynie dans le modèle chronique ; ce qui suggérerait un mécanisme d'action plutôt central dans ce cas. Afin de confirmer cette hypothèse, nous envisageons donc de tester le blocage des récepteurs opioïdes par un composé dont l'action est autant périphérique que centrale et comparer les résultats obtenus dans l'étude précédente. Pour ce faire, le nombre de rats par groupe a été fixé au maximum à 10 pour être conforme aux études précédentes. Dans cette étude, 2 groupes de rats seront utilisés. Ces groupes d'animaux recevront, 10 min avant le donneur de NO, en traitement préventif (prophylactique), de l'IEnk1 (n=20) par voie orale (1 fois par jour pendant 6 jours). Au 6^{ème} jour, un groupe de rats (n=10) recevra de plus un traitement préventif sous cutané d'un bloqueur des récepteurs opioïdes (centraux et périphériques sans distinction) et un autre groupe recevra une solution témoin de sérum physiologique (n=10). Le résultat attendu ici est que ce blocage réduise de façon significative les effets anti-allodyniques de l'IEnk ce qui confirmera le mécanisme d'action central du composé.

Au total 20 animaux seront utilisés dans ce projet. Les procédures seront réalisées sur le rat mâle car le modèle ISDN n'est pas validé chez la femelle. De plus en fonction des résultats obtenus chez le mâle, la ou les molécules les plus efficaces seront sélectionnées pour être testées ultérieurement chez la femelle ce qui permettra de réduire le nombre de groupes et d'animaux dans ce dernier cas.

Afin de respecter la règle des 3R nous utiliserons un nombre limité de rats et de groupes tout en gardant la significativité des résultats via une analyse statistique adaptée (analyse de variance suivi d'un test post-hoc paramétrique si la distribution est normale ou un test non paramétrique dans le cas contraire). Le recours à l'animal vivant pour le projet est justifié par le fait que l'étude des effets antalgiques de l'agent pharmacologique ne peut être réalisé que sur un animal conscient. Sachant que cette étude, du fait même de sa nature (étude douleur), ne permet pas d'administrer d'autres antalgiques, les conditions d'hébergement sont optimisées (enrichissement social et environnement), le test de sensibilité mécanique respecte les règles éthiques édictées par l'international association for the study of pain puisqu'il permet l'échappement de l'animal vis à vis du stimulus qui présente d'autre part une durée très courte (douleur évoquée de faible intensité à modérée) : 3 sec par stimulation mécanique. Cependant, lors des sessions injections répétées (5 jours), toute observation (visite au moins 2 fois par jour) de signes (points limites) tels que la prostration, paralysie, convulsions, perte de poids >15%, apathie... mettraient fin à l'experimentation pour ces animaux par une mise à mort par injection létale d'anesthésique. Tous les animaux seront mis à mort à la fin des procédures par injection létale d'anesthésique.

19176 La dengue est l'une des infections virales les plus répandues dans le monde. La possibilité de tester dans un modèle préclinique l'immunogénicité de nouvelles préparations vaccinales dans un contexte humain (souris exprimant un allèle HLA donné), constitue un atout majeur aussi bien sur le plan économique que sur le plan thérapeutique. Environ 500 millions de personnes sont infectées chaque année. Dans 2 à 5% des cas, la maladie progresse vers des formes plus graves, les symptômes principaux étant une fuite plasmatique, des hémorragies et un choc consécutif à la diminution du volume sanguin.

Cette demande a pour objectif l'élaboration et le développement d'un nouveau candidat vaccin pouvant induire une protection simultanée aussi bien contre les différents sérotypes du virus de la dengue que contre le virus Zika.

En l'absence de modèle animal sensible au virus et capable de reproduire la maladie humaine, la souris transgénique exprimant certains allèles des molécules d'histocompatibilité de classe I (HLA-A, B et C chez l'homme), constitue un modèle de choix pour évaluer dans un premier temps la réponse immunitaire (cellules T CD8), impliquée dans la reconnaissance et l'élimination des cellules infectées.

L'avantage de ce modèle animal est qu'il a permis notamment, dans un grand nombre d'infections virales, d'identifier précisément les différentes régions antigéniques cibles des cellules T CD8 du système immunitaire, et d'analyser aussi chez les souris adultes de 8 à 12 semaines mâles et femelles la qualité et l'intensité de ces réponses, paramètres qui sont déterminants dans l'élaboration d'une stratégie vaccinale efficace.

L'objectif majeur de ce projet est donc d'étudier in vivo l'effet de l'injection de préparations vaccinales contenant plusieurs régions antigéniques ou épitopes des virus de la dengue et de Zika sur la stimulation des cellules T cytotoxiques, qui sont impliquées dans la protection à long terme contre ces infections virales et contre l'apparition des formes sévères de la maladie. Ce phénomène d'induction de réponses des cellules T CD8 ne pouvant être reproduit in vitro, il ne peut être étudié que dans un organisme entier. Le bénéfice attendu de ce projet est la validation in vivo d'une préparation vaccinale permettant d'induire de fortes réponses des cellules T CD8 impliquées dans la protection antivirale à long terme.

Pour identifier un nombre suffisant d'épitopes T exprimés par les différents domaines protéiques de la préparation vaccinale, et ceci dans un contexte HLA donné, et pour analyser un nombre significatif d'animaux exprimant un allèle HLA (HLA-A2, A24, B7, et B35), il est prévu d'utiliser au maximum 100 animaux par an pour ce projet, soit un total de 500 souris sur 5 ans. Ce nombre d'animaux, établi en accord avec un biostatisticien, doit nous permettre de démontrer de façon significative l'effet de l'injection du Polyépitope sur l'activation du compartiment des cellules T CD8, en comparant notamment la réponse des animaux immunisés avec le vecteur test avec la réponse des animaux ayant reçu le vecteur contrôle.

Afin d'éviter toute souffrance inutile lors de la procédure d'injection, les animaux seront anesthésiés. En outre, tous les animaux immunisés seront soigneusement suivis pour détecter précocement un impact sur le bien-être des animaux, pour détecter notamment l'apparition de signes d'inconfort animal (exemple de critères : posture ; texture des poils ; activité réduite ; perte de poids ; signes d'infection ou d'inflammation aiguë et persistante). Au cas où l'état d'un animal atteint un point limite (par exemple : perte progressive d'activité ; posture anormale ; perte de poids >15%), il sera mis à mort.

La procédure mise en œuvre est de sévérité légère. Le nombre minimal d'animaux a été fixé à 9 animaux par expérience, pour effectuer des analyses statistiques, tout en limitant au maximum l'emploi d'un trop grand nombre d'animaux. Dans ces expériences, seules les souris exprimant les molécules d'histocompatibilité humaine peuvent rendre compte de la capacité d'une préparation vaccinale à induire des réponses cellulaires T CD8 du type de celles obtenues chez l'homme.

19177 La durée et l'issue d'une infection bactérienne dépendent, de façon critique, de la réponse de l'hôte dans les premières heures : cette réponse détermine largement la dissémination, le contrôle des bactéries par les cellules phagocytaires de l'hôte et l'orchestration de la réponse immunitaire innée. Il est donc important de comprendre non seulement les mécanismes généraux de la réponse innée contre les bactéries, mais aussi les stratégies de dissémination et le tropisme de celles-ci.

Les interactions entre les bactéries et l'individu hôte sont très complexes et leur modélisation à l'échelle de l'organisme ou leur reconstitution in vitro ne sont actuellement pas possibles de façon réaliste ; le recours à l'expérimentation animale est donc nécessaire.

Le poisson zèbre (*Danio rerio*, appelé ici zebrafish) représente un excellent modèle pour mener ces analyses à un niveau fondamental. La larve de ce petit poisson est transparente et facile à anesthésier, facilitant l'imagerie intravitale haute résolution. De plus, de nombreux outils génétiques permettent de manipuler la réponse de l'hôte. Les voies de signalisation immunitaires étant bien conservées chez les vertébrés, il y a donc de fortes chances qu'un ou plusieurs gènes impliqués dans la défense de la larve de zebrafish contre les bactéries le soient aussi chez l'homme. Ce projet fondamental aurait donc des retombées biomédicales potentielles.

Au cours de ce projet, des larves de zebrafish seront infectées par différentes bactéries ayant un intérêt médical, afin de suivre la réponse de l'hôte ainsi que la dissémination de l'infection, en ayant recours notamment à l'imagerie in vivo, riche en informations spatio-temporelles. Différentes techniques de manipulation génétique permettront de modifier la réponse de l'hôte globalement ou de façon spécifique des tissus, afin de tester le rôle des différentes populations de l'immunité innée.

Ce projet respectera la règle des 3R, en nécessitant l'emploi d'un nombre d'animaux choisi comme étant le plus bas possible tout en permettant de tester nos hypothèses, et en combinant autant que possible les méthodes d'analyses afin d'obtenir le maximum d'informations à partir des animaux utilisés. Nous estimons que ce projet impliquera l'utilisation d'un maximum de 91650 larves sur 5 ans. Des points limites seront utilisés afin d'éviter que les animaux ne décèdent des dommages locaux ou systémiques que co-initient l'expansion des bactéries et la réactivité des larves de zebrafish qu'elles soient génétiquement altérées ou pas. Nous utiliserons des procédures (5 au total dans le cadre de ce projet) de sévérité « modérée » pour trois d'entre elles (qui impliqueront 84300 animaux); les deux autres étant de sévérité « légère » (concernant 7350 animaux).

19178 Les astrocytes sont les cellules gliales majoritaires du cerveau. Ils possèdent une interface vasculaire qui consiste en des prolongements ou "pieds" qui vont au contact des vaisseaux sanguins cérébraux. A cette interface, les astrocytes régulent les fonctions vasculaires cérébrales. Ils maintiennent en particulier l'intégrité des vaisseaux sanguins cérébraux et le dialogue immunitaire entre le sang et le cerveau. Ils sont donc cruciaux pour le fonctionnement du cerveau. Cependant les modalités de ces régulations astrocytaires sont très mal connues alors même qu'elles sont altérées dans un grand nombre de pathologies cérébrales. L'intérêt d'étudier les interactions entre les astrocytes et le système vasculaire est donc in fine de pouvoir comprendre les mécanismes de ces pathologies et de proposer de nouvelles pistes thérapeutiques.

Dans une étude récente, nous avons montré que MLC1, une protéine des astrocytes très enrichie dans les pieds astrocytaires périvasculaires, joue un rôle crucial dans le développement postnatal de l'interface entre astrocytes et vaisseaux sanguins. Pour comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires en jeu, nous souhaitons analyser l'unité gliovasculaire après réintroduction de l'expression de MLC1 dans les astrocytes des souris MLC1KO. Pour réaliser cette expérience, nous avons développé un virus de type AAV induisant l'expression de MLC1 dans les astrocytes. Cet AAV sera injecté par voie intraveineuse dans des souris âgées de deux mois. Après une période d'incubation de deux semaines, nécessaire à la disparition des particules virales de la circulation sanguine, nous analyserons la réexpression de MLC1 et son effet sur les propriétés moléculaires de l'interface entre astrocytes et vaisseaux sanguins. Cette étude permettra de comprendre le rôle de MLC1 dans le développement de l'interface gliovasculaire.

Ce projet repose sur l'utilisation du modèle murin qui ne produit pas la protéine MLC1 non dommageable dans lequel nous réinduirons l'expression de MLC1 par injection intraveineuse d'un AAV exprimant MLC1 (procédure 1), puis sur l'analyse des cerveaux disséqués après euthanasie des animaux en histologie et biochimie. Une partie des analyses histologiques nécessite la fixation des cerveaux par perfusion intracardiaque (procédure 2). Nous estimons que 90 souris seront nécessaires à cette étude: 30 souris qui ne produisent pas la protéine MLC1 non injectées, et 60 souris injectées par l'AAV. 60 animaux (30 injectés et 30 non injectés) serviront pour les analyses histologiques (procédure 2) et 30 injectés pour les analyses biochimiques. Ce nombre a été déterminé sur la base de notre étude préalable des animaux qui ne produisent pas la protéine MLC1 qui nous a permis de raffiner au mieux cette étude en ciblant directement les paramètres biochimiques et histologiques à analyser et en diminuant donc au maximum le nombre d'animaux utilisés. Sur cette base, nous savons que ce nombre nous permettra de générer des résultats analysables statistiquement. Par ailleurs, les animaux sont tous élevés dans des conditions optimales (interactions sociales, nourriture et eau ad libitum, environnement stable en température et lumière) et nos protocoles d'injection intraveineuse d'AAV et de perfusion intracardiaque ont été optimisés et raffinés pour limiter la douleur et le nombre d'animaux à utiliser.

Nos expérimentations seront menées sur une période de 2 ans.

Le modèle murin est irremplaçable pour notre étude car il n'existe en effet pas de système *in vitro* reproduisant la structure complexe de l'interface entre astrocytes et vaisseaux sanguins. Notre projet repose sur des protocoles de purification de l'unité gliovasculaire et des observations histologiques mis au point au laboratoire. Ces protocoles ont tous été optimisés et raffinés permettant de réduire à son minimum le nombre d'animaux à utiliser.

Cette étude nous permettra de comprendre le rôle de MLC1 dans la régulation des fonctions vasculaires cérébrales.

19179 L'objectif de ce protocole expérimental est de mesurer la pharmacocinétique de composés.

La pharmacocinétique correspond à l'étude du devenir du composé dans l'organisme. C'est une étape obligatoire pour comprendre si le composé est correctement libéré dans l'organisme et disponible pour les organes cibles.

Les études de pharmacocinétique permettent l'adaptation de la dose pour obtenir les concentrations dans le sang d'un composé entraînant l'effet optimum. On admet en effet qu'aux concentrations trop faibles, le composé est inefficace. L'objectif final des manipulations de pharmacocinétique est d'étudier les variations de concentration d'un composé afin d'améliorer la disponibilité de ce composé dans l'organisme et ainsi de mieux soigner. La transformation et la disponibilité des composés (médicament ou ingrédient) sont des mécanismes très complexes qui nécessitent d'être étudiés sur des organismes vivants entiers. En effet, l'organisme peut réagir vis-à-vis du composé qui lui a été administré en limitant son absorption, en l'inactivant et en l'éliminant par voie rénale, digestive ou pulmonaire. Le lapin est un modèle utilisé dans les études de pharmacocinétique car il permet d'étudier les mécanismes complexes d'élimination d'un composé par l'organisme. Par sa taille, il permet l'injection et le prélèvement de grands volumes nécessaires aux expérimentations, réduisant ainsi le nombre d'animaux devant être utilisés.

Ce projet comporte une seule procédure dans laquelle on administrera un ou des composés à tester, des prélèvements de sang, fécès ou urines seront réalisés au cours du temps. Au moment de l'euthanasie, les organes d'intérêts seront également prélevés. Cinq groupes de six lapins constitueront cette procédure. On envisage de tester trois composés par an soit 450 animaux sur la totalité du projet.

Dans le respect de la règle des 3R, et lorsque cela est possible ces candidats sont évalués sur culture cellulaire ou organe isolé préalablement aux tests animaux afin de remplacer ou de réduire le nombre d'animaux impliqués dans les protocoles. Nous utiliserons le nombre minimum de lapins nécessaire à une analyse statistique (T tests, ANOVA) en prenant en compte la variabilité inter-individuelle. D'autre part, un raffinement des protocoles sera effectué en fonction des avancées technologiques dans le domaine. Les animaux seront hébergées selon les conditions de la nouvelle réglementation 2010/63, 2 par cage afin d'assurer leur sociabilité. Leur environnement sera également enrichi de jouets et de buchettes de bois. Chaque animal entrant dans une étude disposera d'une fiche individuelle de suivi sur laquelle tout traitement et observation seront reportés. L'état de santé des animaux sera évalué quotidiennement selon des critères d'apparence physique (perte de poids >20%, gêne respiratoire...) et comportementaux (animal prostré, agressivité...) définis en accord avec le comité de suivi du bien-être animal de notre établissement.

19180 Dans le cadre du développement de méthodes analytiques et de leur validation, il est nécessaire de prélever sur animaux des échantillons biologiques (fluide, fragment de tissu ou d'organe) qui serviront de "prélèvement témoin". Ces prélèvements témoins serviront par exemple de "références négatives ou blanc" ou références positives (présence d'une substance, d'anticorps, d'un pathogène, ...). Neuf procédures (1 légère et 8 modérées) sont présentées afin de développer des méthodes pour les essais de médicaments pharmaceutiques et médicaments biologiques et pour des kits de diagnostics.

Pour chaque procédure, la règle des 3R a été appliquée comme suit :

Les mesures de remplacement : Il n'existe pas de méthode alternative pouvant remplacer ces prélèvements sur animaux;

Les mesures de réduction : Plusieurs prélèvements peuvent être réalisés chez un même animal si la procédure est légère ou modérée afin de réduire le nombre d'animaux prélevés;

Les mesures de raffinement : Un enrichissement du milieu, des points limites définis en fonction de la procédure afin d'éviter toute douleur, souffrance ou angoisse des animaux, une surveillance des animaux pendant et après les prélèvements, une anesthésie des animaux en cas de stress ou de procédure douloureuse.

Le nombre d'animaux sera de 1125 carnivores domestiques et 3600 rongeurs sur 5 ans.

19181 La reproduction caprine est saisonnée. L'activité de reproduction des chèvres commence habituellement en automne lorsque la durée du jour diminue et s'arrête lorsque les jours augmentent au printemps. Les petits naissent classiquement au printemps et deviennent pubères autour de l'âge de 6-7 mois. Chez plusieurs espèces de mammifères, les signaux sensoriels échangés lors des interactions mâle/femelle peuvent modifier la physiologie et les réponses comportementales de reproduction. Chez la chèvre, des travaux antérieurs ont montré que l'exposition précoce de femelles à un mâle pouvait induire une apparition précoce de la puberté chez celles-ci (effet non retrouvé chez des femelles isolées ou exposées à des mâles castrés). Cependant, cette puberté ne s'est déclenchée que lorsque les mâles sont devenus sexuellement actifs (vers fin août). Celle-ci avait été évaluée par des dosages hormonaux (pulsatilité LH, progestérone pour détermination de la 1ère ovulation), une évaluation du tractus génital et des marqueurs cérébraux.

Nous souhaiterions déterminer si le déclenchement de la puberté des chevrettes est induite par la reprise de l'activité sexuelle du mâle. De ce fait, nous pourrions déterminer s'il est possible de raccourcir la durée d'exposition des chevrettes au mâle.

Afin d'apprécier la transition pubertaire, nous étudierons l'expression de marqueurs cérébraux impliqués dans l'activation de la fonction de reproduction.

Nous évaluerons en parallèle la sensibilité olfactive des chevrettes en fonction de leurs interactions sociales (présence de mâle ou non) et de leur statut endocrinien (pubères ou non) à l'aide d'une technique d'imagerie calcique.

Ce projet respecte le principe des 3R :- Remplacement : le modèle animal ne peut pas être remplacé dans ce projet étudiant l'impact des relations socio-sexuelles sur la puberté car ceci n'est pas modélisable par des modèles alternatifs,

- Raffinement : les animaux seront hébergés en groupes sur paille et bénéficieront d'enrichissement comme des caisses en bois et des ballons. Sur la base des résultats acquis précédemment, certaines procédures seront réalisées moins de fois. De plus, 3 expérimentations différentes seront réalisées en un seul projet pour limiter le nombre d'animaux utilisés,

- Réduction : le nombre d'animaux utilisés (40 femelles et 8 mâles) a été rationalisé dans le but de ne pas utiliser plus d'animaux que nécessaire pour pouvoir mettre en évidence un effet après analyse statistique.

19182 L'utilisation d'antibiotiques a révolutionné la médecine moderne. Cependant, l'émergence de résistances aux antibiotiques, plus rapide que le développement de nouveaux antibiotiques, est à l'origine d'un problème de santé publique. Une seconde limitation liée à l'utilisation d'antibiotiques traditionnels réside dans leurs larges spectres d'action impliquant la mort de nombreuses espèces bactériennes incluant celles qui nous sont bénéfiques.

Dans ce contexte, il existe un besoin urgent de développer des thérapies ciblées permettant un contrôle précis des écosystèmes microbiens complexes.

Dans cette optique, le projet vise à utiliser une nouvelle technologie antimicrobienne basée sur l'utilisation d'un dérivé des bactériophages (ciblant exclusivement certaines espèces bactériennes) transportant des « ciseaux moléculaires » qui, une fois à l'intérieur des bactéries, vont scanner leur matériel génétique et trouver la séquence à couper pour laquelle ils ont été « programmés ». Ainsi seules les bactéries possédant la séquence d'ADN ciblée seront tuées, sans affecter le reste du microbiote.

Les bactéries d'intérêt dans ce projet sont des *Escherichia coli* (*E. coli*) entérohémorragiques (peuplant le système digestif et responsable d'hémorragies) productrices de Shiga-toxine (EH-STEC). Ces bactéries sont à l'origine de maladies rares mais graves en particulier chez les jeunes enfants chez qui elles induisent des diarrhées hémorragiques et une atteinte rénale sévère.

Une précédente étude a déjà permis de mettre au point le modèle d'infection du tube digestif chez le jeune lapereau et d'appréhender le potentiel bénéfique d'un traitement aux Eligobiotiques® (EB). Cette étude a pour but d'évaluer l'efficacité de ce nouveau traitement en étoffant les effectifs de la précédente.

5 femelles et leur portée seront nécessaires à cette étude. Une portée correspondant à environ 9 lapereaux, le nombre total d'animaux est estimé à 5 lapines et 45 lapereaux.

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

Remplacer : Une partie des résultats préliminaires a été obtenue *in vitro* mais la complexité d'un être vivant ne peut pas être mimée en laboratoire nécessitant l'utilisation de modèles animaux.

Réduire : Le modèle étant déjà maîtrisé, aucune phase de mise au point n'est prévue. Afin de réduire au maximum les effectifs, les animaux des 2 groupes témoins (non infectés et traités ou non) seront moins nombreux que les animaux des autres groupes.

Raffiner : Les animaux seront hébergés dans un environnement adapté et enrichi. Les lapereaux et leur mère ne seront pas séparés durant l'étude pour limiter leur stress et permettre une alimentation naturelle par la tétée. L'infection bactérienne du tube digestif et l'administration du traitement seront réalisées par voie orale et seront donc indolores. Des critères d'arrêts de l'étude, supportés par une grille de score clinique, ont été définis afin d'assurer le bien-être des animaux.

19183 Le projet : Chez l'homme, les retards de croissance, qu'ils apparaissent chez le fœtus ou juste après la naissance, sont associés avec une plus grande fréquence de maladies cardio-métaboliques.

Notamment, des perturbations de la balance énergétique entraînant des variations de poids corporel à l'âge adulte, et une résistance à l'insuline sont fréquemment observées. L'obésité et le surpoids ainsi que leurs comorbidités dont l'insulino-résistance et le diabète influencent négativement la durée de vie des individus.

Nos données préalables montrent que la sur-nutrition en période post-natale précoce chez des souris mâles nés avec un retard de croissance intra-utérin (RCIU) entraîne un surpoids et une résistance à l'insuline dès 3 mois. A l'inverse, une restriction alimentaire à la suite d'un RCIU préserve de l'insulino-résistance et du surpoids. Ainsi, une altération des conditions nutritionnelles en période périnatale entraîne une dérégulation de l'homéostasie énergétique chez les souris mâles nés avec un RCIU. En revanche, les souris femelles nées avec un RCIU semblent protégées puisque leur tolérance au glucose et leur sensibilité à l'insuline ne sont pas modifiées même à un âge avancé (12 mois).

Dans ce projet, nous saisissons l'opportunité d'avoir une cohorte vieillissante dont l'étude a été reportée à cause des confinements successifs pour nous interroger sur l'impact des conditions nutritionnelles en période périnatale sur la durée de vie des souris. L'objectif du présent projet est donc d'une part de déterminer l'impact du RCIU sur la durée de vie des souris et d'autre part d'identifier l'impact d'une sur- ou sous-nutrition en période post-natale précoce sur la longévité des souris nées avec un RCIU. Compte tenu du dimorphisme sexuel observé dans notre modèle de souris nées avec un RCIU lors d'études préalables, nous étudierons la longévité des souris des deux sexes. Etant donné les mécanismes en jeu, impliquant une physiopathologie complexe, et des dérégulations sur le long terme, l'approche in vivo est obligatoire.

Les animaux :

* Type : Etant donné le rôle du placenta dans les mécanismes physiopathologiques étudiés, nous avons choisi le modèle murin (mammifère placentaire), qui est petit et de bonne productivité, ce qui réduit le nombre de femelles génitrice nécessaire. Nous utiliserons des animaux non transgéniques sur fond génétique mixte 129sv Pas et C57BL/6j qui constitue notre modèle d'étude depuis plusieurs années.

* Nombre: Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 99 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

La conformité au principe des 3R :

*Remplacement : Un système vivant est nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu dans le développement de ce projet impliquant de nombreux aspects métaboliques. Il n'est pas possible de recréer in vitro la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires rentrant en jeu et notamment au cours de la gestation.

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

Le nombre de souris, ainsi que les timings de traitement et des mesures diverses ont pu être calculés grâce à la profonde connaissance de ce modèle murin ainsi que des mécanismes en jeu. Ainsi, nous étudierons une dose unique de restriction protéique afin d'induire le RCIU et nous mesurons les effets à des âges clefs mis en évidence lors de nos précédentes études. Enfin, afin d'optimiser la règle des 3R, nous avons mis en place 3 collaborations permettant ainsi de raffiner l'utilisation de ces animaux et des prélèvements qui en résultent.

*Raffinement : Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures ont été mise au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal, en limitant la douleur et le stress (anesthésie, analgésie, etc.). Les conditions d'hébergement sont conformes à la

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

19184 Aigue, la douleur est physiologique, nécessaire à notre survie. Chronique ou persistante, par suite d'une inflammation (douleur inflammatoire) ou d'une lésion nerveuse (douleur neuropathique), la douleur n'offre plus aucun avantage mais provoque au contraire détresse et souffrance. Les traitements ne sont souvent que partiellement efficaces et peuvent s'accompagner d'effets secondaires importants. Il faut donc découvrir de nouveaux antalgiques. Étonnamment, si notre connaissance des mécanismes de la douleur s'est considérablement accrue, cette avancée ne s'est accompagnée d'aucun progrès thérapeutique majeur. Une des raisons à cet échec est qu'il n'existe pas un mais des symptômes douloureux. En effet, inflammatoire ou neuropathique, les douleurs chroniques se manifestent par plusieurs symptômes douloureux : douleurs spontanées et/ou provoquées, par une stimulation normalement douloureuse (exacerbation de la douleur ou hyperalgésie) ou non (allodynie). Or, chacun de ces symptômes dépend de mécanismes distincts, nécessitant donc un traitement spécifique.

L'allodynie mécanique est un symptôme très fréquent, observé chez 20-50% des patients neuropathiques et 60-80% des migraineux chroniques. On sait maintenant que son apparition est liée à l'activation d'un circuit neuronal local—dans la corne dorsale (CD) de la moelle épinière ou le sous-noyau caudal du Trijumeau (Sp5C)— transmettant l'information tactile aux voies de la douleur. Or, bien qu'anatomiquement toujours présent, ce circuit ne devient fonctionnel qu'en conditions pathologiques. Ce processus nécessite l'activation d'enzymes dans la CD/Sp5C dont la p38 mitogen-activating kinase (p38). La p38 semble donc une cible pertinente pour le développement de nouveaux médicaments anti-allodyniens. L'inhibition de cette kinase diminue bien le comportement douloureux spontané et l'allodynie mécanique chez l'animal en conditions inflammatoires et neuropathiques. Nous avons synthétisé de nouveaux inhibiteurs de la kinase p38. L'un d'eux produit une inhibition immédiate, constante (sur la durée du test) et quasi complète (99%) de l'allodynie mécanique dans un modèle inflammatoire chez le rat. Comparé aux inhibiteurs connus de la p38 (sképinone, SB203580), ce composé exerce une activité antalgique plus puissante et beaucoup plus longue, en conditions neuropathiques comme inflammatoires, chez le mâle comme chez la femelle. Notre but est maintenant d'explorer les mécanismes de cet effet par des études comportementales, électrophysiologiques (in-vivo, ex-vivo), immunohistochimiques, de biologie moléculaire et de toxicologie préliminaire sur différents modèles murins d'allodynie mécanique, avant passage au stade clinique. Pour appliquer la règle des 3Rs, le nombre d'animaux est réduit au maximum. Cependant, il doit tenir compte des animaux qui ne répondraient pas aux tests et être suffisant pour discriminer un effet statistiquement significatif entre traitements (analyse de variance et tests post-hoc paramétriques ou non paramétriques). Par contre il n'est pas possible de remplacer ce modèle in vivo. En effet, la douleur est une expérience globale qui implique l'ensemble du système nerveux, périphérique et central. Et, à l'heure actuelle, aucun modèle in vitro ou "in silico" n'est validé pour mesurer cette expérience. Au total, 120 rats seront utilisés, avec mise à mort à la fin des procédures par overdose anesthésique et prélèvement d'organes (études immunohistochimiques et en biologie moléculaire). Toutes les injections (sous-cutanées, intracisternales) seront pratiquées sous anesthésie. Malheureusement, on ne peut pas réduire la douleur due à l'injection sous-cutanée de substance inflammatoire puisqu'on désire justement mesurer le comportement douloureux. Cependant, tout sera fait pour diminuer l'anxiété des animaux due au nouvel environnement (hébergement en environnement enrichi dans l'animalerie pendant une semaine avant toutes interventions) et à l'expérimentateur (habituation pendant 4 jours avant intervention).

19185 La médecine régénératrice s'oriente aujourd'hui vers le développement de techniques chirurgicales mini-invasives dans le but de réduire la morbidité et la durée d'hospitalisation. Pour ceci, l'utilisation d'hydrogels injectables, pouvant acquérir la forme désirée une fois implantés et présenter des

propriétés mécaniques en relation avec le tissu ciblé, est particulièrement intéressante. Ces matrices injectables se forment après injection par réticulation physique, ionique ou covalente et forment ainsi de véritables réseaux macromoléculaires en 3D comparables à la matrice extracellulaire (MEC). Notre domaine actuel de recherche est le développement d'hydrogels, pouvant être utilisés en tant que biomatériaux de substitution (hydrogel seul) ou en association avec des cellules autologues (différenciées ou non), pour des applications en ingénierie tissulaire osseuse et cartilagineuse.

Afin d'améliorer les propriétés intrinsèques de ces constructions tridimensionnelles, des renforts peuvent être utilisés. Il s'agit généralement de nano ou des microparticules mais également de mélanges d'hydrogels de natures différentes. Ces constructions complexes hybrides nous permettront d'étudier et de comprendre le rôle de différents paramètres de cette MEC synthétique sur le comportement cellulaire en modélisant leur environnement tridimensionnel.

Notre objectif global est de construire des matrices extracellulaires synthétiques modulaires avec des objets fonctionnels compatibles afin d'optimiser les processus de régénération tissulaire. Il s'agit de comprendre comment la structure du gel (taille des pores, hétérogénéité, propriétés dynamiques, fonctions spécifiques...) influence la réponse tissulaire. En particulier, l'objectif premier de cette étude est d'évaluer la biocompatibilité, la stabilité en zone sous-cutanée, l'inflammation et la cinétique de dégradation de nouveaux hydrogels auto réticulant et de mélanges.

Ces essais de biocompatibilité, dégradation et inflammation seront réalisés en sous cutanée chez la souris C57BL/6.

Afin de respecter la règle des 3R "Réduire, Raffiner, Remplacer", nous mettront en place les éléments suivants :

-Réduire : 4 implantations seront réalisées par animal, ce qui limite donc le nombre nécessaire de souris pour ces expérimentations. La réalisation de ces 4 implantations a montré une très bonne tolérance dans les expérimentations précédentes réalisées au sein du laboratoire. De plus, un seul contrôle négatif, l'HPMC-Si, sera utilisé pour l'ensemble de l'expérience. Il s'agit d'une expérimentation originale qui n'a pas de similarités avec des expériences antérieures. Par ailleurs, plusieurs types d'analyses (analyses biomécanique et immunohistochimique) seront réalisés sur un même

échantillon ce qui diminuera aussi le nombre d'animaux nécessaires à l'étude.

-Raffiner: Pour cette étude, nous avons choisi d'injecter à l'aide d'une aiguille nos différentes formulations, ce qui réduit l'inflammation sur le site d'implantation, car c'est un acte minimal invasif. Ces formulations ont également été testées in vitro, et n'ont pas démontré de cytotoxicité. Ce qui devrait également limiter la réaction inflammatoire et donc la douleur.

Les souris seront observées quotidiennement par du personnel de l'animalerie. Si toutefois un signe de mal-être ou de douleur est observé, les animaux recevront une dose d'analgésique (buprénorphine). En cas de douleur non contrôlée, l'animal sera euthanasié pour des raisons éthiques.

De plus, ces injections sous-cutanée seront réalisées sous anesthésie générale au masque (isofluorane).

Les points limites ainsi que la méthode d'euthanasie utilisée sont définis dans la partie procédure expérimentale (4) et sont conformes aux règles d'éthiques animales actuelles.

-Remplacer: Des études préliminaires in vitro ont été réalisées pour simuler une dégradation enzymatique par de la hyaluronidase. Ces études ont permis de sélectionner un nombre limité de formulations pertinentes pour nos objectifs de contrôle de la dégradabilité.

Cette étude se déroulera sur 3 ans au maximum. 60 souris seront au maximum nécessaires. Le remplacement de l'animal pour cette expérimentation in vivo n'est pas réalisable car les processus inflammatoires sont complexes et font appel à un ensemble de cellules non modélisables in vitro.

19186 Les recherches menées au sein de notre laboratoire, ainsi que les demandes faites par nos clients vont nous amener à former notre personnel sur des techniques d'expérimentations.

Pour les 5 prochaines années nous estimons avoir besoin au maximum de 1000 animaux. Nous envisageons avoir besoin de 100 souris et 100 rats par an maximum.

Concernant l'application des 3R, le remplacement ne peut pas être assuré car nous avons besoin des animaux vivants pour pouvoir réaliser le geste et anticiper toute réaction de l'animal lors de nos protocoles par la suite.

Pour la réduction, le nombre d'animaux est choisi en tenant compte du nombre nécessaire et suffisant pour obtenir du personnel formé, compétent et sûr de lui. De plus les animaux qui serviront à l'entraînement, pourront être réutilisés, si l'état des animaux le permet, pour cette même fonction après une période de récupération.

Concernant le raffinement, les animaux seront hébergés en groupe (2 rats ou 5 souris) avec enrichissement du milieu (tunnels, carré de coton de cellulose, bâton de bois), et surveillés quotidiennement. Les formations seront données par du personnel expert afin d'assurer les contentions, manipulations et geste technique au mieux pour éviter toute souffrance animale. Pour tous nos protocoles, y compris nos animaux de formation, une grille de points limites (en annexe) est mise en place et respectée. La mise en place de traitement analgésique préventif et /ou curatif sera également réalisé en fonction de l'entraînement.

Cette saisine est composée de 2 procédures :

Procédure 1 : Formation en expérimentation animale avec une sévérité de classe légère. Cette procédure concernera essentiellement les formations et entraînements qui n'auront pas ou peu d'impact sur le bien-être des animaux.

Procédure 2 : Formation en expérimentation animale avec une sévérité de classe modérée. Cette procédure concernera toutes les formations et entraînement qui auront un impact modéré au maximum et surtout réversible sur les animaux.

En conclusion, cette saisine, prévue sur 5 ans, nous permettra donc de nous former, nous entraîner et de maintenir nos compétences sur toutes les expérimentations animales.

19187 Chaque individu d'une population animale ou humaine est porteur de 1 à 5 mutations récessives délétères dans son génome. Cependant, ce n'est que lorsque deux individus porteurs de la même mutation se reproduisent que ces mutations devenues homozygotes dans le génome de la descendance expriment leur potentialité délétère. Ces mutations homozygotes peuvent alors conduire à des anomalies génétiques provoquant de maladies héréditaires conduisant à des problèmes de santé ou de malformations chez les jeunes et les adultes, ou pire encore, à la mort de l'individu. Cette létalité peut toucher les individus à partir du stade embryonnaire jusqu'au stade juvénile après la naissance. La sélection génétique des populations animales d'élevage est un contexte favorable à l'émergence et au maintien de ce type de mutation dans les populations sélectionnées. Depuis 10 ans, l'acquisition de données exhaustives issues des techniques moléculaires de génomique (génompages de dizaines de milliers de variants du génome en même temps sur des milliers d'animaux, séquençage complet de génomes) permettent plus facilement de détecter la présence de ces mutations délétères et les individus qui en sont porteurs. Ces découvertes permettent d'adapter les croisements entre animaux dans les schémas de sélection pour éviter les croisements à risque entre animaux porteurs de ces mutations. Ainsi, on limite très fortement le risque d'avortement de fœtus homozygotes non viables ainsi que le taux de mortalité des jeunes, et on améliore globalement la santé et le bien-être des animaux d'élevage en limitant le risque de maladies génétiques.

Très récemment, nous avons découvert par les approches de génomique une mutation supposée délétère chez les ovins sélectionnés pour la production de lait. Cependant, nous ne connaissons pas les conséquences physiopathologiques (phénotype) de cette mutation à l'état homozygote. L'objectif de ce projet est de mettre en évidence le phénotype affecté par cette mutation en générant des agneaux homozygotes issus de croisements orientés par insémination animale (IA) avec de la semence de béliers porteurs hétérozygotes de cette mutation et 25 brebis également porteuses hétérozygotes de cette même mutation. Pour cela, dans une première étape, les brebis sont soumises à une procédure classique de synchronisation du cycle sexuel avec une pose d'éponge

intravaginale de progestagène pendant 14 jours et une injection intra-musculaire d'hormone gonadotrope eCG à la dépose de l'éponge. L'IA a lieu par dépôt intra-vaginal de la semence fraîche 55h après l'injection d'eCG. La réussite de l'implantation de l'embryon est suivie par une prise de sang régulière tous les 5 jours, du jour 10 au jour 25 post-IA. Ensuite, le développement des embryons et leur dénombrement seront suivis par échographie abdominale 1 fois tous les 10 jours, du jour 30 au jour 70 post-IA. La seconde étape du projet consiste à suivre la naissance et la croissance des agneaux nés de ces accouplements. En tenant compte d'un taux de réussite de l'IA de 70% et d'une prolificité de 150%, on peut s'attendre à la naissance de 26 agneaux dont 25% devraient être homozygotes (soit 5 à 6 agneaux). A la naissance ou le jour suivant, tous les agneaux seront pesés et génotypés (statut génétique de la mutation) suite à une biopsie auriculaire. L'emplacement de la biopsie sert à placer la boucle d'identification auriculaire obligatoire et réglementaire évitant une seconde intervention. Ensuite, les agneaux seront pesés et mesurés 1 fois par semaine jusqu'au sevrage à 1 mois d'âge, permettant également de repérer des anomalies morphologiques particulièrement chez les agneaux homozygotes. Ils feront l'objet d'un suivi sanitaire et d'observations de leur vigueur dans les déplacements locomoteurs et pour la tétée, 2 fois par jour.

Lors de ce projet, la règle des 3R sera suivie ainsi :

- Remplacement : La réalisation et le suivi d'accouplement orientés, ainsi que le phénotypage des agneaux ne peut se faire que par l'utilisation d'animaux vivants. Aucune alternative existe.
- Réduction : Hormis le suivi de la phase d'implantation embryonnaire par analyse moléculaire qui nécessite une prise de sang, le suivi de gestation réalisable également par prise de sang et dosage hormonal sera réalisé par une approche non invasive d'échographie. L'utilisation limitée à 25 brebis doit nous permettre de générer 6 agneaux homozygotes pour la mutation récessive supposée causale d'anomalie. Ce nombre est réduit mais adéquat pour observer une anomalie de phénotype répétable par comparaison aux 20 autres agneaux procréés.
- Raffinement : Les prises de sang jugulaires, poses d'éponges intra-vaginales, injections intramusculaires et inséminations seront réalisées par du personnel animalier expérimenté et formé pour ce type de gestes. L'échographie abdominale sera réalisée par 2 vétérinaires spécialisés. La contention des agneaux lors de la pesée et des prises de mensuration sera réalisée à l'aide d'un berceau conçu spécifiquement pour les agneaux et à proximité de la mère. Grace au suivi journalier, toute suspicion d'impact négatif sur la santé et le bien-être des agneaux homozygotes sera pris en compte par un traitement médicamenteux vétérinaire adaptée. Ce projet sera réalisé en condition d'élevage respectant le comportement grégaire de cette espèce.

19188 La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est la maladie neurodégénérative la plus fréquente après les maladies d'Alzheimer et de Parkinson. Elle se caractérise par une mort sélective des motoneurones (cellules nerveuses qui contrôlent les muscles) accompagnée d'une atrophie musculaire et de paralysie, puis par le décès des patients, trois à cinq ans après diagnostique. De plus, environ 40-50% des patients SLA développent des atteintes cognitives compatibles avec des démences de types fronto-temporales. Jusque très récemment, la SLA était considérée comme une maladie spécifique du motoneurone. Il apparait maintenant que le métabolisme (utilisation du glucose (sucre) et des lipides (graisses) pour produire de l'énergie) joue un rôle important dans le développement et la progression de la pathologie. En effet chez les malades atteints de SLA, le métabolisme est déjà altéré avant même l'apparition des premiers symptômes moteurs. L'organisme utilise alors des lipides à la place du glucose tout en produisant moins d'énergie. A ce jour, en dehors de traitements symptomatiques peu efficaces, aucun traitement curatif n'est disponible. Le développement de nouvelles approches thérapeutiques est essentiel.

L'objectif de ce projet est de tester l'effet synergique de deux molécules (capables de corriger les défauts métaboliques observés dans la SLA) sur le développement de la maladie. Ces deux molécules sont déjà utilisées en clinique pour traiter d'autres pathologies. Pour cette étude, nous utiliserons des souris génétiquement modifiées modèles de SLA qui développent des symptômes cliniques comparables à ceux observés chez l'Homme et présentent donc, elles aussi, les mêmes atteintes métaboliques. Cette étude nous permettra de déterminer si ces molécules-médicament

sont capables de ralentir la progression de la maladie voire d'empêcher son développement. Ces molécules pourraient alors rapidement être testées chez le patient. Dans ce projet, nous utiliserons au maximum 673 souris sur 5 ans.

Conformément à la règle des 3R, une attention particulière a été portée afin d'optimiser au mieux les protocoles, de réduire le nombre d'animaux utilisés et d'améliorer et raffiner leurs conditions de vie.

Remplacement : La SLA est une maladie d'origine multifactorielle et multicellulaire. Les cultures cellulaires ne permettent pas de modéliser l'aspect intégré et comportemental de ces pathologies et leur mise en place progressive.

Nous avons donc besoin de recourir à des modèles animaux qui présentent, en outre, une organisation du système nerveux proche de celle de l'homme pour réaliser ce projet de recherche.

Réduction : Afin de réduire le nombre d'animaux dans ce projet, les animaux destinés aux analyses biochimiques ou histologiques seront au préalable inclus dans les études comportementales et fonctionnelles. Le nombre de souris tient compte des tests statistiques utilisés lors de l'analyse des résultats ainsi que de la variabilité interindividuelle de ces modèles génétiques. La sclérose latérale amyotrophique est une maladie d'origine plurifactorielle et multicellulaire. Les cultures cellulaires ne permettent pas de modéliser de façon satisfaisante la complexité des unités motrices. Nous avons donc besoin de recourir à un modèle animal pour ce projet de recherche. Cependant, le choix des molécules a été orienté grâce à des études de pharmacologie in vitro, qui ont remplacés des études in vivo.

Raffinement : Les traitements envisagés se feront par l'alimentation afin de supprimer le stress lié aux injections intrapéritonéales. Nous avons également favorisé au maximum des tests non-invasifs pour étudier les fonctions motrices des animaux. L'enrichissement de l'environnement des animaux (bâtonnets à ronger, matériel de nidification, maisons en plastique rouge), le maintien des interactions sociales et la surveillance quotidienne des animaux permettront de s'assurer de leurs bien-être et de détecter rapidement tout changement de comportement associé ou non à la pathologie étudiée afin qu'il puisse être pris en charge. Des points-limites permettant de soustraire l'animal à la souffrance ont été établis. De plus nous appliquerons également le principe de raffinement au niveau des méthodes d'anesthésie pour les études d'enregistrements électriques musculaires.

19189 La protéine kinase CK2 est fréquemment mutée et suractivée dans les cancers. Considérée comme une cible thérapeutique en oncologie, cette protéine est au centre de programmes de recherche académiques et industriels qui développent de futurs candidats-médicaments. Bien que plusieurs de ces candidats aient montré une activité anti-cancéreuse in vivo, leur succès reste mitigé avec l'apparition d'effets secondaires et des phénomènes de résistances. Ceci ne faisant pas exception avec le CX-4945 (silmitasertib), qui s'est hissé jusqu'en essai clinique de phase II. Le développement de nouvelles molécules ciblant la protéine kinase CK2 est donc nécessaire.

L'objectif de ce projet de recherche fondamentale est de définir la pertinence d'une stratégie thérapeutique basée sur l'utilisation d'une nouvelle classe de molécules chimiques, sélectifs de la protéine kinase CK2, utilisées seules ou en combinaison pour le traitement de cancers et d'en caractériser les mécanismes moléculaires. Ces molécules ont déjà montré une efficacité in vitro pour entraîner la mort des cellules cancéreuses sans induire de toxicité sur les cellules saines. Les effets anti-tumoraux de ces molécules chimiques doivent à présent être confirmés in vivo en tenant compte du microenvironnement tumoral. Dans ce projet d'une durée de 5 ans, au maximum, 1770 souris seront utilisées et réparties dans 4 procédures, réalisées de manière séquentielle. De ce fait le nombre d'animaux est susceptible d'être diminué car certaines procédures ne seront réalisées qu'en cas de succès de la procédure précédente. A l'issue de ces procédures, les souris développeront des tumeurs en sous cutanées (procédures 1 à 3) ou au niveau des poumons (procédures 1 et 4). La première procédure est une étude pilote pour optimiser la greffe d'une lignée cellulaires de mélanome et de pancréas. La deuxième procédure étudiera l'effet anti-tumoral in vivo pour 3 molécules chimiques sur une lignée cellulaire de mélanome, de pancréas, de poumon, de

cerveau, de sein et de colon. Seules les molécules chimiques montrant un effet sur la croissance tumorale pour au moins l'une de ces 6 lignées cellulaires, seront utilisées dans les procédures 3 et 4. De plus, l'étude sur la lignée cellulaire de mélanome et de pancréas en procédure 2 ne sera réalisée si et seulement si l'étude pilote est concluante. La procédure 3 étudiera l'efficacité des molécules, retenues en fin de procédure 2, en combinaison avec une chimiothérapie de référence déjà utilisée sur les patients. Enfin, la procédure 4 permettra d'évaluer l'efficacité des molécules dans des modèles de métastases. Pour ce projet, un modèle de rongeur a été retenu, élevé dans des établissements agréés. Le choix et le nombre de rongeurs ont été déterminés en s'appuyant sur des programmes de développement de petites molécules chimiques, réalisés dans le cadre de projets antérieurs, mais aussi en comparaison des expériences menées lors du développement pré-clinique du candidat-médicament de référence sur la CK2, le CX-4945. En plus, une réalisation séquentielle des expérimentations permet de réduire le nombre de souris. En effet, les procédures 3 et 4 ne seront réalisées qu'avec la ou les molécules chimiques ayant montré une activité anti-cancéreuse sur au moins l'une des 6 lignées utilisées en procédure 2. Aussi, un suivi par imagerie de la progression des métastases permet une réduction du nombre de souris.

Remplacement : La première sélection des molécules a été réalisée in vitro sur culture de cellules.

Réduction : Pour la mise au point du modèle, l'imagerie permet de suivre le développement des tumeurs dans les poumons sans mettre à mort l'animal ce qui permet de réduire considérablement le nombre d'animaux.

Raffinement : Tout au long du projet, les précautions seront prises pour stresser au minimum l'animal. L'administration d'anesthésique, un suivi adapté et la définition précise des points limites précoces et prédictifs d'un mal être, permettront de limiter au maximum la souffrance animale. Le suivi du développement des métastases par imagerie permet de déceler la diminution de la capacité pulmonaire avant de voir des symptômes sur l'animal.

Retombée : A l'issue de ce projet, si le traitement avec au moins l'une des trois molécules chimiques induit bien une régression tumorale, une diminution des métastases et démontre un effet synergique avec un traitement déjà utilisé en clinique, ceci validera l'intérêt de ces nouvelles molécules ciblant la protéine kinase CK2. A terme, ceci pourrait permettre de proposer d'autres solutions thérapeutiques pour un large panel de pathologies cancéreuses.

19190 Les myopathies nécrosantes autoimmunes (MNAI) sont une forme grave de myopathie auto-immune associée à la présence d'auto-anticorps pathogènes. Cliniquement, les MNAI sont caractérisées par une faiblesse musculaire symétrique et proximale. D'autres symptômes comme la dysphagie, la dyspnée, la maladie pulmonaire interstitielle et le syndrome de Raynaud peuvent être observés. Leur traitement reste largement empirique et sous-optimal, à base de corticostéroïdes avec ou sans immunosuppresseurs et d'immunoglobulines intraveineuses ou sous-cutanées (Ig). Ces MNAI sont associées à des auto-anticorps (aAcs) dirigés contre les protéines SRP ou HMGCR. Notre laboratoire a établi le premier modèle murin de MNAI par injection à des souris d'IgG purifiées issues de patients porteurs d'aAcs anti-HMGCR ou anti-SRP. Ce transfert induit une myopathie clinique avec diminution de la force musculaire associée à un dépôt d'IgG et de C5b-9 à la surface des fibres musculaires, démontrant le caractère directement pathogène des aAc et démontrant un rôle cytotoxique du complément. Au travers de ce projet pour lequel nous avons obtenu l'autorisation du comité d'éthique, nous avons testé avec succès une première approche thérapeutique ciblant le complément. Ce modèle est donc un formidable outil pour tester de nouvelles voies thérapeutiques plus spécifiques. Dans ce but, nous souhaitons évaluer une seconde approche basée sur le blocage du système de recirculation des anticorps grâce à un anticorps monoclonal anti-FcRn et ainsi favoriser l'élimination des anticorps pathogènes.

Nos résultats antérieurs nous permettent de mettre en place des procédures expérimentales en respectant le concept des 3R.

Remplacer : L'utilisation d'animaux dans cette étude est indispensable pour l'évaluation de molécules antagonistes ciblant le FcRn dans une perspective d'approche à visée thérapeutique. Il

n'existe actuellement pas de modèles in vitro pour une telle étude combinée de la réponse humorale et de la physiologie du muscle. Ce projet ne peut donc être réalisée que chez l'animal.

Réduire : Le nombre total de souris nécessaires est de 256. Il est réduit au minimum en tenant compte de la variabilité des mesures de la force musculaire, ainsi que de la variabilité des réponses notamment immunologique. Les effectifs des groupes ont été déterminés statistiquement par le test des rangs signés de Wilcoxon.

Raffiner : Une échelle de gravité des symptômes observés a été établie et permet de déterminer un point limite dans l'ensemble des expériences. Elle permettra également d'évaluer la douleur des animaux et de mettre en place une procédure visant à la limiter.

Enfin, l'ensemble des expériences sera réalisé dans une animalerie agréée, où les conditions d'hébergement sont contrôlées : température, hygrométrie, cycle jour/nuit, change et nourriture. Les animaux seront élevés en communauté dans des cages enrichies avec un abri de cellulose (cello dome) et des fibres de coton (Nestlets). L'ensemble des procédures sera réalisé sous anesthésie gazeuse. Les animaux seront euthanasiés par surdose de CO₂ sous anesthésie générale à l'isoflurane.

Grace à cette approche, nous améliorerons notre compréhension du mécanisme d'action des anticorps et nous établissons les bases d'une nouvelle thérapie dans le traitement des MNAI qui pourra faire l'objet d'un essai clinique chez l'Homme.

19191 La perte de masse musculaire et de performance musculaire (force et/ou puissance) chez l'Homme vieillissant (passé 40 ans) a initialement est définie via le terme de sarcopénie. Cet état constitue un facteur de risque majeur de perte d'autonomie, de chutes, d'évènements indésirables, d'hospitalisation, d'institutionnalisation précoce et de décès.

Actuellement, l'exercice physique et les approches nutritionnelles semblent les mesures de prévention les plus efficaces pour limiter le déconditionnement musculaire associée au vieillissement. Cependant, l'observance du traitement par l'exercice reste faible et sa mise en oeuvre est difficile.

Des études récentes ont mis en évidence que de nouvelles molécules naturelles trouvées dans les plantes ou les fruits pourraient être utilisées dans le traitement ou la prévention du déconditionnement musculaire.

Cependant, les composés capables de lutter contre la perte musculaire restent très limités. Ainsi, il existe un besoin de nouveaux compléments alimentaires efficaces pour augmenter la masse musculaire ou en limiter la perte et augmenter les performances physiques (force et/ou endurance) ou en ralentir la diminution.

Les plantes représentent une source importante de molécules bioactives à l'origine des 2/3 des médicaments actuels.

Le carnosol est un composé extrait des feuilles de romarin qui présente des activités antioxydantes, anti-inflammatoires et anti-cancéreuses. Récemment, il a été démontré que le carnosol stimule l'absorption de glucose dans des cellules musculaires de rongeurs. Enfin, nos résultats préliminaires sur des cultures de cellules humaines indiquent que le carnosol, stimule l'hypertrophie musculaire, suggérant que le carnosol pourraient être utilisés pour augmenter et/ou limiter la perte de masse musculaire liée à l'âge.

C'est dans ce cadre que s'inscrit ce projet d'étude qui a deux objectifs principaux :

- Etudier les effets d'un apport du carnosol dans la prévention du déconditionnement musculaire au cours du vieillissement
- Etudier les mécanismes fondamentaux du déconditionnement musculaire

Pour atteindre ces objectifs, une expérimentation avec des souris vieillissante sera mise en place avec un apport en carnosol intégré à la nourriture durant 12 semaines.

Ce projet fera appel à des animaux âgés de 15-16 mois au début des expérimentations permettant ainsi d'avoir directement accès aux problématiques du vieillissement.

Cette expérimentation donnera lieu à des tests fonctionnels (force maximale de préhension, endurance de force, qualités d'endurance), une analyse de la composition corporelle (masse grasse et masse musculaire) et une analyse du métabolisme de repos avant le début, au milieu et en fin de traitement.

De plus, des prélèvements terminaux (sang, organes, muscles, os-tendon), permettront une évaluation approfondie et générale des effets du traitement au carnosol.

Pour réaliser ce projet, dans un premier temps 48 souris consanguines seront utilisées, réparties en 4 lots de 12 animaux.

Les animaux seront hébergés par 2 ou 3 en cages T2 transparentes avec pour enrichissement des carrés de ouate et un tunnel posé dans la cage. Nous effectuerons deux visites de surveillance par jour, y compris les week-ends. Une pièce d'élevage sera dédiée à ce protocole et nous maintiendrons la température aux alentours de 24 degrés pour limiter le refroidissement des animaux.

Si les résultats de la première expérimentation sont concluants, il est envisagé la même expérimentation sur une lignée non consanguine avec des animaux des deux sexes nécessaires pour un passage à l'humain par la suite. Il s'agirait alors d'utiliser 88 souris réparties en 4 lots de 22 souris avec autant de mâles que de femelles.

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

- « Remplacer » les modèles animaux : Nos questions scientifiques sont centrées sur les effets des différents niveaux de contraintes environnementales sur la physiologie du système musculaire. Les expérimentations animales avec système intégré sont donc indispensables. Des modifications engendrées au niveau de l'organisme entier, telles que les modifications des sécrétions hormonales par exemple, influencent la cinétique de perte ou de gain de la masse musculaire. De fait, nous nous sommes orientés vers un modèle animal se rapprochant de l'humain sur la physiologie musculaire et avons donc choisi la souris. Il n'existe pas de modèle cellulaire reproduisant nos procédures expérimentales. Dès que possible en fonction des résultats obtenus, ces expérimentations seront traduites chez l'homme.

- « Réduire » le nombre d'animaux: pour nos expérimentations, nous avons prévu le nombre strictement nécessaire d'animaux, à la fois pour garder une puissance statistique dans le traitement de nos résultats, et pour palier l'abandon de certaines souris dans l'expérimentation. Ce travail permettra également de réaliser plusieurs collaborations, donnant lieux à des résultats plus reproductibles et réduisant considérablement le nombre d'animaux nécessaires par rapport à des travaux menés en parallèle par chaque équipe. Si à l'issue de la première expérimentation nous n'obtenons pas de résultat significatif, nous ne poursuivrons pas les tests avec cette molécule.

- « Raffiner » la méthodologie utilisée :

Pour les différentes supplémentations qui seront testées, nous avons écarté le gavage afin de limiter toute forme de stress lié à la supplémentation. Ces molécules seront prodiguées via l'eau de boisson pour celles qui sont hydrosolubles ou directement incorporées dans la nourriture pour les autres.

Sachant que la neutralité thermique pour une souris est de 28 degrés et que les animaux âgés sont plus sensibles que les animaux jeunes, nous élèverons nos animaux avec une température ambiante de 24° +/- 1°C. Les animaux dépenseront ainsi moins d'énergie pour maintenir leur température corporelle.

Nous respecterons des temps de repos adaptés entre chaque procédure en fonction de la sévérité et les animaux seront habitués préalablement à chaque test.

Le suivi quotidien des animaux permet d'identifier des signes de souffrance caractérisés par l'état du pelage, le comportement de la souris (agressivité / apathie), cris, mobilité, alimentation... Le report hebdomadaire des poids corporels et de la consommation alimentaire sera un paramètre intégré à nos protocoles. Dans le cas où un animal présenterait des signes manifestes de souffrance ou perte de poids excessive ($\geq 20\%$ du poids initial), il sera sorti des procédures expérimentales et euthanasié si les signes d'une souffrance persistent. Les protocoles employés sont maîtrisés et n'entraîneront pas de douleurs chez les souris participantes.

19192 *Dermanyssus gallinae* (pou rouge des poules) est un acarien hématophage inféodé aux oiseaux, à prévalence élevée en élevage de poules. Responsable de dégâts directs (stress avec baisse de rendement, déclassement des œufs) et indirects (transmission de salmonelles, allergies chez le personnel), il doit être combattu, mais s'avère largement récalcitrant aux moyens de lutte conventionnels. Ne vivant pas sur l'hôte, il passe l'essentiel de sa vie caché dans des interstices divers, ce qui rend son contrôle délicat. Traiter directement les animaux n'est pas approprié. Les traitements le plus souvent préconisés sont appliqués par pulvérisation dans le bâtiment. Ils ne touchent qu'une infime partie de la population et sont souvent d'une efficacité limitée.

Face à l'expansion actuelle de l'acarien et dans un objectif de réduction des intrants de synthèse, le développement de moyens de lutte alternatifs est un enjeu majeur. C'est dans ce contexte que s'inscrit notre projet : il vise à développer le contrôle de l'acarien à travers la lutte biologique par conservation. Cela consiste à mettre à profit l'action d'ennemis du bioagresseur naturellement présents dans la zone infestée (ici les bâtiments d'élevage). Le mode de vie distant de l'hôte du pou rouge l'amène à fréquenter des microhabitats où il peut rencontrer divers ennemis naturels (insectes, acariens, et autres arachnides prédateurs, champignons entomopathogènes...). Cela en fait une cible idéale de cette lutte biologique. Nous cherchons pour ce faire à établir les interactions de prédation sur le pou rouge naturellement en œuvre dans ce type de milieu, en plaçant le focus sur les acariens et insectes prédateurs. Nous espérons ainsi à terme pouvoir proposer des amendements pour favoriser l'action des prédateurs.

Du fait des multiples interactions possibles entre ennemis naturels et avec d'autres membres des écosystèmes considérés, il est crucial de raisonner à l'échelle des communautés et non pas seulement des paires proie-prédateur. Afin d'établir les effets des interactions de prédation et de déterminer le potentiel suppresseur de communautés d'acariens et d'insectes, des expérimentations en mésocosmes doivent être menées, en complément d'analyses au laboratoire sur les interactions par paire pou-prédateur. La méthodologie envisagée ici consiste en la mise en contact d'un nombre connu d'acariens ou d'insectes appartenant à différentes espèces à un instant t dans une unité mimant une portion de bâtiment d'élevage (mésocosme) et à recenser les individus de chaque espèce après plusieurs générations du bioagresseur. Cela permettra d'objectiver le potentiel suppresseur en fonction des tailles relatives initiales des populations et de la composition des communautés.

Le principe de ces expérimentations requiert la présence continue de poules pour permettre aux populations de pou rouge de se développer comme dans un bâtiment d'élevage. Aucune manipulation douloureuse n'est pratiquée, exceptée l'application d'un vaccin dans certaines modalités. Le principal désagrément pour l'animal est le confinement durant plusieurs semaines dans un espace de taille réduite. De manière à limiter ce désagrément, des unités aérées mais étanches aux acariens, équipées d'arrivées d'eau et d'aliments, ont été conçues et construites à cet effet au laboratoire. Les animaux seront ainsi autorisés à se mouvoir, boire et s'alimenter ad libitum. Concernant la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner), nous ne pouvons pas remplacer l'animal (poule), car nous cherchons à mettre en œuvre les interactions trophiques impliquant l'association spécifique entre le pou rouge et son hôte et devons reproduire fidèlement la dynamique des populations de l'acarien hématophage en contexte d'élevage. Le nombre de poules à tester est réduit au minimum (1) en travaillant sur des unités hébergeant une seule poule chacune, (2) en intégrant un nombre de répliquats suffisant pour en tirer des données robustes et éviter de devoir refaire des essais. La dynamique des communautés d'arthropodes en fonction de leur composition et des traitements associés sera établie par comparaison entre les valeurs d'abondance des arthropodes au démarrage et à $T+3$ mois dans chaque unité.

Un total de 640 poules sera utilisé au cours de l'étude. En fin d'expérimentation, les poules seront cédées à titre gratuit, ou, pour celles qui n'auront pas trouvé d'acquéreur, euthanasiées. Nous raffinerons en outre les expérimentations en offrant aux poules la possibilité d'exprimer leur comportement naturel (perchage, grattage). Les poules impliquées dans l'expérimentation ne seront jamais en âge de pondre, si bien que nous ne fournirons pas de zone dédiée à cette activité.

19193 L'augmentation croissante du diabète dans le monde, de l'obésité et des maladies métaboliques posent désormais un problème de santé publique nécessitant l'amélioration de la qualité des soins, la prise en charge thérapeutique et la maîtrise des coûts de traitement. Le traitement du diabète dans le monde repose en grande partie sur l'utilisation de différents types de molécules, tels que l'insuline, le glucagon ou autres molécules actives agissant sur la glycémie.

Actuellement, nous développons de nouveaux excipients pharmaceutiques pour améliorer la biodisponibilité, la solubilité et la stabilité des médicaments. Grâce à ces excipients, il est désormais possible de combiner différents types de molécules actives, afin d'améliorer la prise en charge des patients. Le traitement est plus proche d'un rythme physiologique de sécrétion d'insuline, permettant ainsi de diminuer le nombre d'injection pour le patient et de limiter les événements hyper ou hypoglycémiques. Cette avancée technologique permet également d'améliorer l'efficacité des différents types de molécule.

Après évaluation *in vitro* des différentes formulations de protéines et d'excipients, nous utiliserons des modèles animaux Rongeurs, Porcs et Chiens pour évaluer nos produits. Ceux-ci sont largement décrits dans la littérature et les protocoles d'évaluation respectent les normes de bien-être animal avec l'établissement de points limites, un suivi sanitaire strict et un suivi régulier de chaque individu. Plusieurs types d'étude seront mises en place :

- Etudes de toxicité qui permettront de déterminer une dose non toxique et d'évaluer la toxicité générale du produit. Ces études sur l'animal sont recommandées par les lignes directrices ICH, et en particulier sur les Rongeurs, espèces pour lesquelles les constantes biologiques et de bien-être animal sont largement connues et décrites.

- Etudes de tolérance locale qui joue au premier ordre dans l'utilisation de produits pharmaceutiques à base de molécule active et devant être utilisés plusieurs années chez l'Homme.

- Etudes de pharmacocinétique qui permettent d'affiner les choix thérapeutiques au plus proche des besoins humains, afin d'établir une preuve de concept préclinique pour le lancement d'essai clinique. Les risques potentiels encourus pour les animaux sont principalement des risques hypoglycémiques ou légèrement hyperglycémiques. Le suivi de la glycémie chez l'animal, en temps réel, est aussi facile que chez l'Homme, et des valeurs critiques sont connues, qui permettent d'interrompre l'essai si nécessaire.

A l'issue de ces études, les excipients retenus poursuivent leur développement en études de toxicologie réglementaires avant d'être utilisés en essais cliniques chez l'Homme. Ces essais respectent les lignes directrices internationales et sont conformes aux règles éthiques en vigueur, l'utilisation animale étant restreinte à son minimum nécessaire.

Les animaux seront hébergés en groupe. Si pour les besoins de l'étude les animaux sont amenés à être hébergés de manière individuelle, alors les animaux auront un contact visuel et olfactif. Tous les animaux auront accès à un enrichissement spécifique à leur espèce. Tout sera mis en œuvre pour minimiser le stress auquel les animaux sont soumis. Des points limites, suffisamment prédictifs, permettront de sortir un animal de l'étude afin de limiter la douleur à son minimum.

Sur 5 ans, nous envisageons le lancement de plusieurs produits innovants, ce qui pourrait nous amener, au maximum, à l'utilisation de 500 Souris, 1500 Rats, 100 Chiens et 100 Porcs sur 5 ans. Ceci représente un maximum, sachant que pour chaque produit, le nombre d'animaux utilisés est calculé de façon à utiliser le minimum d'animaux nécessaires pour obtenir les renseignements qui permettent de passer en toute sécurité en phase clinique.

19194 La lèpre, due à *Mycobacterium leprae*, est une maladie invalidante dont le traitement est long et l'observance par les patients difficile à vérifier par le personnel soignant du fait de l'éloignement des centres de soins dans les régions d'endémie. Le traitement recommandé par l'OMS depuis 1982 consiste en une polychimiothérapie à base de rifampicine, clofazimine et dapsoné. Il dure de 12 à 24 mois en fonction du cas clinique de la maladie. La mauvaise observance de la prise d'antibiotiques a entraîné une sélection de souches résistantes aux molécules utilisées dans les traitements actuels.

La problématique dans le cadre du traitement de la lèpre est donc la durée de traitement mais aussi la possibilité d'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques due à une mauvaise observance du traitement par les patients. Il est donc nécessaire de trouver des antibiotiques permettant 1. de réduire la durée de traitement ; 2. de réduire la fréquence d'administration des antibiotiques et 3. d'élargir le panel d'antibiotiques utilisables en cas de bactérie résistante à un des antibiotiques utilisé dans le traitement standard. Notre projet consiste donc en l'étude in vivo de nouvelles molécules sur cette pathologie.

Mycobacterium leprae n'est pas cultivable in vitro et se développe uniquement in vivo et de manière très longue (environ 12 mois). Le modèle animal ne peut être donc remplacé pour l'étude de cette bactérie. Nous utiliserons pour notre étude l'inoculation de la bactérie dans le coussinet plantaire de la souris. Le schéma expérimental utilisé dans l'évaluation d'une nouvelle molécule est celui de la méthode dite de « bactéricidie proportionnelle » : 3 dilutions de bactéries différentes sont inoculées à l'animal ce qui permet de mesurer l'activité bactéricide d'une molécule par rapport à l'absence de traitement et à un traitement de référence. Par an, au maximum, 5 nouvelles molécules seront testées en fonction des recherches menées sur les nouveaux antibiotiques et deux posologies par molécule seront testées afin d'adapter au mieux l'extrapolation du traitement à la médecine humaine par la suite. Un groupe de souris non traitées sera inclu afin de démontrer que la bactérie s'est bien multipliée et que l'effet bactéricide n'est pas dû à un problème avec la souche bactérienne. Afin de démontrer l'activité bactéricide d'une nouvelle molécule, il est nécessaire de comparer celle-ci avec un groupe traité par un antibiotique connu pour son action contre *M. leprae*. L'évolution de la maladie n'entraîne aucune souffrance ni décès chez l'animal. Cependant, les expériences étant longues (au minimum 12 mois), il est nécessaire de prendre en compte le vieillissement des animaux et le taux de mortalité pouvant en découler. C'est pourquoi au total et au maximum pour 5 molécules testées par an, 2405 souris seront utilisés sur 5 ans.

Pour établir nos procédures, nous nous sommes conformés au principe des 3R :

- Remplacement : *Mycobacterium leprae* n'étant pas cultivable in vitro, le modèle murin est le seul permettant une évaluation de l'activité des antibiotiques avant un essai chez l'homme. Il est dans ce cas impossible de remplacer l'expérience sur l'animal par une expérience in vitro ;
- Réduction : le nombre d'animaux proposé a été réduit au minimum indispensable nous permettant de répondre à la question posée après évaluation statistique et incluant le vieillissement normal des souris ;
- Raffinement : l'évolution de la maladie n'engendre aucune souffrance chez l'animal. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et l'enrichissement utilisé, permettent de limiter le stress des animaux utilisés. La surveillance quotidienne des animaux par le personnel compétent permettra d'observer tout changement dans le comportement habituel des animaux et de détecter une éventuelle souffrance.

19195 Notre projet vise à valider le développement d'un système d'imagerie combinant imagerie opto-acoustique et échographie ultrarapide dans des modèles animaux.

L'imagerie opto-acoustique est une méthode d'imagerie moléculaire non-invasive permettant notamment de visualiser l'oxygénation des tissus. L'échographie ultrarapide permet de mesurer des paramètres de flux sanguin de manière beaucoup plus précise et sensible que les techniques d'échographie conventionnelles. Aucun système combinant les avancées de l'imagerie optoacoustique (imagerie moléculaire) aux innovations en imagerie ultrasonore ultrarapide (imagerie vasculaire ultra-sensible) n'est actuellement disponible. Un tel outil permettra d'investiguer par exemple les liens entre modifications d'oxygénation des tissus et la circulation sanguine.

Nous souhaitons valider le développement de notre prototype sur des animaux sains en observant l'oxygénation et la vascularisation des reins. Nous modulerons la quantité d'oxygène qu'ils reçoivent et mesurerons les modifications induites sur les différents paramètres mesurés à l'aide de notre prototype, permettant ainsi d'en déterminer la précision.

Nous appliquerons ensuite la méthode développée à un modèle animal de pathologie de la grossesse, la pré-éclampsie, qui se traduit par une augmentation de la tension chez la femme enceinte, conduisant souvent à des arrêts thérapeutiques de la grossesse. Cette pathologie est connue pour être associée à des anomalies d'oxygénation et de distribution du sang dans le placenta.

Nous mesurerons la vascularisation et l'oxygénation du placenta des embryons de souris gestantes, saines ou pathologiques. En cas de différences détectables, nous ferons les mêmes mesures dans un groupe pathologique soumis à un traitement préventif établi.

Ce projet met en oeuvre la règle des 3R :

Réduire

Le nombre d'animaux a été calculé pour déterminer la variabilité de cette technique. La méthode d'imagerie étant non invasive et non douloureuse, les mêmes animaux sont réutilisés plusieurs fois. L'évaluation de l'utilité des paramètres d'imagerie dans le groupe traité pour la pré-éclampsie ne se fera que si des différences sont mesurables entre souris malades et souris saines.

Raffiner

Toutes les études sont réalisées sous anesthésie générale, les examens d'imagerie sont non invasifs et atraumatiques et impliquent au maximum l'injection d'un agent de contraste utilisé en clinique. Le modèle de prééclampsie ne nécessite pas de chirurgie ou de drogue et n'affecte pas le comportement des femelles gestantes.

Remplacer

Le système a déjà été caractérisé autant que possible sur des maquettes physiques présentant un flux ou générant des signaux opto-acoustiques, avant de passer chez l'animal.

Des points limites adaptés ont été définis pour éviter toute souffrance aux animaux utilisés.

Nombre d'animaux :

Ce projet utilisera au total 290 souris ou embryons de souris sur 2 ans : 50 souris, dont 30 femelles gestantes portant au total 240 embryons.

Résultats attendus :

Nous espérons que cette étude valide notre système combinant deux techniques innovantes in vivo. Cette étude permettra de proposer de nouveaux outils pour explorer l'interaction entre vascularisation et oxygénation des tissus dans différentes pathologies, avec par exemple des applications dans l'étude des cancers, des pathologies du développement ou des pathologies rénales.

19196 Les infections ostéo-articulaires (IOA) sont des infections qui posent un problème majeur de santé publique (> 40. 000 cas par an en France, plus d'un million dans le monde), et pour lesquelles les options de traitement actuelles sont insatisfaisantes.

Staphylococcus aureus (S. aureus), est la bactérie qui cause le plus d'IOA, créant une destruction osseuse et des inflammations localisées (ostéomyélite). De plus en plus de souches de S. aureus sont résistantes aux antibiotiques existants, et ce pathogène est désormais l'une des causes principales d'infections acquises en milieu hospitalier.

Au-delà des difficultés diagnostiques, les chirurgiens font face à un problème de "précision" dans le traitement chirurgical de ces infections. Dans le cas d'une IOA nécessitant une amputation, il est actuellement impossible de savoir précisément où se situe le foyer infectieux au niveau de l'os, et donc où le sectionner. Le développement d'une technique d'imagerie adaptée qui permettrait une visualisation de l'os endommagé et du site infectieux représente un enjeu majeur pour minimiser l'ampleur de l'opération chirurgicale, et donc les conséquences qu'elles peuvent avoir sur la motricité du patient.

Pour cette étude, nous utiliserons un modèle murin d'infection à S. aureus qui reproduit l'IOA associée à S. aureus chez la souris. Ce modèle déjà développé est utilisé dans plusieurs laboratoires européens. A la suite d'une infection par S. aureus (réalisée sous anesthésie gazeuse),

les souris subissent une perte de poids pendant les 3-5 premiers jours pouvant entraîner l'atteinte d'un point limite, et seront donc surveillées quotidiennement. Après le cinquième jour, elles commencent à reprendre du poids. Le modèle mimant les IOA, *S. aureus* entraîne également des destructions osseuses chez la souris, se caractérisant par une réduction de la densité osseuse. Ces dommages osseux ne touchent pas l'ensemble des os de la souris, mais seulement ceux où les bactéries s'implantent. Ces dommages corporels peuvent entraîner, de manière rare, des difficultés pour se mouvoir. En cas d'observation de ces signes cliniques et afin d'améliorer le bien-être des souris, nous pourrions mettre à disposition de l'eau et de la nourriture directement dans la cage.

L'utilisation de ce modèle murin d'ostéomyélite permettra de déterminer si une analyse par IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) permet de détecter finement les dommages osseux associés à une infection chronique à *S. aureus* et permet de mesurer l'étendue du foyer infectieux avant chirurgie. L'IRM utilisée est semblable à celles utilisées en clinique, la séquence obtenue par IRM sera facilement transposable en routine clinique quotidienne chez l'homme.

Le projet nécessitera l'utilisation de 90 souris. Le choix du modèle souris est imposé par son utilisation dans les tests pré-cliniques des compagnies pharmaceutiques et par la nécessité de pouvoir utiliser des animaux génétiquement modifiés. La réponse immunitaire induite lors de l'infection par *S. aureus* et les dommages dans l'os causés par les bactéries sont des phénomènes biologiques complexes faisant intervenir de nombreuses cellules immunitaires différentes et une organisation spatiale qui rend impossible son étude dans des tests *in vitro*.

Des études préliminaires *in vivo* ont permis de montrer que le pourcentage de souris dans lesquelles *S. aureus* persiste et l'infection devient chronique est proche de 50%. Le nombre d'animaux utilisés est réduit au minimum en tenant compte de cette donnée, afin que les groupes de souris soient suffisants pour l'interprétation statistique des résultats.

19197 La protection des chiens contre la leptospirose est un enjeu très important en santé publique puisque cette maladie atteint aussi bien les chiens que les humains, qui se contaminent dans les milieux humides. Cette maladie est mortelle dans certains cas, et peut provoquer des séquelles rénales importantes si l'animal survit. Notre travail consiste au développement d'un vaccin innovant. Nous sommes au stade préclinique et les études se feront sur l'espèce cible du vaccin: le chien. Notre projet consiste en trois études imposées par la loi pour permettre la mise sur le marché du vaccin. Elles suivent la Pharmacopée Européenne et visent à déterminer les formulations vaccinales qui protégeront le mieux les chiens contre l'infection par les différents sérovars de Leptospires et qui seront les mieux tolérées.

Objectif du projet: étudier la mise en place de l'immunité et la tolérance dans l'espèce cible de différentes formulations de vaccins tétravalents contre la leptospirose canine.

Modalités: chaque étude durera 6 semaines et sera constituée de 3 groupes d'animaux vaccinés contre la Leptospirose avec un lot différent de vaccin tétravalent et d'un groupe d'animaux témoins non vaccinés. Les animaux seront vaccinés aux âges de 6 et 10 semaines. Les éventuelles réactions locales ou générales seront observées pendant 14 jours après chaque injection. La seule différence entre les études est la souche de Leptospire qui sera utilisée pour réaliser les infections expérimentales, à l'issue de chacune de ces études pour évaluer l'efficacité des vaccins contre 3 des 4 sérovars. Les phases d'infection ne seront pas réalisées dans notre établissement, mais dans un autre au sein de l'Europe, dans lequel les animaux seront transférés au terme de la phase d'immunisation. Les infections expérimentales sont donc décrites dans un autre projet.

Dommages attendus: ils sont légers: les chiots des groupes traités seront vaccinés 2 fois par voie sous-cutanée et tous auront 3 prises de sang de 1 ml pour doser les anticorps. Les vaccins en développement ne devraient pas causer de réaction locale ou générale importante ni durable (éventuellement hyperthermie, inflammation, douleur locale).

Bénéfices attendus: la mise à disposition d'un vaccin contre la leptospirose canine plus efficace et mieux toléré que ceux actuellement disponibles. Il pourra bénéficier à toute la population canine et indirectement à l'Homme également en diminuant la probabilité de transmission de la maladie.

Respect de la règle des 3R:

Remplacer: il n'y a pas d'alternative à l'utilisation des animaux de l'espèce cible.

Réduire: dans les groupes vaccinés, il n'y a qu'un chiot de plus que le nombre minimum réglementaire.

Raffiner: les animaux seront tous observés tous les jours afin de détecter rapidement tout problème de santé ou de bien-être, lié ou non à ce projet. Ils seront constamment hébergés en groupes sociaux, dans les conditions normales de l'élevage, dans un milieu adapté à leur âge. Ils ne seront pas sevrés plus précocement que d'habitude. Des soins médicaux et de nursing seront mis en place immédiatement en cas de besoin. Des critères d'arrêt ont été définis pour cette étude (perte de poids ou non prise de poids entre 2 pesées hebdomadaires, blessures graves ou invalidantes, incapacité de s'alimenter, s'abreuver ou se déplacer...).

Au total 113 chiots seront utilisés pour la globalité du projet.

19198 La reproduction caprine est saisonnée. L'activité de reproduction des chèvres commence habituellement en automne lorsque la durée du jour diminue et s'arrête lorsque les jours augmentent au printemps. Les petits naissent classiquement au printemps et deviennent pubères autour de l'âge de 6-7 mois. Chez plusieurs espèces de mammifères, les signaux sensoriels échangés lors des interactions mâle/femelle peuvent modifier la physiologie et les réponses comportementales de reproduction. Chez la chèvre, des travaux antérieurs ont montré que l'exposition précoce de femelles à un mâle pouvait induire une apparition précoce de la puberté chez celles-ci (effet non retrouvé chez des femelles isolées ou exposées à des mâles castrés). Cependant, cette puberté ne s'est déclenchée que lorsque les mâles sont devenus sexuellement actifs (vers fin août). Celle-ci avait été évaluée par des dosages hormonaux (pulsatilité LH, progestérone pour détermination de la 1^{ère} ovulation), une évaluation du tractus génital et des marqueurs cérébraux.

Nous souhaiterions déterminer si le déclenchement de la puberté des chevrettes est induite par la reprise de l'activité sexuelle du mâle. De ce fait, nous pourrions déterminer s'il est possible de raccourcir la durée d'exposition des chevrettes au mâle.

Afin d'apprécier la transition pubertaire, nous étudierons l'expression de marqueurs cérébraux impliqués dans l'activation de la fonction de reproduction.

Nous évaluerons en parallèle la sensibilité olfactive des chevrettes en fonction de leurs interactions sociales (présence de mâle ou non) et de leur statut endocrinien (pubères ou non) à l'aide d'une technique d'imagerie calcique.

Ce projet respecte le principe des 3R :

- Remplacement : le modèle animal ne peut pas être remplacé dans ce projet étudiant l'impact des relations sociosexuelles sur la puberté car ceci n'est pas modélisable par des modèles alternatifs,
- Raffinement : les animaux seront hébergés en groupes sur paille et bénéficieront d'enrichissement comme des caisses en bois et des ballons. Sur la base des résultats acquis précédemment, certaines procédures seront réalisées moins de fois. De plus, 3 expérimentations différentes seront réalisées en un seul projet pour limiter le nombre d'animaux utilisés,
- Réduction : le nombre d'animaux utilisés (4 mâles castrés) a été rationalisé dans le but de ne pas utiliser plus d'animaux que nécessaire pour pouvoir mettre en évidence un effet après analyse statistique.

19199 En conditions physiologiques, la perméabilité de l'épithélium intestinal assure une sélection stricte du passage de nutriments mais aussi d'agents toxiques ou de microorganismes dans la circulation générale. La perméabilité intestinale peut être augmentée par ces agents exogènes (présents dans la lumière intestinale, nutriments, microorganismes...) mais aussi par des réponses de l'organisme lui-même (immunitaires, inflammatoires, cancérogènes ou nerveuses). Ainsi, une augmentation de la perméabilité intestinale représente une étape clef dans la majeure partie des troubles intestinaux mais son identification est souvent difficile car elle peut être soit ponctuelle, soit persistante, soit restreinte à certaines zones de l'intestin. Une méthode de référence de mesure de la perméabilité intestinale consiste à administrer oralement des composés fluorescents ou radioactifs in vivo, chez

l'animal vigile, et de mesurer leur absorption intestinale par leur apparition dans la circulation sanguine. Cette méthode est sensible, mais l'obtention de résultats peut être biaisée lors de réponses interindividuelles importantes ou lorsqu'une partie seulement de l'intestin montre une perméabilité augmentée.

Notre projet développera, chez la souris, une nouvelle méthode de mesure de la perméabilité intestinale in vitro, en microscopie confocale sur coupes d'intestins prélevés post mortem, que nous comparerons à la méthode in vivo précédemment décrite. Cette nouvelle méthode in vitro consiste à marquer l'accessibilité d'un marqueur membranaire qui reste positionné à la surface de l'intestin en absence de perméabilité de l'épithélium intestinal mais qui pénètre à l'intérieur du tissu dans les régions perméables. Nous déterminerons ainsi si cette méthode in vitro pourrait être plus sensible et précise que la méthode in vivo permettant à terme de réduire le nombre d'animaux en expérimentation et peut-être permettre de remplacer la méthode in vivo.

Ces deux méthodes de mesure seront comparées dans deux études nutritionnelles dont nous souhaitons caractériser l'impact sur la perméabilité intestinale. Pour chacune de ces deux études nous effectuerons sur les mêmes animaux une première mesure de perméabilité intestinale in vivo, puis quelques jours plus tard, une seconde mesure de perméabilité, avec la méthode in vitro, sur intestins prélevés.

- La première étudiera l'effet sur la perméabilité colique d'une alimentation de quatre semaines enrichie en fer héminique provenant de viandes et charcuteries et associée à une augmentation du risque de cancer du côlon. Nous utiliserons 24 souris mâles C57Bl/6, réparties en deux lots de 12 qui seront nourries avec un régime standard ou enrichi en fer héminique.

- La seconde mesurera l'effet sur la perméabilité intestinale de l'intestin proximal (duodénum et jéjunum) d'une administration orale unique d'une solution enrichie en huile de palme (riche en acides gras saturés) ou d'une solution enrichie en huile d'olive (riche en acide gras insaturés) en comparaison à une administration d'eau. Cette étude se fera en deux temps : (i) une étude pilote sera réalisée avec 18 animaux (3 lots de 6) pour déterminer sous quelle posologie liquide l'huile de palme (solide jusqu'à 40°C) peut être administrée par dilution dans une autre solution aqueuse ou lipidique, pour être rapidement digérée et absorbée dans l'intestin ; (ii) l'étude principale utilisera 72 souris mâles de fond génétique C57Bl/6, dont un lot de 36 souris non transgéniques dont la barrière intestinale est intacte et un lot de 36 souris transgéniques CA-MLCK (Constitutively Active-Myosin Light Chain Kinase) possédant une mutation de la MLCK qui augmente en permanence la perméabilité de l'épithélium intestinal. Chaque lot sera divisé en 3 groupes de 12 animaux, nourris respectivement avec une solution enrichie en huile de palme (selon la formulation sélectionnée préalablement), une solution enrichie en huile d'olive ou de l'eau.

Cette étude utilisera donc au total 114 souris et sera conduite sur des lots de 12 animaux pour chaque condition qui est le minimum requis pour assurer une fiabilité suffisante des données pour effectuer des analyses statistiques. Les animaux seront hébergés dans des locaux d'animalerie conventionnels, conformes aux normes fixées par la réglementation européenne et leur assurant les meilleures conditions de vie et de bien-être. Leur confort sera notamment garanti par la présence de tunnels de refuge dans les cages, une température ambiante constante de 20°C et un accès permanent à la nourriture et l'eau. Pour s'assurer de leur santé et bien-être, les animaux seront observés fréquemment et pesés une fois par semaine. Tout animal présentant une perte pondérale supérieure à 10% ou des signes d'anxiété, souffrance ou douleur sera retiré de l'étude pour être soigné ou euthanasié.

19200 La saison estivale est souvent une période critique pour les éleveurs. ses : la faible production des prairies doit être compensée par des fourrages conservés (foin, ensilage, ...), réduisant alors le stock hivernal. Ce processus devrait s'amplifier dans les prochaines années sous l'effet du changement climatique. Il est donc nécessaire de trouver de nouveaux fourrages offrant une bonne qualité fourragère tout au long de la saison estivale. Les végétaux ligneux (arbres, arbustes et lianes) semblent avoir un bon potentiel : ils sont largement consommés dans les zones tropicales, leurs feuillages restent verts tout au long de la période estivale en zone tempérée, et plusieurs études menées en Europe montrent qu'ils conservent une bonne valeur nutritive en été. Certain. e.

s éleveurs. ses français. e. s commencent déjà à utiliser les ligneux comme ressource fourragère, mais il y a très peu d'études scientifiques étudiant leur consommation par les bovins laitiers.

Ce projet vise à étudier l'appétence et l'ingestion de 70 espèces d'arbres, d'arbustes et de lianes directement pâturées au champ par un troupeau laitier (génisses et/ou vaches). Les animaux seront libres de consommer les ligneux à disposition, qui ne constitueront qu'une partie de leur ration totale.

Dans un premier temps, nous cherchons à étudier les préférences alimentaires au pâturage avec des animaux en production (jusqu'à 144 vaches et génisses, réparties sur 5 ans) conduits dans les conditions d'un élevage classique, simplement grâce à des observations visuelles. Ces observations visuelles seront ensuite complétées par une étude des proportions et quantités ingérées par les animaux, grâce à l'administration d'un marqueur alimentaire d'origine naturelle et à l'analyse des fèces prélevées au maximum 30 jours par an, sur un nombre maximum de 60 animaux durant la période de 5 ans.

Les protocoles ont été réalisés en prenant en compte la règle des 3R :

- Remplacer : les objectifs étant d'étudier les préférences alimentaires de bovins laitiers, dans des objectifs de production, il n'est pas possible de remplacer les animaux.

- Réduire : lors des premières observations de comportement alimentaire, l'effectif sera réduit à 12 bovins puis, en l'absence d'effets indésirables, il sera progressivement augmenté et pourra atteindre 72 vaches laitières et 24 génisses maximum par an, soit 144 animaux en tout sur les 5 années (72 vaches laitières et 24 génisses en 2021, puis 12 nouvelles génisses par an pendant 4 ans : $72+24+(12 \times 4) = 144$). Les études d'ingestion seront réalisées sur 12 animaux par an, ce nombre étant jugé suffisant dans les études similaires déjà réalisées. Un même prélèvement servira pour plusieurs analyses (proportions et quantités ingérées).

- Raffiner : les animaux seront au pâturage, avec un accès permanent à l'eau, et leur comportement sera suivi pour déceler rapidement tous troubles digestifs et/ou du comportement indicateurs d'un inconfort, afin d'écarter et de soigner, le cas échéant, ces animaux. Lorsque les animaux sont à l'étable, ils disposent d'un hébergement de groupe et d'une aire paillée, ainsi que de brosses. Les prélèvements de fèces et l'administration de marqueurs naturels seront réalisés par des agents suivant quotidiennement le troupeau et préalablement formés, et en limitant l'impact sur l'animal.

19201 Le cerveau est constitué de neurones et d'autres types de cellules, les cellules gliales, parmi lesquelles il y a les astrocytes. Les astrocytes ont longtemps été considérées comme des cellules de support métabolique pour les neurones. Néanmoins, un nombre croissant d'études montrent que ces cellules jouent un rôle actif dans la régulation de l'activité neuronale via plusieurs mécanismes, comme la formation et la maturation des synapses, la modulation de la transmission des signaux entre les neurones et la régulation de l'environnement cérébral. De plus, des études récentes ont montré que les astrocytes peuvent réguler l'activité et la survie neuronale en échangeant des constituants cellulaires, comme les mitochondries. Ce mécanisme de transfert de mitochondries a été démontré chez la souris en conditions physiologiques dans l'œil, où les mitochondries neuronales sont transférées aux astrocytes pour être dégradées, et en conditions pathologiques telles que l'ischémie cérébrale, une diminution ou arrêt de la circulation sanguine qui détermine une mauvaise oxygénation dans une partie du cerveau. Dans ce contexte pathologique, les astrocytes libèrent des mitochondries saines et les passent aux neurones pour améliorer la survie neuronale. Cependant le rôle et l'impact du transfert des mitochondries n'ont pas encore été étudiés tout au long du système visuel en conditions physiologiques et pathologiques. Le but de ce projet est donc d'étudier la présence et l'impact du transfert de mitochondries entre les astrocytes et les neurones dans le système visuel chez la souris en conditions pathologiques, tel que le stress oculaire qui est observé dans des pathologies de la rétine comme la neuropathie optique héréditaire de Leber. Cela nous permettra une meilleure compréhension du rôle de ce phénomène dans le fonctionnement du système nerveux central et de pouvoir identifier des nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement des pathologies oculaires.

Pour étudier le transfert de mitochondries dans le système visuel en conditions pathologiques, nous travaillerons chez la souris et nous utiliserons une approche basée sur 1/ la génération d'un modèle

de pathologie oculaire et 2/ le prélèvement de tissus et l'analyse immunohistochimique des molécules d'intérêt à la suite de l'injection intraoculaire de molécules rapporteuses. Pour ce faire, les animaux seront injectés avec un vecteur viral qui permet d'exprimer spécifiquement dans les mitochondries des molécules fluorescentes (molécules rapporteuses), qui seront ensuite détectées grâce à l'utilisation d'anticorps reconnaissant spécifiquement ces molécules (analyse immunohistochimique).

Ce projet nécessite des expériences chez l'animal car nous nous intéressons aux interactions entre les neurones et les astrocytes en conditions physiologiques et pathologiques, telles que le stress oculaire, où la présence des réseaux neuronaux et astrocytaires intègres et connectés est fondamentale. Ces conditions ne peuvent pas être remplacées par des modélisations informatiques ou in vitro avec des cellules en culture.

Ce projet de recherche fondamentale se déroulera sur 5 ans et nécessitera 1092 souris. Ce nombre a été rationalisé à partir de statistiques de puissance.

Nous tendrons vers les objectifs préconisés de réduction du nombre d'animaux utilisés et du raffinement de la méthodologie utilisée de la manière suivante : (1) Le nombre d'animaux utilisés sera minimisé autant que possible grâce à l'étude de plusieurs paramètres chez le même animal. (2) Nous réduirons au minimum les techniques douloureuses ou stressantes. Les procédures décrites ci-dessus ont une durée courte (< 10 minutes) et seront effectuées sous anesthésie. Dans le cas de procédures expérimentales invasives avec réveil (procédures 4 et 5), les souris supportent en effet très bien ce type d'anesthésie et récupèrent rapidement de la chirurgie par la suite. Ceci est essentiel car cela permettra d'optimiser le nombre d'animaux opérés en réduisant au mieux le risque de mauvaise tolérance des procédures. De plus, nous utiliserons de l'analgésie avant chaque procédure chirurgicale de façon adaptée au poids de l'animal. Les animaux seront logés dans un environnement enrichi avec boisson et nourriture ad libitum et en cages collectives (5 souris par cage en fonction de la procédure). Chaque animal sera suivi tout au long de l'expérience, en particulier après les procédures chirurgicales, afin de détecter tout indicateur de souffrance et y pallier (désinfection de la zone opérée, application d'un anesthésique local).

19202 Toutes les espèces, des bactéries à l'homme, sont soumises aux variations journalières et saisonnières de l'environnement. L'intégration par l'organisme des variations journalières telles que l'intensité lumineuse est à l'origine de l'expression de rythmes biologiques d'une période proche de 24 heures (rythmes circadiens). Ces rythmes biologiques sont générés de façon endogène par une horloge centrale, localisée dans le cerveau et qui permet aux êtres vivants d'anticiper les changements environnementaux journaliers. Le fonctionnement autonome de cette horloge centrale repose sur l'expression de gènes appelés "gènes de l'horloge". L'activité de l'horloge centrale est synchronisée par la lumière environnementale par l'intermédiaire de la rétine et contrôle de nombreuses fonctions rythmiques (sécrétions hormonales, activité locomotrice, température, vigilance et le cycle veille/sommeil). En plus de son rôle synchronisateur de l'horloge centrale, la rétine contient également une horloge. De nombreuses pathologies rétinienne induisent une perte partielle de la vision. Ces pathologies sont caractérisées par la dégénérescence des photorécepteurs qui altèrent donc la vision mais conduisent également à une atteinte partielle ou totale de l'information lumineuse (les aveugles en représentant le cas extrême). Nous évaluerons les conséquences de l'absence spécifique d'un type de photorécepteurs sur le fonctionnement des horloges et leur réponse à la lumière en utilisant des modèles murins transgéniques, déficients en photorécepteurs. L'altération de la réception de l'information lumineuse chez ces modèles devrait conduire à des dysfonctionnements de nombreuses fonctions physiologiques des horloges de la rétine et centrale.

L'utilisation de l'animal est incontournable pour a) pouvoir analyser les processus moléculaires et cellulaires mis en jeu dans la régulation par la lumière des rythmes circadiens et b) d'accéder in vivo à la physiologie de l'organisme par une approche intégrée (comportement).

Conformément aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement, les animaux seront utilisés à minima, sans compromettre les objectifs du projet et tout en permettant une exploitation statistique des résultats. Les conditions d'hébergement et de soins utilisées seront appliquées dans

le respect du bien-être animal. Aucune souffrance animale n'est attendue dans les 2 procédures utilisées.

Démarches visant à satisfaire la règle des 3R Remplacement : Des approches in vitro et in vivo sont déjà réalisées au laboratoire. Cependant, l'utilisation de modèles complexes, i. e. d'animaux vivants, est incontournable afin d'analyser les effets de la lumière sur le fonctionnement des horloges biologiques.

Réduction : Pour réduire le nombre total d'animaux :

- Nous utilisons des approches non invasives (comportement) ne conduisant pas à la mise à mort de l'animal.
- Les animaux utilisés lors des approches non-invasives pourront être utilisés pour le prélèvement de tissus à différents temps circadiens
- Les animaux utilisés lors des approches non-invasives pourront être utilisés dans le cadre d'une procédure ex vivo.
- Plusieurs prélèvements de tissus sont réalisés chez le même animal.

Raffinement : Toutes les procédures utilisées sont de sévérité légère. Afin de réduire un éventuel stress, les souris ont à leurs dispositions des formes d'enrichissement : igloos en plastiques, bâtons de bois, fibres végétales de coton pour faire leur nidification. Une grille de score de la douleur sera utilisée, basée sur l'apparence, le comportement et les signes cliniques de l'animal.

Nous estimons que ce projet sur 5 ans et qui comporte 2 procédures nécessitera un total de 642 souris. Ce nombre est lié à l'utilisation de différentes lignées de souris déficientes en photorécepteurs et/ou en gènes de l'horloge.

Mots clés : horloge, circadien, photorécepteurs, lumière

19203 La leucémie aiguë myéloïde (LAM) est une forme de cancer qui touche les cellules de la moelle osseuse, qui produisent normalement les globules rouges, les plaquettes et les globules blancs. Dans la LAM, les cellules à l'origine des globules blancs prolifèrent de façon anarchique, sans "mûrir" (sans se différencier). L'accumulation de ces cellules "immatures" (que l'on appelle cellules leucémiques, ou blastes) empêche la production normale des cellules sanguines, ce qui conduit notamment à une anémie (manque de globules rouges et baisse de l'hémoglobine) et une thrombocytopenie (baisse des plaquettes).

L'arsenal thérapeutique dont dispose le clinicien pour freiner le développement de la LAM reste, encore à ce jour, limité à l'utilisation de molécules de chimiothérapie qui ne permettent pas malheureusement d'éradiquer cette maladie. Bien que le traitement chimiothérapeutique conduise souvent à une rémission complète des patients, la majorité d'entre eux va progresser vers une LAM récidivante, réfractaire à toute nouvelle tentative chimiothérapeutique : le taux de survie globale des patients ne dépasse alors pas 35%. La prise en charge des LAM est donc un réel déficit de santé publique.

En plus de la chimiothérapie, la greffe allogénique de moelle osseuse, provenant d'un donneur compatible, est un traitement curatif majeur pour certains patients. Cette greffe est cruciale pour le traitement de certains patients, puisqu'elle permet d'induire une réponse bénéfique dite « du greffon contre la leucémie » (Graft Versus Leukemia, GVL) : après la greffe, les cellules immunitaires du donneur vont combattre les cellules leucémiques du patient. Cependant, bien qu'elle soit en général efficace, la greffe de moelle osseuse ne permet pas toujours de guérir un patient atteint de leucémie, et les mécanismes mis en jeu dans la réponse GVL sont peu caractérisés. Ainsi, une meilleure compréhension des mécanismes d'action de la réponse anti-leucémique GVL permettra d'identifier de nouvelles cibles modulant le système immunitaire pertinentes dans le traitement des LAM.

Ce projet repose sur la mise au point d'un modèle murin de GVL dans les LAM par injection de blastes leucémiques, suivie de lymphocytes T reconnaissant un antigène des blastes. Les souris ayant reçu cette double transplantation de blastes et de lymphocytes T survivent significativement plus longtemps que les souris contrôles sans lymphocytes T : nous avons ainsi validé la présence d'une réponse bénéfique GVL dans notre modèle préclinique de LAM.

Pour mener à bien notre projet, nous utiliserons deux modèles de souris permettant de reproduire le développement de la LAM (prolifération anarchique des cellules leucémiques dans la moelle osseuse et dans la circulation sanguine). Le premier modèle consistera à injecter des cellules leucémiques dérivées de la moelle osseuse de souris portant la translocation MLL-AF9 dans des souris immunocompétentes. Cette translocation est un événement mutationnel qui aboutit à la fusion des deux gènes MLL et AF9, et induit une leucémie. L'administration des cellules leucémiques se fera par voie intraveineuse (injection non douloureuse dans la veine de la queue de souris éveillée) à des souris adultes qui auront été préalablement irradiées. L'étape d'irradiation est indispensable et permet de « faire de la place » dans la moelle osseuse afin que les cellules leucémiques puissent s'y développer. Le second modèle consistera en l'injection par voie intraveineuse de cellules leucémiques humaines dans des souris immunodéficientes (souris dépourvues de système immunitaire et supportant la greffe de cellules humaines sans réaction de rejet). Dans nos deux modèles, une fois la leucémie validée, nous injecterons nos lymphocytes T en vue d'obtenir une réponse anti-leucémique GVL. Après un criblage à grande échelle, autrement dit l'étude de nombreux gènes potentiellement importants, nos deux modèles nous permettront d'identifier des gènes qui modulent la réponse GVL dans les LAM. Nous utiliserons également ces modèles pour tester de nouvelles molécules susceptibles d'améliorer l'efficacité de cette réponse GVL. Les molécules thérapeutiques seront administrées par voie intrapéritonéale, intraveineuses ou par gavage (injections non douloureuses chez des souris éveillées). Au terme de notre projet, les résultats obtenus devraient contribuer à l'amélioration des traitements proposés aux patients et réduire le risque de rechute post-allogreffe.

Tout au long de ce projet, nous veillerons à appliquer la règle des 3R (remplacement, réduction, raffinement).

Il n'existe actuellement aucun modèle *in vitro* (n'utilisant pas le modèle animal) pertinent pour l'étude des mécanismes d'action de la GVL dans le traitement des LAM. En effet, cela implique de nombreuses interactions notamment entre l'environnement de la moelle osseuse, les cellules leucémiques et les cellules immunitaires du donneur.

Nous nous attacherons à limiter au minimum le nombre de souris utilisées dans ce projet. Nous utiliserons des groupes de 5 ou 10 souris dépendant des expériences, nombres nécessaires pour obtenir une puissance statistique suffisante permettant de conclure à partir des résultats obtenus. Nous ferons en sorte de regrouper au maximum les conditions à tester afin de réduire au minimum le nombre d'animaux. Au total, 990 souris seront nécessaires sur les 5 ans que durera le projet. En effet, nous validerons tout d'abord les conditions d'injection avec 6 lots de 20 souris. Après un criblage à grande échelle nécessitant 3 lots de 50 souris, les deux modèles immunocompétents et immunodéficientes nous permettront d'identifier des gènes modulant la réponse GVL dans les LAM. Nous validerons individuellement les gènes cibles avec 12 lots de 20 souris. Enfin nous utiliserons également ces modèles pour caractériser la fonction biologique des cibles et tester de nouvelles molécules susceptibles d'améliorer l'efficacité de cette réponse GVL (au maximum 10 molécules). Les molécules thérapeutiques seront administrées par voie intrapéritonéale, intraveineuses ou par gavage (injections non douloureuses chez des souris éveillées) dans 12 lots de 20 souris immunocompétentes et 12 lots de 20 souris immunodéficientes.

Une attention toute particulière sera portée sur le bien-être des animaux par une surveillance journalière qui sera assurée par le personnel de l'animalerie, en complément à celle des expérimentateurs. Nous suivrons le développement des cellules leucémiques et l'effet des traitements par des prélèvements de sang (prélèvement dans la veine de la joue, non douloureux sur souris éveillée) ou directement au niveau du site de prolifération, c'est-à-dire au niveau de la moelle osseuse. Ce type de prélèvement sera réalisé sous anesthésie générale et suivi d'un traitement analgésique. Une grille d'évaluation des signes cliniques sera renseignée chaque semaine et les souris présentant une souffrance et/ou une douleur mise en évidence par une modification comportementale et/ou physique seront euthanasiées. L'ensemble des animaux inclus dans ce projet seront euthanasiés en fin de procédure (au plus tard 20 semaines après le début du protocole).

19204 Au cours d'une chirurgie, la fermeture d'une plaie ou d'incision se réalise généralement à l'aide d'une suture par un fil et une aiguille ou par l'application d'agrafes. Ces deux méthodes causent un dommage dans le tissu, ainsi qu'une réaction au corps étranger. En effet, suite à son application se déclenche une réaction inflammatoire qui sera résolue par la formation d'une cicatrice pouvant évoluer vers une cicatrice hypertrophique. Une cicatrice hypertrophique est une réponse excessive de la cicatrisation cutanée : la cicatrice s'épaissit, prend du relief et un aspect dur et cartonné. Elle peut être gênante si elle est située à une jointure, perturber les mouvements, et présenter un risque d'infection. Une alternative aux fils de sutures et agrafes sont les colles chirurgicales dont le but est de fermer les plaies et incisions de façon simple et sans léser l'organe. Les plus employées actuellement sont les colles acryliques qui agissent très rapidement (10-30 secondes) mais qui sont très toxiques et sont appliquées seulement sur tissu superficiel. De plus, elles sont très rigides et non dégradables.

Le développement de colles chirurgicales biocompatibles et biodégradables pour son application pendant la chirurgie de tissus tels que le foie ou les poumons, ainsi que pour l'adhésion des biomatériaux en médecine régénératrice représente l'un des défis actuels dans le domaine des biomatériaux. Le but final de ce projet est d'améliorer les résultats cliniques d'un grand nombre d'interventions chirurgicales.

L'objectif de cette étude est d'évaluer les propriétés adhésives de plusieurs formulations préparées avec des biomatériaux dans trois tissus différents : la peau, le foie et les poumons.

Cette question ne peut être entièrement abordée qu'in vivo car il n'existe pas de modèles alternatifs pour étudier l'adhésion dans les conditions physiologiques. En effet, un point critique qui rend difficile l'adhésion est la sécrétion en continu des fluides biologiques spécifiques de chaque tissu, ainsi que les contraintes physiques dues au mouvement libre du corps qui causent des forces de tension et torsion difficiles à mimer in vitro. De plus, la dégradation des biomatériaux est le résultat de plusieurs facteurs, telles que les conditions physico-chimiques du tissu ainsi que de l'action enzymatique et la réponse cellulaire ; en résumé, une réponse très complexe qui ne peut pas être simulée in vitro.

Afin d'évaluer la capacité d'adhésion des colles développées au laboratoire, 3 modèles seront utilisés dans ce projet: incisions sur la peau, sur le foie et sur le poumon.

Les animaux seront sous anesthésie générale et sous analgésie. Pour l'évaluation sur la peau, 6 incisions de la peau seront faites et sur chaque incision une formulation sera appliquée pour fermer la plaie. Pour l'évaluation sur les poumons et le foie, une incision sera faite, puis une formulation sera appliquée pour fermer la plaie. De plus, une formulation sera appliquée sur le tissu, puis un hydrogel sera posé pour évaluer son adhésion sur le tissu. Une prise de sang sous anesthésie avant euthanasie est prévue.

L'ensemble des expérimentations a été mis au point afin de respecter les exigences de la règle des 3R : remplacement, réduction et raffinement, pour une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal.

Dans le cadre d'une stratégie de remplacement, plusieurs études in vitro ont été réalisées pour sélectionner les prototypes les plus prometteurs.

Dans le but de réduire le nombre d'animaux, pour l'évaluation sur la peau et sur les poumons nous allons travailler avec le rat car cette espèce plus grande nous permet de faire plusieurs tests sur un même animal pour réduire ainsi le nombre d'animaux. Pour la procédure sur le foie nous avons choisi la souris car dans ce cas il n'y a pas d'avantage à utiliser des rats.

Les stratégies de raffinement prévues incluent l'anesthésie et l'analgésie des animaux pour réaliser les procédures et pour le prélèvement de sang, ainsi que l'administration d'antidouleurs après les procédures et avant euthanasie si besoin. Pour cela, l'évaluation de l'état des animaux à l'aide d'une grille de score est prévue tous les jours pendant la première semaine et ensuite tous les deux jours, avec des points limites définis pour chaque procédure. Selon le score observé, on prévoit l'administration d'anti-douleur ou l'euthanasie de l'animal. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (le milieu

est enrichi à l'aide de coton de nidification ou de bouts de bois). Les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être.

Dans la réalisation de ce projet, qui se dessine sur 5 ans, nous projetons d'utiliser un maximum de 346 rats et 250 souris selon le plan suivant : a) 96 rats pour l'évaluation sur la peau (8 formulations, 4 rats par formulation et temps d'euthanasie, 3 temps d'euthanasie) ; b) 250 rats pour l'évaluation dans les poumons (5 formulations, 10 rats par formulation et temps d'euthanasie, 5 temps d'euthanasie) ; c) 250 souris pour l'évaluation dans le foie (5 formulations, 10 animaux par formulation et temps d'euthanasie, 5 temps d'euthanasie). Pour les deux espèces, nous travaillerons avec des mâles jeunes adultes. Nous n'attendons pas de différences importantes dans les paramètres évalués liés au sexe et l'emploi d'un seul sexe permettra de réduire le nombre d'animaux.

Le nombre d'animaux par formulation et temps d'euthanasie a été calculé avec un test statistique de puissance. Aussi, plusieurs tissus peuvent être partagés avec nos collaborateurs dans le but de réduire le nombre d'animaux utilisés. Finalement, nous pourrions être amenés à utiliser moins de rats et souris si l'effet observé s'avère significatif au cours des premières expériences.

L'étude sera arrêtée si les manipulations initiales invalident l'hypothèse de travail. Les animaux seront tous euthanasiés aux temps établis (entre 24 h et 4 semaines après l'application de la formulation).

19205 Les Leucémies Aiguës Lymphoblastiques T (LAL-T) sont des cancers très agressifs. Ce sont des pathologies rares avec 200 nouveaux cas par an en France, mais les rechutes sont fréquentes et habituellement fatales justifiant la recherche de nouvelles cibles d'intervention thérapeutique. Ainsi, chez les enfants de 2 à 10 ans la fréquence de rechutes est de 70%.

Le présent projet d'expérimentation animale s'inscrit dans un projet de recherche plus large de caractérisation moléculaire de l'évolution des LAL-T de l'enfant en rechute. Les résistances aux traitements qui entraînent les rechutes découlent d'une hétérogénéité moléculaire et cellulaire de la leucémie au diagnostic et d'une adaptation de la cellule leucémique durant les traitements. Grâce à une analyse de séquençage à l'échelle de la cellule unique (technologie « Single cell ») nous espérons mettre évidence les différentes cellules leucémiques présentes au moment du diagnostic et à l'origine de la rechute. En parallèle nous établirons des souris "avatar" afin de conserver et amplifier ces cellules leucémiques in vivo. En effet du fait du jeune âge des patients les échantillons primaires sont très précieux. De plus ces cellules ne peuvent pas être maintenues dans des conditions classiques de culture in vitro. Le principe des souris "avatar" repose sur l'injection intraveineuse de cellules issues de prélèvements sanguins de patients leucémiques dans des souris immunodéficientes NSG. Les cellules greffées vont proliférer et coloniser le sang de la souris. Les cellules tumorales seront ensuite prélevées congelées et injectées dans plusieurs souris. Ce modèle murin va nous permettre d'amplifier et de créer une biobanque de clones leucémiques qui sera ensuite utilisée pour des expériences in vitro, mais également pour tester in vivo de nouvelles molécules à visée anti-leucémique. Pour satisfaire au raffinement, les animaux sont hébergés dans un milieu enrichi en portoirs ventilés avec un suivi journalier. Un dosage par prise de sang permettra de suivre le développement de la leucémie et d'empêcher toute souffrance animale inutile. Pour satisfaire à la réduction, nous utiliserons à la fois les souris mâles et femelles. En terme de remplacement, l'évaluation in vivo de nouveaux traitements ne se fera qu'avec des composés sélectionnés in vitro pour leur activité anti-leucémique et leur absence de toxicité sur des cellules non leucémiques. Nous utiliserons au total et au maximum 655 souris NSG produites au laboratoire.

19206 L'obésité s'accompagne de maladies chroniques du foie dont le stade ultime est le cancer du foie. Ces maladies du foie sont restées longtemps sous-estimées à cause de leur évolution silencieuse, sans aucun symptôme. Ces maladies sont associées au syndrome métabolique (obésité, diabète de type-2, hypertension, dyslipidémie). L'âge est aussi un facteur à risque de ces maladies.

L'organisation mondiale de la santé a recensé plus de 660 millions d'individus obèses à travers le monde. En France, plus de 50% de la population est en surpoids ou obèse. Ainsi, face à

l'augmentation de la prévalence de l'obésité et face à une population Française toujours plus âgée, ces maladies du foie sont devenues un important problème de santé publique.

Le spectre de ces maladies hépatiques (NAFLD : Non Alcoholic Fatty Liver Disease) va de la stéatose bénigne (foie gras), à la stéatohépatite (Non Alcoholic Steato Hepatitis: NASH) plus délétère car elle peut évoluer vers des stades plus graves comme la fibrose, la cirrhose et le dernier stade de ces complications : le cancer du foie.

Ainsi, au sein du foie, la mise en place de l'inflammation, l'apparition de désordres métaboliques et de la souffrance hépatique jouent des rôles importants dans le développement de ces maladies. De plus, il n'existe pas de traitements pharmacologiques efficaces de ces maladies du foie. Il est donc crucial de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans ces maladies hépatiques.

Dans la régulation des phénomènes induits par la souffrance d'un constituant particulier de la cellule appelé "reticulum endoplasmique" (stress du RE) :

la protéine BI-1 (Bax-Inhibitor-One) jouerait un rôle central au sein des cellules. Ces phénomènes induits par le stress du RE sont importants car ils conduisent à l'apparition et la progression de ces maladies. En effet, ils activent l'inflammation, favorisent la résistance à l'insuline, les désordres métaboliques (la stéatose hépatique) et la souffrance hépatique.

Nos résultats préliminaires indiquent que chez les patients obèses avec des maladies hépatiques (NAFLD) : l'expression de la protéine BI-1 diminue, conduisant à l'activation de ces voies de signalisation du stress du RE, particulièrement la protéine IRE1, et favorisant le développement des complications hépatiques.

L'objectif de ce projet est d'évaluer les rôles de BI-1 et d'IRE1a dans les complications hépatiques de l'obésité, et de tester les potentiels effets thérapeutiques d'inhibiteurs de la protéine IRE1 au cours de la stéatohépatite.

Nos expériences porteront sur :

1) L'étude de BI-1 et d'IRE1 sur le développement de l'insulino-résistance et de la stéatose hépatique induite par un régime dit gras (riche en graisses). Pour se faire, nous effectuerons des tests permettant de mesurer la réponse au glucose (Test de tolérance au glucose, GTT) et à l'insuline (test de tolérance à l'insuline, ITT). La souffrance du foie sera révélée grâce à la quantification des transaminases dans le sang. Nous étudierons les conséquences de traitements avec les inhibiteurs de l'activité RNase d'IRE1a, sur l'amélioration de ces paramètres. Après sacrifice, nous analyserons les voies moléculaires impliquées du stress du RE et de l'inflammation au niveau du foie et au niveau du tissu adipeux.

2) L'étude in vitro du rôle de BI-1 et du stress du RE sur les fonctions des cellules du foie (hépatocytes) et des autres cellules du foie (cellules de l'inflammation). Ces cellules seront purifiées à partir de souris sauvages et BI-1 KO (mâles). Nous analyserons in vitro la réponse de ces cellules (mesure de la viabilité cellulaire, de la mort cellulaire, du métabolisme, analyses génique et protéique, etc) en réponse à des stimulations mimant les conditions in vivo associées à l'obésité (lipides ; produits bactériens e. g. LPS ; cytokines...).

Pour satisfaire au remplacement, nous avons réalisé des études préliminaires in vitro sur des lignées cellulaires. Ces études seront poursuivies systématiquement. Cependant, il nous est nécessaire de réaliser des études in vivo car les études in vitro ne permettent pas de reproduire les interactions complexes qui existent entre les différents organes et entre les différents types cellulaires. En effet, ces maladies du foie peuvent être la conséquence de dysfonctionnements intra-hépatique, mais également extra-hépatiques (le tissu adipeux, l'intestin, le pancréas) qui peuvent jouer un rôle important dans le développement des complications hépatiques. Différents types cellulaires peuvent aussi être affectés (les cellules du foie et les cellules du système immunitaire).

Pour satisfaire à la réduction, nous utiliserons un nombre d'animaux aussi faible que possible. L'application de tests statistiques nous permettra de réduire le nombre d'animaux au minimum nécessaire à l'obtention de résultats exploitables. Nous prévoyons d'utiliser 540 souris sauvages et KO pour BI-1 C57BL/6 sur une période de 5 ans.

Pour satisfaire au raffinement, nous serons particulièrement attentifs à tout changement physique ou de comportement. Leur bien-être sera scrupuleusement pris en compte dans toutes les procédures en termes de conditions d'élevage (température, hygrométrie), d'hébergement avec présence de tige en coton et d'igloo dans les cages. Le suivi sanitaire quotidien assuré par les animaliers auquel s'ajoutent les visites régulières des expérimentateurs (au moins une fois par semaine en fonction des procédures) nous permettra de détecter précocement tout signe de stress ou de douleur et d'appliquer les points limites que nous avons définis pour chaque procédure.

19207 Selon l'Institut national du cancer, les métastases sont responsables de 90% des décès par cancer. Pour étudier le pouvoir métastatique d'une lignée cellulaire et envisager des approches thérapeutiques ciblant le processus métastatique et les métastases, nous souhaitons mettre au point, chez la souris, un modèle basé sur l'injection intra-cardiaque de cellules cancéreuses. Les cellules injectées sont directement prises en charge par la circulation sanguine mimant ainsi la dissémination des cellules dans le processus de formation des métastases. Le suivi du devenir des cellules est réalisée par imagerie optique qui est une technique permettant de faire un suivi dans le temps sur un même animal. L'objectif de ce projet est de montrer que notre modèle permet de mimer le processus métastatique. Nous souhaitons comparer le pouvoir métastatique de différentes lignées cellulaires cancéreuses issues de cancers connus pour générer des métastases chez le patient (cancer du sein, de la prostate et de l'estomac). Nous envisageons d'utiliser 756 animaux sur 5 ans pour la totalité du projet.

REMPACEMENT : nous souhaitons connaître le pouvoir métastatique de lignées cancéreuses et vérifier si le modèle animal établi permet de répondre à cette question. Nous souhaitons également vérifier si les cellules vont se nicher dans les sites de prédilection des métastases chez l'homme. Nous ne pouvons pas répondre à ces objectifs sans mener les expériences sur les animaux.

REDUCTION : l'utilisation de l'imagerie optique permet de faire un suivi dans le temps sur un même animal, ce qui réduit le nombre d'animaux au final.

RAFFINEMENT : Les lieux d'hébergement et d'expérimentation sont différents. Le transfert des animaux d'un lieu à l'autre se fera dans une cage de transport dédiée munie d'un couvercle filtrant. Le trajet dure quelques minutes. Les souris sont hébergées en groupes sociaux avec un enrichissement du milieu (maison en carton, coton). Toutes les procédures sont réalisées sur animal anesthésié et lors de l'anesthésie les animaux sont placés sur un tapis chauffant pour éviter l'hypothermie. Les animaux sont suivis par l'expérimentateur (pesée, aspect de l'animal) et des soins sont mis en place en cas de mal être.

19208 La maladie d'Alzheimer est la forme de démence la plus fréquente, on compte actuellement 900 000 cas en France. C'est une maladie neurodégénérative caractérisée par une diminution progressive de la mémoire et une détérioration des fonctions cognitives. L'accumulation de protéines anormales dans le cerveau qui conduisent à la perte des neurones caractérise cette pathologie. La cause principale de la majorité des cas sporadiques est inconnue. Moins de 2 % des cas ont un fond génétique, causés par une mutation dans un ou plusieurs gènes. Ils sont héréditaires et sont connus sous le nom de maladie d'Alzheimer familiale. Les caractéristiques pathologiques sont similaires à ceux de la forme sporadique.

Les interventions thérapeutiques, pour être efficaces, doivent être réalisées dès les premiers signes de la maladie. L'un de ces signes précoces est un rythme anormal du cerveau qui se présente sous la forme d'une hyperactivité de l'hippocampe (zone impliquée dans la mémorisation) et provoquent des crises légères de type épileptique.

Différentes études ont montré que cette hyperactivité dans l'hippocampe chez les patients alzheimer est causée par un déséquilibre dans le fonctionnement des neurones, plus précisément par l'activité d'une protéine particulière, Nav1. 1. Cette protéine est essentielle pour la propagation de l'influx nerveux qui permet aux neurones d'envoyer des informations à d'autres neurones. Le gène codant cette protéine (SCN1A) est un gène associé à l'épilepsie

Notre objectif est de prévenir, d'arrêter ou d'inverser la pathologie associée à la maladie d'Alzheimer par un transfert de gènes dans le cerveau pour augmenter l'activité de cette protéine. Il a été démontré, grâce à la thérapie cellulaire, que la transplantation de cellules produisant Nav1. 1 était suffisante pour modifier les anomalies de comportement dans un modèle souris alzheimer. Mais la thérapie cellulaire est complexe, et c'est pourquoi nous proposons d'augmenter l'expression de la protéine en utilisant la thérapie génique pour délivrer le gène d'intérêt aux neurones et rétablir une activité normale dans le cerveau. Nous utiliserons des vecteurs viraux qui ont démontré leur potentiel pour traiter certaines maladies neurodégénératives chez les souris et les chiens. Pour le volet "remplacement" Nous testerons d'abord l'efficacité de l'infection des neurones et l'activité de la protéine sur des cellules en culture puis nous testerons les vecteurs sur des modèles animaux alzheimer pour vérifier si les réseaux neuronaux sont impactés et modifient le comportement des souris. Bien que la valeur translationnelle des modèles rongeurs en neurosciences soit loin d'être parfaite, ils se sont avérés être essentiels dans le développement de nouvelles thérapies pour de nombreuses maladies neurodégénératives humaines et pour comprendre le fonctionnement du cerveau des mammifères. Les modèles génétiques sont capables de reproduire certaines des caractéristiques neuropathologiques de la maladie d'Alzheimer, mais pour l'instant il n'est pas possible de reproduire toutes les caractéristiques importantes dans un seul modèle de rongeur, et c'est la raison pour laquelle nous utiliserons deux souches de souris différentes dans le présent projet : J20 et 5xFAD. Chacune d'entre elles présente certaines des caractéristiques de la maladie d'Alzheimer et montre les traits pathologiques l'un à un stade précoce, l'autre à un stade plus tardif. Nous utiliserons 240 souris des 2 sexes. Pour le volet "réduction" , nous avons fait une analyse bibliographique poussée afin de définir les expériences à réaliser et nous avons mené une longue réflexion avec notre statisticien pour définir au mieux le nombre d'animaux nécessaire à la réalisation de ce projet et réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. La maladie d'Alzheimer affecte différemment les femmes et les hommes. Pour cette raison, nous voulons utiliser des femelles et des mâles dans notre étude. Pour le volet "raffinement", nous portons une attention toute particulière au bien-être des animaux. Les animaux sont hébergés dans un milieu enrichi avec des copeaux et des feuilles de papier absorbant. La surveillance des animaux est journalière afin d'évaluer le bien être de l'animal. Les points limites sont établis pour chaque expérimentation.

19209 Les ulcères gastriques sont une maladie courante chez les chevaux : ils concernent jusqu'à plus de 80 % des individus dans des populations à risques, comme chez les chevaux à l'entraînement. Il s'agit d'érosions de la muqueuse de l'estomac qui peuvent entraîner des douleurs, une modification du comportement et des baisses de performance. Le repas distribué avant l'entraînement a un effet direct sur la protection de la muqueuse gastrique, ou au contraire sur l'apparition d'ulcères. C'est pourquoi l'objectif premier de ce projet est de mesurer des paramètres de l'écosystème gastrique après la consommation d'un aliment formulé spécifiquement pour prévenir l'incidence des ulcères gastriques chez les chevaux. Cet aliment est comparé à deux autres aliments témoins. En parallèle, ce projet a également pour objectif de déterminer le laps de temps optimal entre la consommation du repas et le début de l'entraînement pour que l'écosystème joue un rôle protecteur pour la santé gastrique.

Un maximum de dix chevaux sera utilisé dans ce projet : au maximum quatre pour une phase de mise au point, puis six dans la phase expérimentale en elle-même.

Une première phase de mise au point permettra de déterminer les deux temps optimaux d'observation et de prélèvement de contenu gastrique, et de mettre au point la méthode d'observation du contenu. Jusqu'à quatre chevaux pourront être inclus dans cette phase afin de réaliser deux observations du bol alimentaire par animal. La première semaine deux chevaux seront nourris avec l'aliment à tester et le contenu de leur estomac sera observé à deux temps post-prandiaux. Si ces observations correspondent à ce qui est attendu dans l'étude, alors ces deux temps seront ceux utilisés pour le reste de l'étude, sinon ce test sera de nouveau réalisé sur deux autres chevaux en adaptant les temps d'observation. Les temps post-prandiaux testés sont déterminés grâce à l'expérience de l'équipe dans ce domaine. Si le premier test est concluant, deux

chevaux seulement seront utilisés, ce qui permet de réduire le nombre d'animaux impliqués dans le projet.

Dans la phase expérimentale à proprement parler, six hongres Trotteurs Français adultes sont répartis en trois paires. L'étude est composée de trois périodes de deux semaines. Dans le schéma expérimental utilisé, chaque cheval est son propre témoin puisque chaque paire teste les trois aliments dans un ordre différent. Ce dispositif permet d'utiliser un nombre minimal d'animaux tout en ayant la puissance statistique nécessaire à l'étude. En effet, les chevaux sont conduits en conditions contrôlées et uniformes afin de minimiser les variations liées à l'environnement. Cela permet de répondre au principe de réduction du nombre d'individus utilisés. Il n'existe pas encore de modèle permettant d'observer l'évolution du contenu gastrique du cheval en mimant les entrées et sorties d'aliments dans l'estomac. Il n'est donc pas possible de remplacer l'utilisation d'animaux vivants dans cette étude. Un prélèvement de contenu gastrique avec observation de l'estomac a lieu chaque semaine, pendant six semaines, pour mesurer les paramètres de l'écosystème gastrique étudiés dans le projet. Les prélèvements ont lieu à deux temps post-prandiaux pour chaque aliment ce qui justifie les six prélèvements par chevaux (3 aliments x 2 temps). Dans le cas où un prélèvement n'aurait pas été possible, l'essai pourra être prolongé d'une semaine pour l'animal concerné (soit une durée totale de l'étude de sept semaines pour cet individu). Un prélèvement supplémentaire sera réalisé sur cet animal, ceci afin d'obtenir des résultats exploitables et de ne pas avoir à répéter les manipulations sur un plus grand nombre d'individus.

Dans une optique de raffinement, les chevaux sont manipulés dans un travail adapté à leur contention pour éviter tout risque de blessure, et si nécessaire une tranquillisation est administrée. La durée de la procédure est limitée à une demi-heure et le comportement des chevaux est surveillé durant celle-ci. De plus, durant toute la durée du projet, les chevaux vont au paddock en groupe. Ceci permet de respecter leur bien-être. Au quotidien, le personnel animalier observe le comportement de chaque animal matin et soir au moment de la distribution des repas afin de repérer les signes de mal-être ou de souffrance. Ces signes inhabituels sont immédiatement signalés au responsable de l'expérimentation. Les chevaux qui présenteraient des signes de mal-être ou de souffrance seront soignés et si jugés nécessaire par le vétérinaire traitant retirés de l'essai.

19210 Avec le vieillissement de la population, la maladie d'Alzheimer touche de plus en plus de personnes et aucun traitement efficace n'est connu à ce jour. La découverte de nouveaux traitements repose en grande partie sur une meilleure connaissance des facteurs cellulaires et moléculaires mis en jeu dans le déclenchement et la progression de la maladie ainsi que des mécanismes endogènes qui contribuent à prévenir ou ralentir les effets délétères de ces facteurs.

Tout au long de leur vie, nos cellules, incluant nos neurones, sont soumises à des stress cellulaires. Leur capacité à réagir à ce stress est déterminante pour leur fonctionnement et leur survie. La protéine de réponse au stress TP53INP1 agit comme un double régulateur : elle limite la prolifération cellulaire et induit la mort des cellules anormales d'une part, et présente une action anti-oxydante notamment en éliminant les mitochondries dysfonctionnelles productrices d'espèces réactives de l'oxygène. Une déficience en TP53INP1 a été liée au cancer et au syndrome métabolique (obésité, diabète) par des mécanismes communs aux maladies neurodégénératives. Cependant, son implication dans les maladies neurodégénératives reste largement inexplorée. Or le gène codant cette protéine a récemment été identifié comme un gène de susceptibilité pour la maladie d'Alzheimer partagé avec le diabète de type 2, lequel a été associé à un risque accru de développer la maladie d'Alzheimer.

L'objectif de ce projet de recherche est donc de déterminer si des souris génétiquement modifiées rendues incapables de produire TP53INP1 développent des altérations cognitives et des marqueurs biochimiques de la maladie d'Alzheimer plus marqués ou de façon plus précoce que les souris contrôles, dans un modèle de la forme sporadique de la maladie en lien avec le diabète.

Ce projet respectera au plus près la règle des 3R. Le remplacement des expérimentations sur l'animal entier est difficile puisque nous étudions le cerveau dans son fonctionnement global et qu'aucun modèle de substitution in vitro n'est disponible à ce jour pour répondre aux questions posées. La réduction est optimisée en couplant différentes approches, comportementales,

biochimiques et histologiques sur la même série d'animaux. Le raffinement est une préoccupation permanente, tant au niveau des conditions d'élevages (maintien en groupe social et enrichissement avec nids de coton, dômes, bâtonnets de bois en alternance) que de la gestion d'éventuelles souffrances lors des procédures expérimentales (suivi clinique quotidien avec une échelle de scores, administration d'antalgiques au besoin, détermination de points limites avec arrêt des procédures). Tous les personnels du projet en charge des interventions réalisées sur les animaux sont qualifiés (changes, suivi et soins, chirurgies, manipulations).

Au total, un nombre de 128 souris sera utilisé dans ce projet qui vise à accroître nos connaissances sur les aspects fondamentaux de la maladie d'Alzheimer.

19211 Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est classé comme le sixième cancer le plus fréquent et la troisième cause de décès par cancer.

Le développement du carcinome hépatocellulaire est étroitement lié à la présence de la maladie du foie gras non alcoolique appelée « stéato-hépatite non alcoolique » ou NASH en anglais. Cette maladie est caractérisée par une inflammation chronique du foie conduisant à une mauvaise cicatrisation appelée fibrose dont le stade ultime est la cirrhose. :

Or, la réponse inflammatoire des cellules immunitaires est amplifiée par triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1).

L'inhibition de TREM-1 dans un modèle murin de NASH diminue l'inflammation du foie et restaure les capacités de « recyclage » cellulaire. Ces résultats sont confirmés chez les souris génétiquement invalidées pour le gène TREM-1. Néanmoins, les limites de ces modèles animaux de NASH sont l'absence d'évolution vers la cirrhose et le CHC.

Afin d'évaluer à terme l'inhibition de TREM-1 dans le CHC, il nous faut d'abord développer un modèle de NASH évoluant jusqu'au stade CHC. Le modèle de souris C57BL/6 traitées par streptozotocine et soumises à un régime riche en graisse a l'avantage d'induire une véritable NASH avec toutes les composantes évolutives : excès de graisse semaine 6 (S6) ; NASH avec fibrose sévère à S8-10 et CHC entre S16-S20. Ces CHC sont constants et sont très proches des CHC humains sur le plan moléculaire. Dans ce projet, l'objectif est de mettre au point ce modèle, d'en caractériser les évolutions par imagerie IRM et Scanner et d'en adapter la résolution de façon à disposer des outils de suivi dans les futurs projets.

1. Remplacement : Il n'existe aucune approche in vitro pour étudier l'évolution d'une pathologie inflammatoire multifactorielle comme la stéato-hépatite non alcoolique vers la fibrose sévère et le carcinome hépatocellulaire. Une étude chez un organisme vivant est indispensable.

2. Réduction : L'étude sera menée avec un nombre total de 71 souris jeunes adultes mâles et femelles, basé sur le calcul a priori du nombre de souris nécessaires tenant compte de la variabilité interindividuelle, ainsi que de l'effet du genre, sur l'évolution de la pathologie hépatique.

3. Raffinement : Dès leur réception, les animaux auront une période d'acclimatation d'une semaine pour s'adapter à leur nouvel environnement. Ils seront hébergés dans une animalerie dotée de tous les paramètres nécessaires (température, hygrométrie, filtration de l'air, ...) à leur bien-être. La NASH sera induite (procédure 1) par une injection sous-cutanée unique de streptozotocine associée à un régime riche en graisse. La streptozotocine est un antibiotique connu pour déclencher, si administrée à l'âge de 2 jours, une résistance à l'insuline ; ce désordre métabolique sera amplifié par le régime riche en graisse administré à partir de la 4^e semaine de vie, conduisant à la NASH. Les stades de la maladie seront évalués de manière non invasive par imagerie (procédures 2 et 3) Scanner avec injection de produits de contrastes et IRM.

4. Le point limite est basé sur l'observation clinique des animaux et l'identification d'une dénutrition sévère attestée par une perte de 25% du dernier poids de référence (C'est-à-dire le dernier poids stable ou à la hausse pendant une semaine). Des signes de mal-être définis au préalable par notre vétérinaire référent (isolement, yeux fermés, dos voûté, poils hérissés, immobilité, yeux et abdomen creux, perte des réflexes de fuite) conduiront à une prise en charge de type nursing (modification des enrichissements, facilitation d'accès à la nourriture).

5. En fin de protocole, une injection intrapéritonéale de bromodéoxyuridine (procédure 4, marqueur non toxique pour évaluer la prolifération des cellules hépatiques) sera réalisée 2 à 6 heures avant la mise à mort nécessaire pour les prélèvements d'organes et les analyses biochimiques et immunopathologiques.

19212 L'exercice excentrique permettrait de développer un meilleur rapport force musculaire / coût énergétique que l'exercice concentrique. Cette modalité d'exercice est de choix pour les patients présentant une diminution de la fonction musculaire observée dans les pathologies chroniques et / ou le vieillissement. Le vieillissement musculaire aussi appelée sarcopénie est aggravé par une carence en nutriments, telle que la vitamine D ou par la résistance aux protéines anaboliques.

L'objectif du projet est de tester l'effet d'un entraînement à dominante excentrique versus concentrique en association avec un régime nutritionnel standard ou enrichi en vitamine D (VitD) et protéines de lactosérum pour limiter l'altération la fonction musculaire due à l'âge.

À cette fin, nous utiliserons 72 souris âgées de 60 semaines (C57BL6) déplétées 1 mois en vitamine D. Ces 72 souris seront réparties en 6 groupes de 12 :

Gr CTL : régime standard, pas d'exercices imposés

Gr CX : régime standard, entraînement concentrique

Gr EX : régime standard, entraînement excentrique

Gr D-PROT-CTL : régime enrichi en vitD + protéines, pas d'exercices imposés

Gr D-PROT-CX : régime enrichi en vitD + protéines, entraînement concentrique

Gr D-PROT-EX : régime enrichi en vitD + protéines, entraînement excentrique

Les protocoles d'entraînement sur dérouleront sur un tapis roulant qui dans le cas des groupes en entraînement excentrique sera incliné pour simuler la course en descente ce qui sollicite des contractions excentriques du triceps brachialis et du vastus medialis.

Nous évaluerons de manière longitudinale le développement de la force musculaire à l'aide du test d'agrippement, la coordination motrice à l'aide d'un analyseur de marche et les capacités physiques par des tests de VMA sur tapis et mesure de la VO₂ max. La mesure de la composition corporelle sera effectuée par EchoMRi et la dépense énergétique dans une chambre calorimétrique. Des dosages par microtechniques (prélèvement dans la veine de la queue) permettront de mesurer, les taux de glucose, triglycérides, HDL et LDL cholestérol, de lactate et l'activité de la créatine kinase (reflet des lésions musculaires). Après sacrifice, la fonction mitochondriale, la consommation de substrat énergétique et la synthèse des protéines seront respectivement évaluées au niveau musculaire par oxygraphie et la méthode du traceur après injection d'isotopes stables. Le typage des fibres musculaires sera réalisé par immunohistologie. L'ensemble du projet comporte 13 procédures dont le degré de gravité est léger. Un maximum de mesures seront prises afin de respecter la règle des 3R (raffiner, réduire et remplacer). Ainsi le nombre d'animaux par groupe est réduit à son minimum tout en permettant d'effectuer des statistiques fiables avec une puissance suffisante. Des points limites précis sont proposés pour réduire la souffrance des animaux s'il y a lieu. Les paramètres mesurés (locomotion, force...) et les protocoles d'activité physique détaillés dans ce projet ne permettent pas l'utilisation d'un modèle cellulaire.

19213 Contexte scientifique, médical et social du projet

Le surmulot (*Rattus norvegicus*) est une espèce abondante qui peut proliférer localement en milieu urbain. Les risques de transmission de maladies à l'homme et les dommages aux infrastructures sont directement liés à ces « explosions démographiques », qui conduisent à une régulation de ses effectifs. Toutefois, peu de connaissances sont disponibles concernant les variations de la taille de ses populations, sa reproduction, et les risques sanitaires ou économiques qui dépendent étroitement de sa biologie.

Objectifs du projet

Le présent projet a pour but la détermination de la variation saisonnière des abondances des surmulots, de leur organisation en populations à différentes échelles spatiales et la présence

d'agents pathogènes potentiellement transmissibles aux humains dans différents types d'habitats urbains végétalisés (espaces verts, parcs et jardins boisés) ou bâtis. La finalité du projet est de répondre à des questions biologiques basiques: combien sont-ils ? Se reproduisent-ils saisonnièrement ? Comment se déplacent-ils et sur quelles distances ? Comment se composent et se répartissent leurs colonies ? À quel âge et à quels taux sont-ils éventuellement porteurs de pathogènes transmissibles à l'homme ? Les réponses à ces questions permettront d'éclairer un cadre de gestion raisonnée de cette espèce commensale en évaluant au plus près les risques sanitaires possibles, enjeu majeur économique et social dans de grandes agglomérations.

Balance dommages/bénéfices

Nous prévoyons de capturer, de marquer et de soumettre à une procédure légère 435 surmulots sur 2 ans, permettant de collecter des données sur les densités des populations, l'état physique et sanitaire des individus et leurs déplacements. Quatre cents individus seront euthanasiés, afin d'identifier les agents pathogènes qui se concentrent dans les organes et dont l'excrétion par les voies naturelles (urine, sécrétions des muqueuses nasales, buccales, ...) ou la présence dans le sang est rare ou aléatoire au moment des examens des individus vivants.

Application du principe des 3R

Remplacement : l'étude porte sur la biologie des populations du surmulot « à l'état sauvage » dans un environnement urbain (densité, saisonnalité de la reproduction, utilisation de l'espace, génétique des populations), ainsi que la fréquence de son portage d'agents pathogènes transmissibles aux humains. Dès lors, l'utilisation d'animaux capturés vivants dans leur environnement ne peut être remplacée ni par d'autres modèles non animaux, ni par des cultures cellulaires ou des simulations informatiques.

Réduction : La taille de l'échantillon (400) nécessaire et suffisante pour conduire les recherches sanitaires a été calculée sur la base d'une analyse de puissance afin de garantir une détection optimale des agents pathogènes portés avec une prévalence d'au moins 1% par leurs hôtes et dont le risque sanitaire pour l'homme est élevé. Sur la base des connaissances de la biologie des populations du surmulot en milieu urbain, le nombre de sites (6) et la temporalité des piégeages (3 saisons) ont été choisis afin de réduire au minimum le piégeage tout en gardant l'objectif de disposer d'informations interprétables sur la variation saisonnière de la prévalence des pathogènes. Des simulations de capture ont été réalisées permettant de définir un dispositif de piégeage (nombre de pièges par site, durée du piégeage) nécessaire et suffisant afin de disposer du nombre minimum d'animaux requis pour atteindre l'objectif de suivi sanitaire et de connaissance de la distribution spatiale et temporelles des densités de population dans des habitats végétalisés urbains.

Raffinement : Nous avons envisagé un piégeage adapté à la capture des rats nocturnes en milieu urbain pour limiter au maximum les risques de stress et de souffrance en prenant en compte particulièrement : i) un modèle de piège grillagé (agréé non vulnérant) et aéré dont le mode de fermeture limite les risques de blessure, ii) un aménagement spécifique des pièges (paillage, aliments) et iii) la réduction de la durée de captivité, ainsi que des risques de perturbations accidentelles (météorologique, dérangement). La manipulation des individus par des opérateurs expérimentés avec des gestes rapides permet d'achever l'ensemble des manipulations en moins de 10 minutes. Pour des individus agressifs témoignant d'un stress à la capture, une sédation sera appliquée. Les individus ne réagissant pas à la tranquillisation seront relâchés. Toutes les dispositions seront prises afin de limiter les risques sanitaires entre opérateurs et animaux (protection des opérateurs et hygiène du matériel employé à chaque manipulation sur les différents sites).

19214 Il n'y a pas une mais des épilepsies, environ 50 syndromes épileptiques différents recensés. Ensemble, ils constituent la troisième maladie neurologique la plus fréquente, derrière la migraine et les démences. Plus particulièrement, ces syndromes touchent 600 000 personnes en France dont la moitié sont des enfants. L'épilepsie est associée à des crises avec convulsions, absences, rigidité musculaire... Mais chaque syndrome épileptique peut se manifester par une grande variété de symptômes et être accompagné de troubles de l'humeur, de la cognition, du sommeil. Chacun

est en outre associé à une évolution qui lui est propre. La complexité de ces maladies motive une forte dynamique de recherche, aussi bien expérimentale que clinique car un tiers des crises épileptiques ne répondent pas aux traitements disponibles. Afin d'améliorer les options thérapeutiques, il est indispensable de trouver de nouvelles approches fondées sur la compréhension fine et exhaustive des mécanismes à l'origine de la maladie. Ces études restent cependant limitées chez l'Homme car le système nerveux en général reste un organe difficilement accessible, dont le prélèvement d'échantillon est complexe et dangereux pour le sujet. D'autre part, les modèles de cultures cellulaires ne permettent pas de refléter clairement l'atteinte d'une aire cérébrale. En conséquence, l'utilisation de modèles animaux appropriés se retrouve essentielle et ne peut être remplacée. Les chercheurs ont donc développé des modèles précliniques chez la souris et le rat, permettant simultanément d'évaluer l'effet de traitements à la fois sur la disparition des symptômes et la limitation de leurs potentiels effets secondaires sur les autres organes.

L'objectif du présent projet est de maintenir en élevage et de produire des lots expérimentaux de souris et de rats génétiquement altérés, modèles précliniques de syndromes épileptiques. Les animaux générés dans ce projet seront destinés à affiner la caractérisation d'un modèle ou serviront à l'étude de traitements contre ces pathologies.

Afin de satisfaire au raffinement, l'hébergement des animaux sera réalisé dans des locaux adaptés, avec un enrichissement systématique des cages (bâtons de bois à ronger et matériel de nidification) et un personnel habilité qui réalisera les différentes procédures en respectant les règles d'éthiques, le bien-être animal et le principe des 3R. Nos surveillances quotidiennes nous permettront d'identifier d'éventuels animaux en souffrance et de prendre les mesures nécessaires (surveillance accrue, mise à mort dans les cas les plus graves selon une méthode recommandée par la réglementation et approuvée par le comité d'éthique et la Structure Bien-être Animal).

Pour pouvoir constituer les lots requis pour ces études, nous estimons qu'est nécessaire sur 5 années de recherche un total de 8186 animaux sur notre site 2 dont 2047 qui devraient être homozygotes et donc présenter un phénotype modéré. Ces quantités comprennent les animaux nécessaires au maintien de la lignée et ont été calculées de manière à produire le nombre d'animaux requis pour les expériences et études prévues. Dans un souci constant d'appliquer la règle des 3R, notre savoir-faire et l'optimisation de nos protocoles permettront d'utiliser peu d'animaux avec la garantie d'un rendement maximum.

19215 Il n'y a pas une mais des épilepsies, environ 50 syndromes épileptiques différents recensés. Ensemble, ils constituent la troisième maladie neurologique la plus fréquente, derrière la migraine et les démences. Plus particulièrement, ces syndromes touchent 600 000 personnes en France dont la moitié sont des enfants. L'épilepsie est associée à des crises avec convulsions, absences, rigidité musculaire... Mais chaque syndrome épileptique peut se manifester par une grande variété de symptômes et être accompagné de troubles de l'humeur, de la cognition, du sommeil. Chacun est en outre associé à une évolution qui lui est propre. La complexité de ces maladies motive une forte dynamique de recherche, aussi bien expérimentale que clinique car un tiers des crises épileptiques ne répondent pas aux traitements disponibles. Afin d'améliorer les options thérapeutiques, il est indispensable de trouver de nouvelles approches fondées sur la compréhension fine et exhaustive des mécanismes à l'origine de la maladie. Ces études restent cependant limitées chez l'Homme car le système nerveux en général reste un organe difficilement accessible, dont le prélèvement d'échantillon est complexe et dangereux pour le sujet. D'autre part, les modèles de cultures cellulaires ne permettent pas de refléter clairement l'atteinte d'une aire cérébrale. En conséquence, l'utilisation de modèles animaux appropriés se retrouve essentielle et ne peut être remplacée. Les chercheurs ont donc développé des modèles précliniques chez la souris et le rat, permettant simultanément d'évaluer l'effet de traitements à la fois sur la disparition des symptômes et la limitation de leurs potentiels effets secondaires sur les autres organes.

L'objectif du présent projet est de maintenir en élevage et de produire des lots expérimentaux de souris et de rats génétiquement altérés, modèles précliniques de syndromes épileptiques. Les animaux générés dans ce projet seront destinés à affiner la caractérisation d'un modèle ou serviront à l'étude de traitements contre ces pathologies.

Afin de satisfaire au raffinement, l'hébergement des animaux sera réalisé dans des locaux adaptés, avec un enrichissement systématique des cages (bâtons de bois à ronger et matériel de nidification) et un personnel habilité qui réalisera les différentes procédures en respectant les règles d'éthiques, le bien-être animal et le principe des 3R. Nos surveillances quotidiennes nous permettront d'identifier d'éventuels animaux en souffrance et de prendre les mesures nécessaires (surveillance accrue, mise à mort dans les cas les plus graves selon une méthode recommandée par la réglementation et approuvée par le comité d'éthique et la Structure Bien-être Animal).

Pour pouvoir constituer les lots requis pour ces études, nous estimons qu'est nécessaire sur 5 années de recherche un total de 6050 animaux sur notre site 1 : 50 rats dont 13 avec un phénotype modéré et 6000 embryons de souris dont 1500 avec un phénotype sévères. Ces quantités comprennent les animaux nécessaires au maintien de la lignée et ont été calculées de manière à produire le nombre d'animaux requis pour les expériences et études prévues. Dans un souci constant d'appliquer la règle des 3R, notre savoir-faire et l'optimisation de nos protocoles permettront d'utiliser peu d'animaux avec la garantie d'un rendement maximum.

19216 La maladie de Parkinson est une maladie neuro-dégénérative qui se caractérise par la disparition des neurones dopaminergiques qui sont notamment impliqués dans le contrôle des mouvements. L'approche pharmacothérapeutique de la maladie de Parkinson se limite pour l'instant au traitement symptomatologique de la maladie. Ainsi, aucun traitement n'a encore été mis au point pour traiter les causes de la maladie et apporter une neuroprotection efficace afin d'en limiter sa progression. Dans une telle situation, la transplantation intra-cérébrale de cellules souches capables de prendre le relais des cellules dopaminergiques détruites connaît de plus en plus d'intérêt. La réussite de ces transplantations réside dans la survie des cellules transplantées dans le cerveau du patient et représente une limitation sérieuse de cette approche. L'objectif du projet est d'évaluer comment l'exposition des cellules et du sujet transplanté à un dispositif de photobiomodulation (exposition lumineuse et électromagnétique) peut améliorer le potentiel thérapeutique de la transplantation cellules souches neurales. A cet effet, nous souhaitons utiliser un modèle de maladie de Parkinson chez la souris qui est très similaire à la pathologie humaine et très utilisé pour reproduire la maladie chez l'animal.

Après induction de la pathologie, les souris recevront un greffon de cellules souches et seront exposées à un dispositif de photobiomodulation. Le potentiel thérapeutique de ce traitement sera ensuite évalué sur l'activité motrice des souris ainsi que sur la le comptage des cellules dopaminergiques dans le cerveau. En effet, l'exposition au dispositif de photobiomodulation crée un environnement favorable à la transplantation de cellules en réduisant l'inflammation au niveau cérébral. De ce fait, les cellules transplantées se trouveront dans un milieu favorable à leur survie et à leur intégration efficace dans le réseau neural de l'hôte, résultant dans la compensation de la perte des neurones qui ont déjà disparu au fur et à mesure du développement de la maladie. La mise en oeuvre de nouvelles stratégies non médicamenteuses est aujourd'hui nécessaire afin de développer de nouvelles solutions médicales pour lutter contre des maladies aussi complexes et multifactorielles que les maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson.

Le projet prévoit donc de vérifier si l'on peut, par l'intermédiaire d'une greffe de cellules souches accompagnée d'un traitement en photobiomodulation, donner à un individu atteint de la maladie de Parkinson la capacité de stabiliser son état sans dégradation de ses capacités motrices et continuer à avoir une vie 'normale'.

Les déficits moteurs, et leur éventuelle réversion par la greffe/traitement, seront analysés par un test classique de coordination motrice: le test du Rotarod.

Ce travail vise à mettre en place une stratégie de thérapie génique et cellulaire pour la maladie de Parkinson qui est une maladie neurodégénérative pour laquelle il n'existe aucune thérapie. Pour ces essais il est indispensable que l'étude soit effectuée sur un système in vivo. Il n'est donc pas possible de supprimer l'utilisation d'animaux vivants pour cette étude. Les deux approches technologiques se complètent.

L'étude comprendra 10 groupes avec des traitements différents avec N=12 souris par groupe, soit au total 120 souris analysées. Le nombre d'animaux défini au protocole va permettre d'obtenir une étude la plus pertinente possible en limitant au maximum le nombre d'animaux utilisés (nombre limité de doses et contrôles nécessaires à la rigueur scientifique). Le nombre d'animaux par groupe est le nombre minimum permettant une analyse statistique cohérente dans les analyses utilisées en connaissant le modèle utilisé décrit dans de nombreuses publications scientifiques. Afin de répondre à la règle des 3R tous les animaux suivront l'ensemble des procédures décrites dans ce projet. L'évaluation quotidienne de points limites (perte de poids, signes cliniques ...) permettant d'évaluer la souffrance animale sera de rigueur tout au long du protocole. Les responsables de l'étude ainsi que le vétérinaire référent seront directement impliqués dans le bien être de ces animaux et seront informés de leur état pour apporter les soins nécessaires afin d'éviter leur souffrance. Les animaux seront placés dans des cages adaptées, enrichies avec du matériel de nidification ainsi que de la nourriture et de l'eau de boisson à volonté.

Les animaux sont manipulés à la main par du personnel qualifié plusieurs fois par semaine, les souris sont hébergées dans un environnement calme et propice à l'expression des comportements naturels où les paramètres environnementaux de qualité de l'air, d'humidité et de température sont contrôlés. Les animaux bénéficient d'un enrichissement adapté en quantité suffisante et font l'objet d'une surveillance quotidienne pour nous assurer de leur état réel de bien-être.

19217 La mémoire émotionnelle correspond à la mémoire d'un événement ayant suscité une émotion. Parmi les émotions pouvant être intégrées dans nos souvenirs, la peur est sans doute l'émotion la plus conservée entre les différentes espèces, car elle est indispensable à la survie en permettant la lutte ou la fuite face à un danger ou à un prédateur. La mémoire de peur est donc adaptative car elle induit le stockage à long terme des caractéristiques d'un environnement dangereux afin permettre la reconnaissance d'indices prédictifs de ce danger et son évitement. Cependant, cette mémoire de peur peut devenir anormale dans le cadre de certaines pathologies comme le syndrome de stress posttraumatique (PTSD, PostTraumatic Stress Disorder). En effet, après un événement traumatique, les patients PTSD souffrent d'un rappel mnésique intrusif et intense de sensations et d'émotions liées au trauma, en l'absence de tout indice prédictif d'un danger. Cette pathologie présente une prévalence annuelle mondiale de 3-4%, qui peut aller jusqu'à 15% dans les zones de conflit, et est souvent comorbide avec la dépression ou l'abus de substances (Richter-Levin, 2018). Il s'agit donc d'un problème majeur de santé publique, pour lequel les traitements disponibles (thérapies cognitives et antidépresseurs) sont peu efficaces. L'objectif de ce projet est donc non seulement d'évaluer les effets de nouvelles entités pharmacologiques sur le fonctionnement de la mémoire de peur physiologique (procédure 1), mais également d'évaluer leurs effets sur les symptômes du PTSD (procédure 2).

Afin de caractériser l'action pharmacologique de nouveaux composés sur la mémoire émotionnelle normale ou pathologique, il est nécessaire de passer par des modèles animaux. En effet, l'évaluation d'un processus aussi complexe et intégré que la mémoire, mettant en jeu de multiples aires cérébrales, ne peut être réalisée *in vitro*. Il est de plus nécessaire de travailler avec des animaux phylogénétiquement proche de l'homme afin que les conclusions des expérimentations soient le plus transposables à l'humain. L'espèce animale utilisée doit être un compromis entre cette nécessité de transposition et des contraintes éthiques, réglementaires et techniques. Le choix des rongeurs est celui qui répond le mieux à ce compromis, c'est pourquoi des souris et des rats sont utilisés dans ce projet. L'anatomie cérébrale est en effet relativement bien conservée entre les rongeurs et l'humain, et des tests comportementaux chez l'animal permettent d'évaluer une mémoire émotionnelle proche de la mémoire humaine. La peur étant une émotion très conservée entre les espèces car essentielle à leur survie, c'est la mémoire de peur qui est classiquement évaluée chez les rongeurs. Bien que les rongeurs ne puissent pas verbaliser comme l'humain leur mémoire de peur, on peut quantifier cette peur de manière objective en mesurant l'immobilité comportementale caractéristique de la peur chez les rongeurs et appelée « freezing ». Dans ce projet, les animaux sont soumis à un conditionnement de peur, dans lequel ils associent un son ou un contexte particulier avec un choc électrique au niveau des pattes, puis stockent cette association

dans leur mémoire à long terme. Ainsi, lors du test de rappel mnésique on présente à nouveau ce son ou ce contexte à l'animal, qui exprimera sa peur par le freezing que l'on pourra mesurer de manière objective par vidéo-tracking à l'aide du logiciel ANYMAZE.

Ce conditionnement de peur permettra ainsi l'étude quantitative de la mémoire de peur physiologique chez le rongeur (procédure 1), et nous pourrons réaliser des administrations de produits pharmacologiques à différents moments afin d'étudier leur effet sur l'encodage, la consolidation, le rappel ou encore la maintenance de la mémoire.

Le conditionnement de peur sera également utilisé dans la procédure 2 afin de générer un modèle rongeur de PTSD, en association avec un second stress permettant de modéliser un traumatisme. Plusieurs jours ou semaines après ce trauma initial, nous pourrons valider le phénotype PTSD chez le rongeur grâce à des tests comportementaux évaluant des symptômes proches des symptômes humains, tels que l'anxiété, l'évitement ou encore l'hyperréactivité. Une fois notre modèle PTSD validé, nous passerons au test de nouvelles entités pharmacologiques développées par notre centre de recherche, en évaluant leurs effets sur les symptômes du PTSD chez les rongeurs, et en les comparant à des traitements de référence (antidépresseurs tels que la paroxétine ou la fluoxétine).

Deux pistes thérapeutiques seront envisagées, avec un traitement soit immédiatement après le trauma, soit de manière plus tardive et conjointement à une réactivation de la mémoire traumatique, dans l'esprit des thérapies cognitives d'exposition chez l'humain. Dans les deux procédures, les administrations de produits pourront ainsi se faire de manière unique ou répétée selon les protocoles, et par voie orale, intrapéritonéale ou sous-cutanée selon les composés.

Nous prévoyons l'utilisation de 3792 souris et 2364 rats adultes au total pour les deux procédures, afin d'atteindre des effectifs par groupe suffisant (16 souris et 12 rats) et de pouvoir tester plusieurs produits de référence et composés pharmacologiques développés par notre centre de recherche à différentes doses. Nous utiliserons majoritairement des animaux mâles comme classiquement fait dans la littérature, et car l'étude du facteur sexuel n'est pas l'objectif de ce projet et nécessiterait des effectifs doublés.

Les conditions d'hébergement des animaux respecteront strictement la législation ainsi que les indications de la SBEA. Les animaux seront hébergés en groupe dans un milieu enrichi, et leur stress sera réduit au maximum grâce à l'habituation à la manipulation ou bien l'utilisation de cages de transfert individuelles après administration de produits. Les animaux seront observés, manipulés et pesés quotidiennement au cours de la phase active des protocoles, et les observations feront l'objet d'un relevé SBEA hebdomadaire à l'aide d'une grille de critères permettant de définir des situations de détresse/souffrance animale. La détresse et souffrance des animaux sera diminuée par les traitements qui conviennent selon les observations relevées. Une attention particulière sera portée aux animaux après le trauma et l'administration de produits. L'exclusion d'un animal de la procédure ainsi que sa mise à mort sera décidée lors de l'atteinte d'un des points limites définis dans ce projet.

En fin de procédure, les animaux seront réutilisés au maximum dans d'autres projets au sein du centre de recherche.

19218 Une cicatrice chéloïde est une cicatrice en relief qui a comme particularité d'être fibreuse, proliférative, progressive, de ne pas régresser spontanément et de pouvoir s'étendre au-delà de la région traumatique/lésionnelle. En fonction de leur aspect et localisation, les cicatrices chéloïdes peuvent s'avérer gênantes, douloureuses et avoir un retentissement esthétique important. Jusqu'à présent les thérapies dont nous disposons pour ces cicatrices sont limitées. Elles consistent principalement en une prise en charge chirurgicale d'exérèse avec un risque de chirurgie mutilante, de récurrence voire d'aggravation en post opératoire. Les thérapeutiques médicales sont peu efficaces et reposent sur des injections de dérivés de cortisone dans la cicatrice ou encore de dérivés de chimiothérapie. Les autres traitements sont en général inefficaces. Compte tenu de la prévalence de cette pathologie, il est donc urgent de trouver de nouvelles options thérapeutiques. Des données préliminaires suggèrent qu'une voie de signalisation intracellulaire est anormalement activée au sein des cellules des cicatrices chéloïdes. Ces nouvelles données ouvrent de nouvelles perspectives

thérapeutiques puisque des traitements inhibant cette voie sont disponibles sur le marché ou en cours de développement. Au sein de ce projet, nous testerons chez le gros animal (lapin car c'est un des rares mammifères qui développe des cicatrices chéloïdes), l'intérêt de ces traitements pharmacologiques administrés soit par voie orale soit par voie locale directement au sein des cicatrices. Nous utiliserons des lapins adultes.

Le nombre d'animaux (n=40) est justifié par la nécessité d'atteindre des résultats statistiquement significatifs.

Nous appliquerons la règle des "3R" avec:

1-le nombre minimal d'animaux pour avoir la puissance statistique (test hypothèse nulle).

2-Dans un contexte de recherche physiopathologique, l'expérimentation animale ne peut en aucun cas être remplacée par des expériences in vitro, où les cellules sont sorties de leur environnement. Le lapin est l'animal de choix car ni les souris ni les rats ne développent de cicatrices chéloïdes.

3-Les animaux seront attentivement surveillés, des points limites seront établis et des antalgiques administrés si besoin. Certains points limites entraîneront l'interruption de la procédure et la mise à mort de l'animal.

Ce projet d'une durée de 5 années permettra d'améliorer la connaissance et très certainement le traitement des cicatrices chéloïdes.

19219 Les sensations de douleur sont des symptômes communs dans la maladie de Parkinson, négativement associées avec la qualité de vie des patients, et ayant un impact plus fort que les symptômes moteurs. Ces symptômes restent cependant peu pris en compte cliniquement et leurs mécanismes sous-jacents sont peu étudiés et compris.

Les symptômes douloureux peuvent être présents chez environ 85 % des patients parkinsoniens. Différents types de symptômes de douleurs peuvent être distingués avec des douleurs :

- causées par des affections des os, articulations, muscles, tendons ou ligaments (musculosquelettiques, ~ 58.5%),
- déclenchées par une hyperpression sur une racine nerveuse, à l'intérieur ou à proximité de la colonne vertébrale (neuropathiques radiculaires, ~ 38 %),
- dues à une atteinte à n'importe quel niveau du système nerveux central (neuropathiques centrales ~ 8.5 - 27 %),
- induites par les mouvements anormaux tels que les dystonies (contractions involontaires des muscles) ou dyskinésies (mouvements anormaux involontaires) (~ 33.5 %).

Le seuil de douleur est également altéré chez les patients Parkinsoniens, présentant ou non des symptômes de douleur, la littérature reste cependant contradictoire concernant cette altération.

Ces symptômes de douleurs sont donc un souci majeur dans la prise en charge de la maladie.

Les douleurs neuropathiques centrales sont décrites par les patients comme des sensations douloureuses bizarres et sans cause apparente telles que des douleurs vives, des sensations de brûlures, des fourmillements ou irritations douloureuses. Ces symptômes prédominent du côté du corps le plus affecté par la maladie et ne sont pas reliés aux autres symptômes douloureux décrits précédemment. Les douleurs centrales et altérations des seuils de douleur dans la maladie de Parkinson, sur lesquelles portent ce projet, suggèrent que les circuits cérébraux permettant de percevoir et traiter les informations douloureuses pourraient être dysfonctionnels dans la maladie de Parkinson mais ces réseaux n'ont jamais été étudiés dans ce contexte. Ce projet a ainsi pour but d'approfondir nos connaissances sur l'état fonctionnel de ces réseaux dans des modèles animaux de la maladie de Parkinson.

Le projet est composé de 4 procédures expérimentales et requerra l'utilisation d'un maximum de 104 rats au total sur 5 ans.

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

Raffinement : Le projet implique la mise en place d'un état pathologique chez le rongeur avec de la chirurgie lésionnelle de classe modérée. La douleur sera réduite en effectuant toutes les procédures chirurgicales sous anesthésie générale et par le pre-traitement avec un anesthésique local afin de prévenir le développement d'une potentielle hyperalgésie post-opératoire locale. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant les signes de douleur. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée.

Remplacement : Ce projet a pour but de mesurer l'état fonctionnel d'un réseau de structures, en particulier leurs réponses sensorielles par des stimulations naturelles. De ce fait, il est impossible de remplacer notre préparation in vivo par un modèle cellulaire ou une simulation computationnelle.

19220 La salinisation de l'environnement a été identifiée comme une menace globale pour les systèmes océaniques, d'eau douce et terrestres. Plus d'un quart des zones humides de la planète ont déjà été touchées par la salinisation, d'autres sont en voie d'être affectées par ce processus, notamment les zones côtières menacées par la montée des niveaux marins ou l'augmentation de la fréquence d'évènements extrêmes tels que les submersions marines. A l'échelle globale, l'impact de la salinisation sur la biodiversité est en voie de devenir un problème de conservation majeur.

Les amphibiens forment un groupe d'espèces particulièrement diversifié et abondant dans les zones humides cotières. Néanmoins, leurs faibles capacités de dispersion les rendent particulièrement vulnérables à l'augmentation de la salinité de leur milieu. Ceci est d'autant plus vrai que ce groupe est également caractérisé par une peau très perméable qui facilite les échanges avec le milieu ce qui peut poser des problèmes de maintien de l'équilibre osmotique. Toutes ces caractéristiques font des amphibiens des espèces particulièrement adaptées pour examiner l'impact de la salinisation de leur environnement.

Le projet consiste à suivre la présence et l'abondance d'un groupe d'amphibiens abondant dans les marais cotiers (grenouilles vertes *Pelophylax* spp.), d'analyser ces données en fonction de la salinité du milieu (eau douce à saumâtre). En addition à ces données de présence et d'abondance, le projet consiste à examiner les effets de la salinité environnementale sur la physiologie des grenouilles vertes adultes en testant des niveaux de salinité (15g/l) similaires à ceux retrouvés dans l'environnement (variation de 0 g/l à > 17 g/l).

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

- **Remplacement :** L'étude des effets de la salinisation des zones humides cotières sur la faune sauvage a des implications importantes à la fois pour la recherche fondamentale en écologie et la recherche appliquée. Ce projet porte spécifiquement sur les grenouilles vertes (*Pelophylax* spp.), un groupe d'espèces répandu dans ces écosystèmes et présent dans des sites souvent saumâtres. Il n'existe pas d'alternative à l'utilisation d'un modèle animal pour cette étude.

- **Réduction :** Nous avons réduit au minimum le nombre d'animaux employés. En effet, l'étude sera menée sur un nombre maximum de 20 individus adultes par site (en fonction des abondances), sur 10 sites (mares) présentant des niveaux de salinité contrastés, soit un total de 200 individus au maximum (effectif basé sur un test de puissance cohérent avec les analyses statistiques utilisées pour traiter ces données).

- **Raffinement :** Tout au long de la procédure, les individus disposeront de conditions des manipulations optimisées afin de réduire le stress engendré par ces manipulations. Les manipulations s'étaleront sur une période de temps courte (les mesures morphométriques et le prélèvement sanguin impliquent la manipulation des individus pendant une durée de 5 min au maximum). Les tests de réponses physiologiques et comportementales (distances de saut) à la salinité seront effectués en laboratoire durant une période de captivité transitoire (48 heures). Un suivi journalier de l'état de chaque individu et de son terrarium sera effectué. L'avis du vétérinaire référent sera sollicité le cas échéant.

19221 L'une des principales recommandations pour « bien vieillir » consiste à prendre en charge précocement les maladies ou les troubles qui sont susceptibles d'entraîner une incapacité. Ce projet est en parfaite adéquation avec cette stratégie et vise à améliorer la qualité de vie et le

vieillesse. En effet, la maladie de Parkinson (MP) se caractérise par une dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques localisés dans la substance noire compacte perturbant le fonctionnement d'un ensemble de structures sous corticales constituant les ganglions de la base. La conséquence est, entre autres, l'apparition de la triade classique des symptômes moteurs de la maladie de Parkinson, à savoir rigidité, akinésie et tremblement de repos. Le problème majeur de cette maladie est que ces symptômes moteurs n'apparaissent qu'à partir d'un seuil critique d'environ 60-80 % de dénervation de ces neurones dopaminergiques. En d'autre terme, les symptômes moteurs n'apparaissent que très tardivement, lorsque la majorité des neurones dopaminergiques a déjà disparu. Dans un contexte clinique où les traitements disponibles sont uniquement symptomatiques sans permettre de soigner la maladie, et entraînant fréquemment de nombreux effets secondaires, il semble crucial d'identifier des stratégies de détection précoce, avant l'apparition des premiers symptômes moteurs, afin d'intervenir rapidement pour ralentir son évolution et préserver une meilleure qualité de vie pour ces patients sur une plus longue durée. C'est pourquoi, dans ce projet, nous proposons d'étudier l'état fonctionnel d'un groupes de structures sous corticales sensorielles car nous considérons qu'étant sous l'influence directe du dysfonctionnement des ganglions de la base, elles devraient être les premières à subir l'influence des modifications fonctionnelles causées par le développement de la maladie au sein des ganglions de la base. Des données préliminaires obtenues dans nos modèles animaux et chez le patient parkinsonien indiquent qu'elles représentent un sérieux potentiel de marqueur précoce de la MP qui nous semble important de tester et d'étudier à un stade pre-clinique chez le rat.

Le projet est composé de 7 procédures expérimentales différentes et requerra l'utilisation d'un maximum de 1928 rats au total sur 5 ans.

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

Raffinement : Le projet implique la mise en place d'un état pathologique chez le rongeur avec de la chirurgie lésionnelle de classe modérée. La douleur sera réduite en effectuant toutes les procédures chirurgicales sous anesthésie générale et par le pre-traitement avec un anesthésique local afin de prévenir le développement d'une potentielle hyperalgésie post-opératoire locale. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de douleur. Cela nous permet de intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

Remplacement : Ce projet a pour but de mesurer l'état fonctionnel de structures sous corticales du tronc cérébral, en particulier des réponses sensorielles de ces structures induites par des stimulations sensorielles naturelles telles que des flashes lumineux ou des sons. De ce fait, il est impossible de remplacer notre préparation in vivo par un modèle cellulaire ou une simulation computationnelle.

19222 Le diabète est une maladie qui touche environ 350 millions de personnes dans le monde dont près de 3 millions en France.

Il existe principalement deux types de diabète : le diabète de type 1 et celui de type 2. Le diabète de type 1 représente environ 10 % des cas de diabètes dans le monde et touche principalement les enfants et les adolescents.

D'après des études récentes chez les patients diabétiques de type 1, certaines populations de cellules immunitaires possèdent un rôle dans la physiopathologie et l'apparition de la maladie. L'objectif de ce projet est donc de poursuivre l'étude de ces cellules et leurs implications dans le diabète de type 1, notamment grâce à différents modèles animaux.

Le diabète de type 1 est une maladie multifactorielle qui touche de multiples organes (pancréas, foie, intestin, organes immunitaires) et il est extrêmement difficile d'obtenir des échantillons de tissus humains (biopsies de pancréas, d'intestin) de ce type de patients. Ce sont, pour les enfants, des opérations chirurgicales invasives et risquées. Il est donc nécessaire d'utiliser le modèle animal

(souris) afin de comprendre les mécanismes immunitaires développés par l'organisme au cours du développement de la maladie.

Durant ce projet nous prévoyons d'analyser les souris de 10 lignées génétiquement modifiées. Nous allons utiliser des souris qui peuvent développer spontanément cette maladie. Pour étudier le rôle du système immunitaire dans le développement du diabète, nous ferons à certains groupes de souris des traitements avec des molécules diabéto-gènes ou immuno-modulatrices par injections intrapéritonéales, des transferts de cellules déclenchant un diabète par injection intraveineuse, des modifications de la flore intestinale par gavage ou encore une infection virale impliquée dans le diabète de type 1 par injection intrapéritonéale.

Ce projet sera mené dans le respect de la règle des 3R :

-Remplacement : Le recours à l'animal est indispensable car les cellules immunitaires étudiées sont localisées essentiellement dans les muqueuses et le pancréas et l'analyse de leurs interactions dans l'organisme au cours du développement de la maladie ne peut être faite in vitro. Néanmoins ce projet est associé à de multiples manipulations in vitro visant à remplacer le maximum d'expérimentation animale possible.

-Réduction : notre stratégie vise à obtenir le maximum de résultats significatifs, avec des procédures expérimentales élaborées et bien maîtrisées, de manière à utiliser le moins d'animaux possibles. De plus, en amont des procédures expérimentales, des expériences in vitro seront réalisées afin de mieux sélectionner les échantillons à tester in vivo. Chaque procédure fait l'objet d'analyses complètes qui permettent d'obtenir des résultats statistiquement satisfaisants et un panel large d'informations.

-Raffinement : Pour chacune de ces procédures, le bien-être des animaux est surveillé par le personnel compétent ainsi que les responsables du projet. De l'enrichissement (maison et coton) est ajouté dans leurs cages de façon systématique. L'expertise des responsables de projet avec les procédures permet également de limiter le stress et l'inconfort des animaux.

Ce projet prévu pour 5 ans nécessitera au total 6050 souris.

Il permettra de mieux comprendre les interactions et les rôles des cellules du système immunitaire dans le diabète de type 1 afin de pouvoir par la suite, élaborer une thérapie efficace et moins contraignante pour améliorer la qualité de vie des patients prédisposés à la pathologie.

19223 Les pathologies dégénératives articulaires, arthrose et polyarthrite, sont les maladies rhumatismales les plus répandues. Elles se caractérisent par une dégradation irréversible du cartilage et de l'os qui aboutit au handicap. Outre les traitements symptomatiques contre la douleur, de nouvelles biothérapies dirigées contre les facteurs inflammatoires ont apporté une amélioration notable et même des rémissions prolongées. L'efficacité thérapeutique de ces nouvelles thérapies doit être évaluée avant d'être appliquée à l'homme. Des études préliminaires de toxicité et d'efficacité sont réalisées in vitro. Mais l'articulation ne se limite pas à un système cellulaire isolé. Il s'agit d'un système complexe composé de tissus différents. L'utilisation d'un modèle animal est donc nécessaire pour caractériser les acteurs cellulaires et moléculaires mis en jeu par ces différentes biothérapies. Le modèle murin d'induction d'arthrite inflammatoire par transfert de sérum de souris polyarthritiques KBxN, est l'un des plus performants pour cette étude.

Le but de ce projet est double :

1) générer la lignée de souris KBxN génétiquement modifiées qui développent une polyarthrite bilatérale et symétrique proche de la pathologie humaine et prélever le sang arthritogène de ces souris.

2) induire une arthrite transitoire par transfert de sérum KBxN chez la souris naïve, pour étudier la tolérance et l'efficacité anti-arthritique de nouvelles formules thérapeutiques et caractériser leur mode d'action.

Ces protocoles ont déjà obtenu une autorisation dont la validité se termine en septembre 2021.

Les souris nécessaires à la génération de la lignée KBxN sont élevées à l'animalerie. Le prélèvement de sang arthritogène sera réalisé sous anesthésie générale pour éviter toute

souffrance supplémentaire, et sera suivi de la mise à mort immédiate des souris. Les cinq nanovecteurs étudiés sur le modèle d'arthrite transitoire, ont des activités anti-inflammatoires sur le cartilage in vitro. Les effets seront vérifiés sur les souris arthritiques dont les articulations seront prélevées post mortem pour études histochimiques. Le nombre de souris est de 552 pour une durée de 5 ans.

Ce projet répond aux exigences des 3R.

Réduire : Le schéma expérimental et la taille des échantillons permettant une analyse statistique robuste des résultats, ont été choisis pour réduire au minimum le nombre d'animaux en tenant compte des expériences antérieures.

Raffiner : L'état des souris sera suivi quotidiennement. Il n'y a pas de médication capable de prendre en charge la douleur sans modifier le développement de la pathologie arthritique des souris. Pour améliorer leur confort et diminuer leur angoisse, les souris feront l'objet de raffinement avec enrichissement du milieu (igloo, coton). De la nourriture humide sera placée au fond de la cage dès la survenue des signes articulaires inflammatoires pour permettre aux animaux de continuer à s'alimenter malgré la difficulté à se déplacer. Une grille précise d'évaluation de la douleur sera mise en place et servira de points limites. La présence d'au-moins un de ces critères de souffrance conduira à la mise à mort anticipée de l'animal.

Remplacer : Les acteurs cellulaires et moléculaires qui interviennent au cours des pathologies dégénératives articulaires sont multiples. L'articulation est composée de tissus différents (cartilage, os sous-chondral, membrane synoviale). L'analyse des effets thérapeutiques de nouvelles biothérapies sur ces pathologies implique des relations complexes entre ces différents tissus et nécessite l'utilisation d'organismes vivants mimant les maladies humaines.

Ce projet devrait permettre d'évaluer la tolérance et l'efficacité anti-arthritique de nouvelles molécules utilisables ultérieurement en imagerie chez l'homme, et de stocker la quantité de sérum arthritogène nécessaire et suffisante pour répondre à des demandes d'expertise et d'efficacité de nouvelles thérapies anti-arthritiques pendant 5 ans. Chacun de ces futurs projets fera l'objet d'une demande particulière d'autorisation ciblée.

19224 En juillet 2020, une commission d'enquête de l'Assemblée nationale a estimé que le moustique tigre pourrait représenter un risque sanitaire majeur lors des prochaines décennies. Ce moustique est vecteur de nombreux pathogènes à l'Homme et aux animaux et face à l'absence de traitements ou de vaccins efficaces contre la plupart de ces pathogènes qu'il transmet, il est urgent de développer des stratégies de lutte directement ciblées sur le vecteur. Un prérequis indispensable au développement de ces méthodes de lutte est de mieux connaître la biologie du moustique. Cette production de savoir qui s'inscrit pleinement dans le cadre de la recherche fondamentale ne peut être obtenue qu'en étant capable d'élever cette espèce en conditions de laboratoire afin de l'étudier. La reproduction des populations de moustiques tigres nécessite que les femelles puissent réaliser un repas sanguin. En effet, les femelles ont besoin de protéines acquises à partir de sang d'animaux vertébrés pour assurer le développement de leurs œufs et la survie de leur espèce. Dans le cas de la reproduction en masse, seul l'animal vivant anesthésié permet d'obtenir le rendement suffisant pour assurer le bon développement et la survie du moustique tigre élevé en laboratoire. L'espèce de souris *Mus musculus* représente la source de sang la plus pertinente pour élever le moustique tigre en laboratoire. Les souris préalablement tondues sur le ventre sont directement disposées sur la cage hébergeant les moustiques. Remplacer. Des méthodes alternatives (type dispositif artificiel de nourrissage contenant du sang prélevé sur animaux) ont été utilisées à multiples reprises mais le rendement d'individus gorgés obtenu est trop faible pour garantir la pérennité des lignées de moustiques en laboratoire. Réduire. Sur les 2 années du projet, 188 souris seront utilisées pour entretenir 7 populations de laboratoire. Ce nombre a été ajusté en tenant compte (i) du nombre de moustiques capables de se trouver en même temps sur la surface de peau de l'animal (~50 moustiques toutes les 3 minutes), (ii) du volume de sang prélevé par moustique (2µl), (iii) du volume sanguin de la souris (~1,8ml/30g) (iv) du nombre d'œufs nécessaires pour assurer le maintien d'une population tout en conservant des œufs pour générer des individus larves et adultes sur lesquels réaliser des expérimentations (~10 000 œufs). Raffiner. Tout au long de l'expérience (12 min), les

souris seront anesthésiées et pour leur confort, elles seront recouvertes d'une couverture chauffante pour maintenir leur température corporelle à un niveau constant. Les animaux seront euthanasiés avant leur réveil par dislocation cervicale. Une même souris ne sera utilisée qu'une seule fois. Dans la mesure du possible, des animaux surnuméraires seront récupérés au sein de l'animalerie et utilisés pour ces travaux afin de limiter au maximum la production de « nouvelles » souris de laboratoire.

19225 L'espérance de vie ne cesse d'augmenter durant le siècle dernier. Par conséquent, les pathologies associées au vieillissement telles que le cancer ou les maladies métaboliques et cardiovasculaires sont de plus en plus fréquentes.

La restriction calorique est la seule intervention non-génétique connue pour augmenter l'espérance de vie dans des dizaines d'espèces animales. Comme pour la restriction alimentaire, le jeûne intermittent prolonge l'espérance de vie d'environ 30% chez la souris et la protège de l'obésité, du diabète, de l'hypertension, de l'inflammation, et de la progression clinique de maladies cardiovasculaires. De la même manière, le jeûne intermittent chez l'homme améliore les mêmes paramètres physiologiques et métaboliques inclus la perte de poids, la diminution des taux d'insuline et la réduction du cholestérol total. Cependant, ces observations chez l'homme manquent d'un grand nombre d'informations dont le régime alimentaire durant la période d'alimentation, le sexe, l'historique médical du patient.... De plus, la plupart des études menées au laboratoire sont réalisées chez des animaux sains. Ces études restent donc insuffisantes pour pouvoir déterminer si le jeûne intermittent est une méthode diététique à privilégier ou à proscrire à des hommes ou à des femmes souffrant de maladies métaboliques ou cardiaques. Elles restent aussi insuffisantes quant au type de nourriture à consommer pendant la période d'alimentation. L'objectif de ce projet est d'étudier en fonction du sexe et du régime alimentaire, les effets du jeûne intermittent sur la progression avec l'âge de la stéatose hépatique et du développement de l'athérosclérose chez des souris prédisposées à développer ces maladies.

Ce projet implique l'utilisation de modèles murins car aucun dispositif in vitro ou modèle informatique ne peut reproduire le contexte physiopathologique de la progression des maladies cardiovasculaires et des maladies du foie.

Des mesures seront intégrées pour respecter la règle des 3R (Réduire, Raffiner et Remplacer). Des efforts seront portés pour réduire le nombre d'animaux par groupe et, de plus, un même animal pourra être utilisé pour la mesure de plusieurs paramètres, optimisant ainsi la quantité de résultats obtenus par rapport au nombre d'animaux utilisés. Des mesures de Raffinement seront également prises dans l'optique de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse subie par les animaux (enrichissement du milieu par du papier sopalin pour nidification, suivi quotidien, anesthésie lors des procédures expérimentales, tapis chauffant,...)

Les résultats de ce projet constitueront un appui de recherche fondamentale et préclinique permettant 1) d'évaluer les effets du jeûne intermittent sur la progression avec l'âge de la stéatose hépatique et le développement de l'athérosclérose, 2) de définir le rôle du sexe et du type de nourriture dans ces effets, 3) de caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans ces effets. Ces résultats pourraient également nous aider à évaluer les bénéfices ou les risques d'entreprendre un jeûne intermittent chez des patients ayant un risque de maladies métaboliques ou cardiaques.

La réalisation de ce projet nécessite l'utilisation de 3240 souris, nombre d'animaux qui est réduit au minimum, mais suffisant pour garantir la précision et la robustesse des résultats et pouvoir faire des comparaisons et des statistiques exploitables.

19226 La mémoire est un processus cognitif protéiforme dont les mécanismes physiologiques ne sont pas encore bien élucidés dans la littérature. Comprendre le fonctionnement de la mémoire est d'autant plus primordial que nombreuses sont les pathologies touchant au système nerveux central qui perturbent et dégradent notre mémoire : maladie d'Alzheimer, schizophrénie, autisme, ou encore syndrome de stress post-traumatique. L'objectif de ce projet est d'évaluer les effets sur la mémoire de nouvelles entités pharmacologiques développées dans notre centre de recherche, en les

comparant à des produits de référence, dans un contexte physiologique. Les résultats de cette étude pourront ensuite servir de base à des projets mettant en jeu des contextes pathologiques, dans le but de trouver des cibles thérapeutiques permettant d'atténuer les déficits mnésiques causés par ces pathologies.

Afin de caractériser l'action pharmacologique de nouveaux composés sur la mémoire, il est nécessaire de passer par des modèles animaux. En effet, l'évaluation d'un processus aussi complexe et intégré que la mémoire, mettant en jeu de multiples aires cérébrales, ne peut être réalisée *in vitro*. Il est de plus nécessaire de travailler avec des animaux phylogénétiquement proches de l'homme afin que les conclusions des expérimentations soient le plus transposables à l'humain. L'espèce animale utilisée doit être un compromis entre cette nécessité de transposition et des contraintes éthiques, réglementaires et techniques. Le choix des rongeurs est celui qui répond le mieux à ce compromis, c'est pourquoi des souris et des rats sont utilisés dans ce projet. L'anatomie cérébrale est en effet relativement bien conservée entre les rongeurs et l'humain, et des tests comportementaux chez l'animal permettent d'évaluer une mémoire proche de la mémoire humaine. En effet, bien que les rongeurs ne puissent pas verbaliser leurs souvenirs comme l'humain, plusieurs stratégies permettent de mesurer des paramètres comportementaux mesurant de manière objective la mémoire animale. Une première stratégie est d'évaluer un sous-type de la mémoire, la reconnaissance/familiarité, qui peut être évaluée chez l'animal par le test de reconnaissance de nouvel objet (NOR, Novel Object Recognition) utilisé dans ce projet. La seconde stratégie repose sur la parallèle existant entre la mémoire humaine et la mémoire spatiale animale qui peut être mesurée dans plusieurs dispositifs comportementaux. Dans ce projet, nous utilisons deux de ces tests de mémoire spatiale : le labyrinthe de Barnes et le labyrinthe en Y. Le labyrinthe de Barnes est davantage adapté à l'évaluation de la mémoire à long terme (mémoire durable au sein de laquelle des informations peuvent rester stockées toute la vie d'un individu) alors que le labyrinthe en Y est plus couramment utilisé pour tester la mémoire à court terme (type de mémoire que l'on utilise par exemple pour faire du calcul mental, au sein de laquelle les informations sont rapidement oubliées une fois utilisées). Les analyses comportementales seront réalisées par l'acquisition et le vidéo-tracking à l'aide du logiciel Ethovision XT (Noldus), qui permettra de mesurer de manière objective des paramètres (latences, durées d'exploration, distances parcourues...) révélant l'apprentissage et le degré de mémorisation des animaux.

Nous réaliserons des interventions pharmacologiques à différents moments dans les trois tests comportementaux utilisés (correspondant aux trois procédures décrites dans ce projet), afin d'étudier l'effet de produits sur l'encodage, la consolidation, le rappel ou encore la maintenance de la mémoire. Les administrations de produits pourront ainsi se faire de manière unique ou répétée selon les protocoles, et par voie orale, intrapéritonéale ou sous-cutanée selon les composés. Nous commencerons par tester des produits de référence avant de passer à de nouvelles entités pharmacologiques développées par notre centre de recherche.

Les procédures seront conduites sur des souches de souris et de rat classiquement utilisées dans la littérature, avec des individus adultes. Nous prévoyons l'utilisation de 2160 souris et 1332 rats au total pour les trois procédures (3 tests comportementaux) afin d'atteindre des effectifs par groupe suffisant (16 souris et 12 rats) et de pouvoir tester plusieurs produits de référence (produits amnésiques tels que la scopolamine ou la PCP, et produits promnésiques tels que la tacrine ou le ciproxifan) ou composés pharmacologiques développés par notre centre de recherche (en testant différentes doses pour faire une dose-réponse). Nous utiliserons majoritairement des animaux mâles comme classiquement fait dans la littérature et afin de réduire les effectifs (puisque ceux-ci devraient être doublés pour prendre en compte le facteur sexuel), et nous utiliserons la souris ou le rat selon les protocoles utilisés.

Les conditions d'hébergement des animaux respecteront strictement la législation ainsi que les indications de la SBEA de notre centre de recherche. Les animaux seront hébergés en groupe dans un milieu enrichi (tunnel, matériel de nidification...). La température, la luminosité, l'hygrométrie ou encore le bruit seront contrôlés. Le stress des animaux sera réduit au maximum grâce à l'habituation à la manipulation par l'expérimentateur ou bien l'utilisation de cages de transfert individuelles après administration de produits. Les animaux seront observés, manipulés et pesés quotidiennement au

cours de la phase active des protocoles, et les observations feront l'objet d'un relevé SBEA hebdomadaire à l'aide d'une grille de critères permettant de définir des situations de détresse/souffrance animale. Parmi ces critères on retrouve des observations sur la consommation alimentaire et hydrique, l'apparence physique externe, les modifications du comportement, les modifications de l'environnement d'hébergement, ou encore des problèmes cliniques divers. La détresse et souffrance des animaux sera diminuée par les traitements qui conviennent selon les observations relevées. Une attention particulière sera portée aux animaux après l'administration de produits. L'exclusion d'un animal de la procédure ainsi que sa mise à mort sera décidée lors de l'atteinte d'un des points limites définis dans ce projet.

Les tests comportementaux en eux-mêmes ne sont pas susceptibles d'induire une souffrance ou une détresse chez les animaux. Les trois procédures décrites dans ce projet peuvent être classifiées comme « légères » en sévérité, puisque les animaux subiront simplement des administrations uniques ou répétées de produits non toxiques, par voie orale, intrapéritonéale ou sous-cutanée.

En fin de procédure, les animaux seront réutilisés au maximum dans d'autres projets au sein du centre de recherche, notamment en ce qui concerne les animaux traités avec le véhicule.

19227 Le cancer est une maladie complexe qui se développe dans n'importe quelle partie du corps et prend des formes variées, en fonction des organes et des tissus affectés.

Ce projet permet d'identifier et de valider les propriétés thérapeutiques de produits anticancéreux et d'anticiper les doses optimales qui devront être testées chez l'homme. Ce projet a permis la validation d'une dizaine de cibles thérapeutiques et d'identifier 3 à 5 pré-candidat médicament pour un développement clinique lors des 5 dernières années.

L'évaluation du potentiel thérapeutique d'un produit anti-cancéreux ne peut être faite chez l'homme (phase 1) sans avoir été, d'abord, testée chez l'animal. Il s'agit de démontrer, d'une part, l'efficacité antitumorale d'un composé administré seul ou en combinaison et d'autre part, l'évaluation des effets pharmacodynamiques sur la cible d'intérêt et l'exposition tissulaire et/ou plasmatique pharmacocinétique.

Tout cela permettant d'anticiper les doses optimales qui devront être testées chez l'homme.

Seuls les produits ayant démontré des propriétés thérapeutiques et pharmacocinétiques intéressantes et favorables (absorption, distribution, métabolisme et excrétion) par des tests *in vitro*, sont sélectionnés pour être testés chez l'animal.

Le rongeur est utilisé pour évaluer la tolérance et les propriétés thérapeutiques des agents anticancéreux, thérapie ciblée, cytotoxique ou immunothérapies.

Les espèces, souris et rat, ont été choisies car ce sont des modèles de première intention en recherche anticancéreuse et les mieux caractérisées. Le développement de nombreuses souches consanguines permet d'obtenir des lots d'animaux génétiquement très similaires, facilitant ainsi les études comparatives.

Les souches de rongeurs immunodéprimés et/ou humanisés sont utilisées pour greffer des tumeurs humaines et les souches d'immunocompétents pour les d'études nécessitant des greffes de tumeurs murines. Et selon les besoins, des souches d'animaux transgéniques peuvent être incluses dans les études, pour intégrer les cibles d'intérêt humaines dans le modèle rongeur.

Les différentes procédures de ce projet permettent d'évaluer la tolérance d'un traitement chez l'animal en l'absence de tumeurs, de caractériser et amplifier des modèles tumoraux, et d'évaluer la relation entre l'exposition d'une substance et son effet sur la cible thérapeutique ainsi que l'efficacité anticancéreuse dans un organisme vivant.

Pour la réalisation des procédures, différents conditionnements et gestes techniques peuvent être mis en pratique.

-L'administration de Doxycycline dans l'eau de boisson

-L'administration d'estradiol dans l'eau de boisson ou sous forme de pellet implanté en sous cutané par chirurgie rapide réalisée dans les règles de chirurgie en vigueur (anesthésie analgésie, technique aseptique)

- L'administration de PEG400 ou d'antibiothérapie per os ou par voie systémique pour détruire le microbiote et éventuellement en implanter un nouveau
- Une irradiation à faible dose (dans le but d'augmenter le taux de prise des cellules humaines) puis l'injection de cellules humaines de différents types.
- Une chirurgie d'exérèse d'un organe (testicule, ovaire, thymus...) selon les règles de chirurgie en vigueur.
- L'implantation de la tumeur (suspension cellulaire ou fragment) en sous-cutané, en intraveineux et en orthotopique.
- L'administration de composés par différentes voies
- La mesure de la croissance tumorale par différentes méthodes (pied à coulisse, imagerie)
- Les prélèvements sanguins
- L'anesthésie pour les prélèvements terminaux (sang, tumeurs, organes,)

Réduire:

Le recours à l'animal valide l'intérêt d'une thérapie possédant ces propriétés in vitro.

Ce projet couvre l'utilisation d'au maximum 91 000 animaux (90 000 souris et 1 000 rats) pour 5 ans.

Un support en biostatistiques est apporté par des experts de la spécialité, afin d'optimiser les méthodes expérimentales employées et réduire le nombre d'animaux utilisés. Ces méthodes sont cohérentes avec l'historique des données, en termes d'animaux utilisés.

Raffiner:

Les études réalisées au sein du centre de recherche sont encadrées par des recommandations internes et validées par la structure du bien-être animal relatives à l'utilisation des animaux (hébergement, soins, manipulation, expérimentations) et ayant pour objectif de prévenir toute douleur ou détresse chez l'animal.

Les expérimentateurs sont formés aux gestes impliquant un contact à l'animal et à l'observation des signes cliniques fondamentaux.

Des critères d'alarme et/ou d'interruption d'études généraux (poids, posture, température, comportement, mouvement ...) et spécifiques (en fonction de la procédure) ainsi qu'un arbre décisionnel d'arrêt d'étude ont été définis par les Responsables du Projet, le SBEA et le CEPAL

Placement/Réutilisation:

Dans la très grande majorité des cas, les animaux ne sont pas éligibles au placement. De même pour de la réutilisation, le nombre d'animaux concerné est très restreint car la plupart des procédures se terminent par une euthanasie. Cette réutilisation ne sera envisagée que pour de la formation à des gestes techniques.

19228 Les anticorps sont des auxiliaires et des réactifs employés non seulement dans des procédés relatifs à la biochimie, la biologie moléculaire et l'immunohistochimie, mais aussi à des fins diagnostiques et thérapeutiques. Ce projet a pour objectif de préparer des souris avec une injection de pristane, afin de favoriser la fabrication d'anticorps au moment de l'injection d'antigènes. La procédure consiste à administrer un adjuvant, le pristane, en intra-péritonéal permettant l'augmentation de l'intensité de la réponse immunitaire. Lors de la production d'anticorps, on tire parti de la réaction naturelle de défense du corps contre des molécules étrangères.

L'utilisation d'animaux pour produire les anticorps d'intérêt est nécessaire car la mise au point des conditions de production in vitro est longue (plusieurs mois) et les rendements sont souvent inférieurs à ceux in vivo. Les développements nécessaires pour chaque production les rendent moins efficaces en termes de mise au point et ils ne sont guère compatibles avec certaines applications comme les screening de molécules. Le développement d'anticorps spécifiques nécessite l'immunisation d'animaux et la récupération des cellules productrices d'anticorps du système immunitaire des animaux immunisés. Les réponses immunitaires spécifiques aux

antigènes nécessitent l'interaction complexe de toutes les cellules du système immunitaire adaptatif de l'organisme vivant et intact.

La règle des 3R s'applique ici pour les principes de réduction et de raffinement.

Nous réalisons le protocole d'injection de pristane à la demande de notre client. Le nombre d'animaux est calculé selon son protocole expérimental. Le nombre d'animaux inclus dans ce protocole est donc fonction du nombre de demandes. Il est estimé à environ 21350 souris sur les 5 ans, avec environ 610 animaux par demande client. De plus, l'utilisation du pristane permet de réduire le nombre d'animaux nécessaires pour atteindre l'objectif du projet de par l'augmentation de la réponse immunitaire pour avoir une production d'anticorps avec moins d'animaux.

Afin de satisfaire au raffinement, un traitement antalgique (Buprénorphine) est utilisé chez les souris avant l'injection de pristane et un volume minimal de pristane à injecter (0.2 ml/animal) a été sélectionné. L'hébergement des animaux sera réalisé dans des locaux appropriés, avec un enrichissement systématique des cages (bâtons de bois à ronger et matériel de nidification) et un personnel formé et habilité réalisera les injections de pristane en respectant les règles d'éthiques, le bien-être animal et le principe des 3R. Nos surveillances quotidiennes nous permettront d'identifier d'éventuelles souris en souffrance et de prendre les mesures nécessaires (surveillance accrue, mise à mort dans les cas les plus graves). Tout animal qui présenterait une perte d'état général sévère sera euthanasié selon une méthode recommandée par la réglementation et, approuvée par le comité d'éthique et la Structure Bien-être Animal.

La procédure d'injection est classée en degré modéré.

19229 Le diabète représente un véritable enjeu de santé publique ; cette pathologie étant classée parmi les urgences sanitaires du XXI^{ème} siècle du fait de l'évolution rapide du nombre de patients. En effet, selon les derniers chiffres de l'atlas de la Fédération Internationale du Diabète, le nombre d'adultes souffrant de diabète dans le monde est passé de 151 millions en 2000 à 463 millions en 2019. Sur le long terme, le diabète est la cause de nombreuses complications dont la néphropathie conduisant à l'insuffisance rénale chronique. À ce jour, malgré des efforts et des recherches considérables, peu d'options thérapeutiques restent disponibles pour les cliniciens pour traiter ou ralentir l'apparition de la néphropathie.

L'objectif de ce projet est donc de déterminer si une approche à double action pharmacologique visant à simultanément activer l'AMPK et bloquer l'action des récepteurs aux cannabinoïdes-1 (CB1R) pourrait être une stratégie thérapeutique efficace pour la néphropathie diabétique. Ces 2 cibles ayant déjà été identifiées comme des cibles thérapeutiques potentielles. Pour cela, nous disposons d'un agent pharmacologique capable de bloquer simultanément l'activité des CB1R et d'activer l'activité AMPK. Nous souhaitons donc tester cette molécule chez des souris diabétiques de type 2 développant une néphropathie diabétique. L'utilisation du modèle animal (souris) s'impose dans ce projet d'une part du fait de l'absence d'outils pharmacologiques validés par l'agence européenne des médicaments (EMA) qui auraient pu permettre la mise en place d'une étude clinique et d'autre part par le besoin d'analyser les mécanismes fondamentaux impliqués dans cette pathologie multifactorielle. De plus, il n'est pas possible d'étudier tous ces aspects et mécanismes impliquant des échanges entre les organes en se limitant à des approches *in vitro*.

Ainsi, nous utiliserons des souris C57BLKS-Leprdb/db adultes (120 souris, 80 mâles et 40 femelles) qui seront soumises à un régime alimentaire enrichi en protéines pendant 9 semaines avant d'être divisées en 4 groupes, le premier sera traité quotidiennement par gavage avec la molécule d'intérêt et le 2^{ème} groupe recevra un placebo dans les mêmes conditions. Les 2 autres groupes seront traités soit avec un inhibiteur CB1R seul soit avec un activateur de l'AMPK. En parallèle, nous utiliserons également des souris non-diabétiques (C57BLKS-Leprdb / + ; 10 mâles et 5 femelles) pour un total de 135 souris.

Le diabète de type 2 pouvant conduire à un risque accru de déshydratation et d'hypothermie, nous opérerons un suivi quotidien des animaux afin de détecter tout dommage imprévu et ainsi intervenir pour soulager/abrèger toute souffrance. Ainsi, les cages seront posées sur des tapis chauffants afin de prévenir l'hypothermie. Pour enrichir le milieu, tous les animaux auront à leur disposition des

carrés de cellulose, une maisonnette et des bâtons à ronger. Enfin, le nombre d'animaux utilisé a été réduit au minimum requis pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et atteindre l'objectif scientifique du projet. Nous avons également limité au maximum l'utilisation d'animaux pour les études mécanistiques en complétant cette approche par l'utilisation d'une approche in vitro sur différentes lignées cellulaires de cellules rénales. En outre, le jour de chaque expérimentation, les souris seront manipulées par des expérimentateurs titulaires du niveau B.

19230 Nous avons montré que l'anticorps anti-CD45RC de rat était capable d'induire une tolérance à l'allogreffe de cœur chez le rat et dans le contexte de développement d'une réaction du greffon contre l'hôte (GvHD ; Graft versus Host Disease) lors de greffes hématopoïétiques. A l'heure actuelle les patients sont traités par immunosuppresseurs, traitement non-ciblé qui provoque des effets secondaires délétères sur la santé. L'anticorps anti-CD45RC, lui, cible spécifiquement les cellules immunitaires responsables de la GvHD et du rejet de greffe.

L'objet de cette saisine est d'évaluer le potentiel thérapeutique de différents variants de l'anticorps anti-CD45RC dans le modèle de GvHD xénogénique par injection de cellules humaines xénoréactives chez la souris humanisée.

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

- Remplacer : Des études fonctionnelles ont été réalisées in vitro à partir de cellules humaines, les résultats sont prometteurs mais sont limités par l'absence du contexte physiologique et de la complexité du système immunitaire et ne peuvent remplacer les études in vivo. Il est donc nécessaire de tester l'efficacité immunorégulatrice de la molécule dans un modèle vivo proche de l'Homme. Une alternative solide à l'utilisation de primates en recherche préclinique est le modèle de souris dites « humanisées ».

- Réduire : Le nombre d'animaux par groupe est réduit à 7, nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs (Ces tests statistiques comparent les souris traitées par rapport à des souris contrôle positif de GvHD. Le test Two Way RM ANOVA évalue la perte de poids au cours du temps. Le Log Rank test évalue les courbes de survie). Le nombre de groupes a été réfléchi de sorte à avoir les contrôles suffisants pour pouvoir conclure quant aux résultats obtenus. Le nombre total maximum d'animaux est de 308.

- Raffiner : Les animaux atteignant une perte de poids de 20% par rapport à leur poids initial seront euthanasiés, ainsi que les animaux montrant des signes physiques caractéristiques d'un mal être tel qu'un changement de comportement. Durant le protocole, les animaux seront suivis pour leur poids et le développement de signes cliniques révélateurs de la GvHD. Des prélèvements sanguins seront effectués tous les 15 jours pour valider la persistance des cellules humaines injectées chez la souris. Tous les animaux traités avec la molécule et ceux des groupes contrôles seront analysés afin d'en obtenir un maximum d'information post-mortem, au niveau anatomopathologique pour les lésions dans les organes dues à la réaction de GvHD, et par immunohistologie pour étudier la migration des cellules injectées et leurs mécanismes d'action.

Les résultats obtenus permettront de déterminer le variant le plus efficace pour retarder le développement de la GvHD. Une escalade de dose permettra d'évaluer la dose nécessaire et suffisante pour une bonne efficacité de l'anticorps à administrer chez la souris, et de mieux comprendre ses mécanismes d'action par les analyses anatomopathologiques des organes des souris traitées. L'anticorps anti-CD45RC fait l'objet d'un brevet vu son potentiel thérapeutique prometteur dans le domaine de la transplantation d'organe solide et de cellules, mais aussi pour le traitement de maladies autoimmunes. La validation de la molécule dans ce modèle préclinique de souris humanisée est la dernière étape indispensable avant les tests cliniques.

19231 Les maladies respiratoires du veau sont responsables de signes cliniques altérant significativement l'état général de l'animal, comme une hyperthermie (parfois supérieure à 40.5 °C), une anorexie, un abattement soudain, des signes respiratoires comme des difficultés à respirer, de la toux, et la présence de bruits respiratoires renforcés audibles à l'auscultation. Dans certains cas on peut observer des écoulements par les naseaux ou les yeux (translucides à purulents). Les veaux qui

guérissent restent souvent abattus et anorexiques pendant un certain temps, ce qui engendre des retards de croissances et donc des pertes économiques pour les éleveurs. A l'examen post-mortem on observe des lésions sur les poumons.

Les agents infectieux responsables de ces maladies peuvent être des bactéries (*Manheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, des mycoplasmes, ...), des virus (virus respiratoire syncytial, virus BHV1,...) ou des parasites (dictyocales,...). L'apparition de ces maladies respiratoires est multifactorielle et dépend, entre autres, de l'agent pathogène responsable de l'infection (facteur déterminant), de caractéristiques liées à l'animal (âge) et de l'environnement (facteurs prédisposant). Dans l'objectif de développement de traitement curatif ou de prophylaxie, il est indispensable de pouvoir maîtriser ces facteurs afin de générer des résultats scientifiquement valides.

Dans le cadre de la recherche et du développement de médicaments vétérinaires destinés à être administrés au veau, les produits destinés à prévenir ou guérir les infections respiratoires permettent de limiter les conséquences d'une maladie et améliorent de façon notable le bien-être de l'animal et le rendement de l'éleveur. La preuve de concept d'efficacité de nouveaux traitements doit être évaluée dans l'espèce cible lors d'un épisode clinique.

Ce projet vise à reproduire expérimentalement les maladies respiratoires dues à des agents infectieux (bactérie, virus, parasite) chez le veau. L'objectif du projet est donc de mettre en place un modèle d'infection respiratoire chez le veau. En effet, l'efficacité d'un traitement doit se démontrer sur la base clinique (prévention de l'apparition de signes cliniques, diminution de ces signes ou guérison clinique) et d'une guérison après élimination de l'agent infectieux. Un modèle de maladie respiratoire expérimentale présente plusieurs avantages par rapport aux maladies respiratoires de terrain. Lors d'une infection expérimentale, la dose inoculée est maîtrisée et les caractéristiques de l'infection peuvent être suivies en stade précoce.

Plusieurs études pourront être requises pour déterminer, pour chaque agent pathogène choisi (virus, bactérie, ...) la dose infectante et le mode d'infection permettant d'avoir suffisamment d'animaux exprimant des signes cliniques. Ces études doivent être conduites dans l'espèce cible dans le respect du bien-être animal et de la règle des 3R, soit en limitant autant que possible le nombre d'animaux utilisés à chaque étude pour mettre en place et valider le modèle.

L'espèce cible est le veau. Etant donné le caractère multifactoriel de cette affection, aucune méthode alternative à l'utilisation d'animaux vivants n'est susceptible de répondre aux objectifs du projet. Le projet inclura plusieurs études. Le nombre d'animaux inclus dans chaque étude sera déterminé selon la finalité de l'étude (vérification de la virulence du pathogène, choix de la dose infectante, méthode d'infection...) dans le respect des textes réglementaires et lignes directrices correspondantes en vigueur et sera optimisé pour chaque nouvelle étude à partir des résultats précédents. Le nombre total d'animaux sur la durée de vie du projet n'excèdera pas 200 animaux et la chronologie des études sera définie de manière à minimiser le nombre d'animaux à utiliser.

Les études réalisées dans le cadre de ce projet seront conduites séquentiellement afin d'obtenir toutes les informations scientifiques nécessaires tout en minimisant le nombre d'animaux utilisés et en préservant leur bien-être autant que possible :

Toutes les manipulations, traitements et prélèvements (sous anesthésie quand requis) seront réalisés conformément aux procédures en vigueur au sein de l'EU par du personnel compétent.

Depuis leur inclusion et jusqu'au dernier jour de l'étude, les animaux seront suivis quotidiennement et si nécessaire les animaux seront soignés et sortis de l'étude ou euthanasiés pour leur éviter toute souffrance excessive ; les conditions d'hébergement permettront aux animaux de répondre à leurs besoins physiologiques et comportementaux.

Les points limites spécifiques à chaque étude seront précisés en détail dans les plans d'études. Les points limites seront, entre autres, toute altération inattendue du comportement propre à l'espèce ou de l'aspect de l'animal, comme une léthargie, une hypothermie en dessous d'un seuil prédéfini dans le plan d'étude, une perte de poids excessive, excrétion de fluide anormale (diarrhée sanglante, ...) dans les heures suivant l'infection ; toute observation laissant présager un mal-être autre que celui dû à l'infection respiratoire ou un mal-être dû à l'infection respiratoire trop important

sera immédiatement signalée au vétérinaire qui viendra examiner l'animal et prendra les décisions adéquates pour le protéger. Si nécessaire les animaux seront traités et sortis de la phase animale ou euthanasiés pour leur éviter toute souffrance excessive.

Les animaux seront tous euthanasiés en fin d'étude et une nécropsie sera réalisée pour évaluer l'étendue des lésions pulmonaires et réaliser des prélèvements microbiologiques.

Ce projet couvre également :

- le recueil d'échantillons pour évaluer la charge infectieuse dans les poumons,
- le recueil de tissus ou organes pour évaluer les lésions macroscopiques et/ou microscopiques de l'infection,
- l'acquisition et le maintien des compétences techniques par le personnel assurant l'application des procédures expérimentales aux animaux, le développement de techniques et/ou méthodes, la validation d'équipements et/ou la génération de données historiques.

19232 Pathologie neuropsychiatrique chronique sévère, la schizophrénie appartient à la classe des troubles psychotiques du DSM-V. Elle affecte 1% de la population mondiale, soit environ 600 000 personnes en France avec un sexe ratio homme/femme de 60/40 et une apparition majoritairement chez des sujets jeunes de 15 à 25 ans.

La maladie se caractérise par des symptômes regroupés en trois catégories : symptômes positifs (délires, hallucinations), symptômes négatifs (retrait social, perte de motivation, anhédonie) et des dysfonctionnements cognitifs (trouble de la mémoire, désorganisation de la pensée).

Les traitements médicamenteux actuels se composent d'antipsychotiques et de neuroleptiques, qui visent principalement à bloquer l'hyperdopaminergie surtout responsable des troubles positifs, tels que l'halopéridol (neuroleptique classique) ou la clozapine (neuroleptique atypique). Mais ces traitements provoquent pour la plupart des effets secondaires et n'agissent pas ou peu sur les symptômes négatifs et cognitifs.

C'est dans ce contexte, et en visant principalement les symptômes négatifs et les dysfonctionnements cognitifs, que l'objectif sera d'évaluer l'activité de nouvelles entités pharmacologiques issues de notre recherche chimique sur des modèles précliniques chez le rongeur exprimant des symptômes de la schizophrénie, et ce, au moyen d'études comportementales.

- Chez le rat ou chez la souris, une exposition prénatale au Poly (I:C), en créant une réponse immunitaire chez la femelle gestante qui perturbe la neurogénèse, induit dans la descendance des perturbations comportementales, neurologiques et immunologiques associées à la schizophrénie (Reisinger et coll. 2015). Des femelles recevront donc une administration de Poly (I :C) à un stade déterminé de gestation et des études comportementales seront réalisées sur la descendance. L'efficacité de nos nouvelles molécules sera alors évaluée suite un traitement aigu ou chronique.

- Une administration subchronique de phencyclidine (PCP) en période prénatale, néonatale ou chez le jeune adulte provoque chez la souris ou chez le rat des symptômes similaires à ceux observés chez les patients atteints de schizophrénie, et plus particulièrement des symptômes négatifs tels que la dépression, le retrait social, des déficits de mémoire. . . (Neill JC et coll. 2010, Lee G and Zhou Y 2019). Des rongeurs (rats, souris) recevront donc, à différents stades de développement choisis selon la procédure une administration subchronique de PCP puis l'efficacité de nouvelles molécules sera évaluée suite un traitement aigu ou chronique sur ce modèle pathologique au moyen d'études comportementales.

- Des souris mutantes pour le gène *Disc1* (Disrupted in Schizophrenia) développent des symptômes caractéristiques de la schizophrénie, notamment un déficit de l'inhibition du réflexe de sursaut (PPI) ou encore un phénotype dépressif (Gomez-Sintes R et coll. 2014). Des souris mutantes *DISC1* commandées chez un établissement éleveur agréé (Charles River) seront utilisées, ce modèle pathologique génétique permettra de tester nos nouvelles molécules suite un traitement aigu ou chronique dans divers tests comportementaux.

- Dans ce projet, les tests comportementaux ciblés sont 1) le test de nage forcée ou FST (Forced Swimming Test), test prédictif de symptômes dépressifs largement décrit et utilisé chez le rongeur et 2) le test d'inhibition du réflexe de sursaut ou PPI (Prepulse Inhibition) dont un déficit caractérise l'incapacité d'un sujet à filtrer des informations inutiles et/ou des anomalies de l'intégration sensorimotrice. L'effet des nouvelles molécules sur le comportement des animaux PCP et Poly (I:C) ainsi que des souris DISC1 va être évalué à l'aide de ces deux tests qui feront chacun l'objet d'une procédure.

Les procédures pourront être conduites sur des souris ou des rats, mâles ou femelles selon les objectifs de recherches. Le rat et la souris sont déjà largement caractérisés d'un point de vue comportemental et neurochimique et ils ont un système nerveux suffisamment évolué pour extrapoler à l'homme certains résultats. Le fait de procéder à des études sur le comportement nous oblige à travailler sur des animaux vigiles.

Nous prévoyons l'utilisation de 7310 animaux au total dans ce projet en prenant notamment en compte les risques de pertes lors d'expositions pharmacologiques pendant la gestation ainsi qu'un minimum de 12 animaux par lot pour permettre l'obtention de données comportementales exploitables et une bonne robustesse statistique des résultats expérimentaux. Les conditions d'hébergement des animaux respecteront strictement la législation ainsi que les indications de la Structure de Bien Etre Animal (SBEA) du centre de recherche. Leur état général sera observé quotidiennement dès leur arrivée dans l'animalerie centrale puis tout au long des procédures. La détresse animale sera minimisée ou diminuée par des actions adaptées (tapis chauffant, meilleure accessibilité de la nourriture ou de l'eau. . .) lorsque des signes cliniques de mal-être seront décelés. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, chaque individu pourra servir à plusieurs tests comportementaux.

19233 Les cellules du système sanguin qui circulent dans le sang se différencient toutes à partir de cellules souches dites hématopoïétiques (qui produisent tous les cellules du sang). Par rapport à la durée de vie humaine, les cellules sanguines ont une durée de vie courte et doivent être constamment régénérées. L'hématopoïèse est donc un processus très dynamique. Toutefois la dynamique précise de la division et différenciation des cellules hématopoïétiques dans la moelle osseuse reste mal connue et est un frein important à l'amélioration de nos soins de santé. En effet une meilleure compréhension de la dynamique de division et différenciation des cellules hématopoïétiques est essentielle pour pouvoir améliorer les protocoles de transplantations de moelle osseuse, les traitements de leucémies (qui résultent d'un dérèglement de ces dynamiques) etc. De plus, les conditions inflammatoires, qui peuvent être récapitulées par des agents immunomodulateurs, peuvent aussi perturber la dynamique et les fonctions des cellules hématopoïétiques, et nécessitent donc aussi d'être étudiées. Ainsi ce projet étudiera les dynamiques (division et différenciation) conduisant à la production des cellules hématopoïétiques chez un animal sain ou après transplantation de moelle osseuse (cellules hématopoïétiques modifiées ou non) ainsi que les effets de différentes agents immunomodulateurs sur ces mêmes souris.

Sur 5 ans, 3664 souris seront utilisées et subiront des dommages faibles. Ce projet implique 4 procédures :

- 1) Test de la dose optimale des agents immunomodulateurs
- 2) Effet d'agents immunomodulateurs sur la production de cellules sanguines
- 3) Etude de la dynamique des cellules hématopoïétiques après transplantation
- 4) Effet de gènes aux propriétés immunomodulateurs

Remplacement : Ce projet a pour but d'étudier les dynamiques de l'hématopoïèse en situation homéostatique (un individu en bonne santé) et perturbées par des agents immunomodulateurs. Dans ce contexte, les modèles animaux comme la souris sont un outil indispensable pour étudier la complexité des voies de différenciation, ce qui ne peut être le cas avec des lignées cellulaires. A l'heure actuelle, il n'y a aucune méthode de remplacement possible.

Réduction : Le choix des agents immunomodulateurs utilisés dans ce projet est le résultat de nombreuses expériences de screening in vitro et d'analyse statistiques avancées à partir de données de

séquençage. Celles-ci nous ont permis d'identifier quels agents avec le meilleur potentiel d'effet sur la dynamique des cellules hématopoïétiques, hypothèses essentielles à confirmer in vivo puisque nous ne savons pas récapituler au complet l'environnement de la moelle osseuse où les cellules hématopoïétiques se différencient normalement. De plus le test de dose optimale des agents immunomodulateurs nous permettra d'assurer des résultats avec le plus grand effet statistique. L'évaluation du nombre d'animaux nécessaire est aussi le fruit d'analyses statistiques basés sur le résultat de précédentes expériences effectuées dans notre laboratoire ou dans la littérature.

Raffinement : Les dommages escomptés maximales pour les animaux utilisés dans ces expériences sont modérés (possibles complications post injections ou prélèvements sanguins, c'est-à-dire infection ou saignement). En accord avec les recommandations internationales dans le domaine de l'hématologie, les animaux sont suivis quotidiennement afin d'assurer leur bien-être et les expérimentations sont arrêtées avant la souffrance des animaux.

19234 Le projet s'inscrit dans le cadre de la lutte contre le cancer. Il vise en particulier à optimiser des outils d'immunothérapie. L'immunothérapie est une approche thérapeutique qui aide les globules blancs du patient à éliminer le cancer. Dans ce contexte, des globules blancs nommés Lymphocytes T sont prélevés du sang du malade souffrant d'un cancer, sont modifiés et injectés de nouveau au patient. Suite à leur modification, ces Lymphocytes T expriment une molécule spécifique qui détecte les cellules cancéreuses et déclenche leur élimination. Cette molécule s'appelle « Récepteur Chimérique à l'Antigène », ou « CAR ». Le Lymphocyte T exprimant ces molécules « CAR », s'appelle « CAR-T ». Jusqu'à présent, les CAR-T ont été utilisés avec succès dans le traitement des cancers du sang, mais pas dans les cancers solides, comme par exemple le cancer de la peau. Le but de notre projet est de développer 6 nouvelles molécules « CAR » et de tester leur efficacité contre des cancers solides, en utilisant deux modèles de cancer chez la souris. L'efficacité de ces molécules « CAR » pourrait dépendre de l'expression d'un facteur nommé « IRAP » (Insulin Responsive AminoPeptidase), qui a été découvert comme essentiel pour la fonction anticancéreuse du Lymphocyte T.

Les cellules cancéreuses seront implantées sous la peau des animaux anesthésiés. Cinq jours plus tard, les souris traitées recevront les « CAR-T » et les souris contrôles recevront des Lymphocyte T qui n'expriment pas les molécules « CAR ». Dans les deux cas, les Lymphocytes T seront injectés par voie intrapéritoneale aux animaux vigile, le geste n'étant pas douloureux. Ensuite, les animaux seront suivis pendant 18 à 40 jours, la croissance du cancer sera suivie en imagerie par résonance magnétique (IRM) une fois par semaine et l'état des animaux sera vérifié tous les jours. L'IRM est une technique d'imagerie médicale basée sur l'effet d'un champ magnétique sur les molécules d'eau composant les organismes. C'est une technique non invasive fournissant des vues en 2 ou 3 dimensions de l'intérieur du corps. À la fin du suivi, les animaux seront euthanasiés pour effectuer des prélèvements sanguins et tissulaires.

Nous utiliserons un nombre maximum de 910 souris pendant 5 ans: 455 pour chacun des deux modèles de cancer, comprenant 210 souris traitées avec des « CAR-T » normaux, 210 traitées avec des « CAR-T » n'exprimant pas IRAP et 35 souris contrôles pour chaque type de cancer. Les souris contrôles seront traitées avec des Lymphocytes T n'exprimant pas le « CAR ».

Notre approche expérimentale prend en compte l'objectif de la règle des 3 R :

Remplacer : Le modèle animal ne peut pas être remplacé ici, car il n'existe aucune autre méthode qui permet d'explorer l'activité anticancéreuse de ces nouvelles molécules « CAR ».

Réduire : Le nombre d'animaux utilisés pour mener à bien ce projet a été réduit au minimum pour chaque modèle, tout en assurant des résultats statistiquement interprétables. Le nombre d'animaux par groupe a été choisi d'après des études préliminaires.

Raffiner : Nous avons choisi le modèle de souris le mieux adapté à notre projet. Les animaux seront gardés en permanence en groupe, dans leurs cages habituelles, dans un milieu enrichi. Les souris seront surveillées tous les jours de la semaine en observant la taille de la tumeur, leur poids par rapport au poids initial et leur pelage. Nous avons défini une liste des points limites suffisamment précoces et prédictifs qui, s'ils sont atteints, conduiront à l'euthanasie des animaux.

19235 La maladie de Huntington (MH) est une maladie neurodégénérative d'origine génétique sans traitement curatif. Elle se caractérise par la mort de neurones du système nerveux central, ce qui provoque d'importants troubles moteurs, cognitifs et comportementaux chez les patients. Un défi majeur est de retarder l'âge d'apparition des symptômes et de ralentir la progression de la MH.

La production et l'élimination du cholestérol, qui est essentiel pour le cerveau, est altéré dans la MH. En particulier, la quantité de l'enzyme cholestérol 24hydroxylase (CYP46A1), qui dégrade le cholestérol, est diminuée, et sa réexpression par thérapie génique est neuroprotectrice in vitro et dans des souris modèles de la MH.

Le métabolisme du cholestérol implique un dialogue finement régulé encore mal compris entre les neurones mais aussi leurs partenaires, les astrocytes. Les études pilotes montrent que la thérapie génique avec CYP46A1, qui vise à rétablir l'expression de cette enzyme dans les neurones, impacte aussi les astrocytes et les rend réactifs. Nous faisons l'hypothèse que les astrocytes réactifs sont impliqués dans les effets bénéfiques de cette stratégie thérapeutique.

L'objectif de ce projet est de mieux définir le potentiel thérapeutique de la thérapie génique avec CYP46A1 dans un modèle murin pertinent de la MH et de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués. D'une part, il s'agit d'établir si les astrocytes réactifs sont impliqués dans les effets thérapeutiques de la CYP46A1 : une approche préclinique complète évaluera les effets thérapeutiques au niveau moléculaire, histologique, biochimique, métabolique, comportemental et de la connectivité cérébrale. Il s'agit également de comprendre quels sont les effets de CYP46A1 sur la morphologie des astrocytes du striatum et leur transcriptome (ensemble des gènes exprimés par une cellule).

Pour cela, les souris anesthésiées recevront des injections intracérébrales de vecteurs viraux dans le striatum et seront analysées par un panel d'approches précliniques (analyse des performances motrices et des altérations comportementales par des tests du comportement, de l'imagerie cérébrale non invasive sur souris anesthésiée, par résonance magnétique nucléaire pour identifier des altérations morphologiques et du métabolisme cérébral et enfin par des techniques d'analyses post-mortem variées).

Ce projet prévoit l'utilisation d'un modèle souris de la MH qui est le modèle animal le plus adapté permettant de mettre en place toutes les approches expérimentales nécessaires à sa réalisation, en particulier l'analyse du comportement et l'imagerie cérébrale. Les méthodes expérimentales ont été choisies en accord avec le vétérinaire de l'installation, pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux.

Conformité de la règle des 3R

Ce projet est basé sur des résultats obtenus in vitro qui ont mis en évidence les effets bénéfiques de la modulation du métabolisme du cholestérol dans le contexte de la MH. Le cerveau est un organe complexe dans lequel interviennent de nombreuses interactions entre neurones et différentes cellules, dont les astrocytes. Ces interactions qui sont très probablement à la base des effets thérapeutiques de CYP46A1 ne sont pour le moment pas fidèlement reproduites dans des modèles in vitro ou in silico, ce qui nécessite l'utilisation de modèles animaux. En particulier, il existe des souris transgéniques modèles de la MH qui ont la mutation génétique responsable de cette maladie et permettent d'étudier les neurones et les astrocytes dans leur environnement cérébral. Ces souris modèles ont également l'avantage de permettre d'évaluer des symptômes cliniques très importants de la MH : les altérations comportementales (ex. atteintes motrices, anxiété), les déficits métaboliques et les altérations des connexions cérébrales, ainsi que leur potentielle restauration par notre stratégie thérapeutique.

Le projet prévoit au maximum 310 souris nées dans notre élevage. Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux sera réduit au minimum nécessaire permettant une interprétation statistique fiable des résultats. Les mêmes souris seront étudiées par des tests comportementaux ou d'imagerie cérébrale non-invasive, suivis d'analyses biochimiques, histologiques et de biologie moléculaire post-mortem, de manière à réduire le nombre total d'animaux nécessaires et d'obtenir le plus d'information pertinente par souris.

Le suivi quotidien des souris hébergées en groupe dans un milieu enrichi et l'application de critères d'arrêt en élevage et en expérimentation, permettra de garantir leur bien-être. En cas d'apparition d'effets inattendus, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés. La gestion de la douleur et de l'inconfort liée aux procédures expérimentales mettra en œuvre des méthodes d'anesthésie et d'analgésie pré- et post-opératoire, un soutien nutritionnel et thermique, ainsi qu'un suivi clinique post-opératoire incluant la prolongation des traitements analgésiques si besoin.

19236 La présente demande d'autorisation de projet s'inscrit dans un contexte de la validation des compétences et le suivi des formations des usagers de notre structure pour former, entraîner et/ou ré-entraîner nos concepteurs de projets et personnels appliquant les procédures expérimentales (tous détenteurs d'un niveau de formation initiale réglementaire) à un ensemble de gestes expérimentaux. En effet, plus les utilisateurs sont entraînés, plus les gestes sont efficaces et plus cela garantit le respect du confort des animaux des futurs projets. Ces usagers, qui nécessitent un apprentissage ou une mise à jour de leurs compétences seront encadrés pour la mise en œuvre pratique et la réalisation de certains gestes techniques de base afin de pouvoir travailler en totale autonomie et en aisance technique. Il s'agit ici d'une "formation à la demande", les animaux ne subiront toutes les procédures que très rarement (un apprenant ne s'exerçant qu'au geste dont il a besoin).

Les gestes expérimentaux seront validés par notre vétérinaire référent en termes de mise en œuvre et bien être animal :

-chez le rongeur vigile en procédure légère : préhension, contention manuelle et administrations d'eau de boisson par voie orale (gavage) ou sérum physiologique stérile par voie sous-cutanée, intramusculaire, intrapéritonéale, ou prélèvements sanguins à la veine de la queue ;

-chez la souris anesthésiée en procédure sans réveil : ponction intra cardiaque.

Conformité/exigences de remplacement, de réduction et de raffinement :

Remplacement : L'absence de méthodes substitutives à l'utilisation d'animaux est justifiée ici car les gestes envisagés ne peuvent se pratiquer que sur des animaux vivants.

Réduction : le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum tout en permettant la répétition des actes expérimentaux dans le respect des volumes tolérés pour chaque animal et avec des périodes de repos suffisantes entre les utilisations d'un même animal. Le nombre d'animaux utilisé sera limité à l'acquisition du geste par l'apprenant. Dès lors que le geste sera validé par le formateur, l'utilisation d'animaux par l'apprenant pour ce geste sera stoppé. De plus, les animaux utilisés seront issus de surnuméraires d'élevage ou de projets avec procédures légères avec accord du vétérinaire référent.

Raffinement : le bien-être de nos animaux sera pris en compte tout au long du projet : conditions d'hébergement des animaux adaptées, présence d'enrichissement dans les cages, visite quotidienne par du personnel qualifié. Pour l'ensemble de ces formations des critères d'arrêt par rapport aux points limites seront appliqués.

Nous estimons devoir former maximum (a) 20 personnes par an en utilisant 3 souris et 3 rats par personne pour l'ensemble des gestes d'administrations ou prélèvements (sachant que les animaux peuvent être ré-utilisés dans ces procédures mais pas plus de 3 administrations ni plus de 2 prélèvements par animal par séance d'apprentissage – pas plus de 3 séances par animal, espacées de minimum 24h de repos) ; (b) 10 personnes par an pour ponction intra-cardiaque (sachant que les animaux ne seront utilisés qu'une fois pour cette procédure). Nous prévoyons un nombre maximal total d'animaux utilisés dans le projet de 300 souris et 300 rats maximum sur 5 ans. 600 est un maximum, le nombre réel sera inférieur en fonction des possibilités des réutilisations des animaux dans ce projet. Un apprenant ne sera formé qu'aux gestes qui lui sont nécessaires dans son projet.

19237 La mucoviscidose est une maladie génétique qui induit un défaut d'efflux chlorures liés à la déficience du gène qui code pour une protéine appelée CFTR et la principale cause de morbidité et de mortalité est liée à une obstruction des voies aériennes. À l'heure actuelle, il n'existe pas de

traitement efficace pour les patients n'ayant pas de protéine CFTR et d'autres stratégies thérapeutiques doivent être envisagées. Une solution proposée est d'activer d'autres canaux chlorures qui compenseraient le défaut de CFTR. Une activation d'autres canaux permettrait une restauration des efflux chlorures de façon indépendante à la protéine CFTR.

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

Ce projet a pour but de montrer que la molécule testée, qui sera injectée par voie systémique, peut avoir des effets bénéfiques chez les souris qui ne se limitent pas à une amélioration des paramètres ventilatoires et cette approche a pour but d'être proposée aux patients atteints de mucoviscidose.

- Afin de limiter le nombre de souris (Remplacer), ce projet fait suite à des expériences déjà effectuées in vitro et ex vivo sur des cellules de patients que notre molécule était également active sur des cellules d'autres organes (os, pancréas, intestin...). Pour comprendre ce que cela entraîne dans un animal entier vivant nous sommes obligés de passer par un modèle animal afin de voir si une administration systémique pourrait être envisagée pour corriger l'ensemble des problèmes liés à la mucoviscidose chez les patients et la souris. Les souris atteintes de mucoviscidose meurent au moment du sevrage d'une obstruction digestive qu'il est possible de compenser en leur donnant un laxatif. Le projet a pour but de traiter les animaux par injections sous-cutanées de notre molécule au moment du sevrage et tous les 15 jours. Nous espérons montrer sur ce modèle murin transgénique possédant une mutation très spécifique que l'on retrouve chez des patients atteints de mucoviscidose une amélioration des symptômes intestinaux qui permettrait d'améliorer la survie des souris. Des résultats sur ce nouveau modèle permettront d'envisager une approche thérapeutique pour tous les patients atteints de mucoviscidose.

- Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés (Réduire), ce projet fait suite à des expériences déjà effectuées in vivo et ex vivo sur des cellules humaines, mais l'utilisation de modèles murins s'avère indispensable pour envisager de futures études cliniques. Nous limiterons le nombre d'animaux à 24 issus de la reproduction de 8 progéniteurs, ce qui correspond, à la vue des résultats précédents, au nombre de souris permettant d'avoir des données statistiques suffisantes pour l'obtention de résultats valides.

- Les souris seront suivies quotidiennement dans les premiers jours d'injection puis de façon quotidienne (Raffiner). Durant ces différentes phases, une pesée sera effectuée et une perte de poids de plus de 20% entraînera l'euthanasie de l'animal pour éviter toute souffrance. Des résultats de toxicité à 50 fois la dose ont été effectués par une CRO indépendante ont montré une absence de toxicité sur le modèle murin.

19238 La vue est un sens très précieux, et sa perte hautement handicapante. La rétinite pigmentaire (RP) est une maladie héréditaire caractérisée par une dégénérescence des cellules de la rétine, conduisant à une perte de vision irréversible et, à long-terme, une cécité totale. Alors que la RP peut être causée par des mutations sur un grand nombre de gènes, la maladie progresse selon des étapes bien identifiées. La thérapie génique, qui consiste à apporter un gène médicament directement aux cellules malades, représente une perspective de traitement pour empêcher la perte de la vue.

L'approche retenue dans ce projet consiste à apporter directement sous la rétine, à proximité de la fovéa (structure de la rétine responsable de l'acuité visuelle), un gène permettant de préserver la vision quelle que soit la mutation en cause. Ce gène permet la production d'une protéine appelée « GIRK », codant un canal ionique qui génère un signal électrique transmis aux aires visuelles. Les résultats obtenus dans un modèle de RP chez le rongeur montrent que l'expression de GIRK dans les photorécepteurs (cellules à bâtonnets et cellules à cônes) de la rétine conduit effectivement à une amélioration visuelle significative.

Le recours à des modèles animaux s'avère indispensable pour évaluer l'efficacité de notre démarche, le sens de la vision étant impossible à reproduire in vitro ou dans des modèles ne représentant que partiellement un organisme. Le modèle rongeur n'est pas le modèle le plus adapté, les rongeurs ne possédant pas de fovéa, donc pas de régions riches en cônes, qui représentent la cible du traitement envisagé dans ce projet. Le modèle primate non-humain, dont l'anatomie de l'œil, et notamment de la rétine, ainsi que le système immunitaire sont plus proches de ceux de l'humain, représente le modèle d'étude le plus pertinent pour envisager un passage ultérieur en phase clinique chez l'être humain.

Dans cette étude, nous analyserons uniquement l'expression de la protéine GIRK dans les cellules à cônes, par imagerie et études histologiques, en fonction de la dose de gène injectée.

Ce projet s'appuie sur des études préalables in vivo chez le rongeur. Le nombre d'animaux a été réduit au minimum nécessaire pour permettre l'interprétation statistique des résultats. La mise en œuvre d'un suivi longitudinal non invasif par imagerie in vivo permettra également de réduire le nombre d'animaux utilisés ainsi que la contrainte qui leur est imposée. Ainsi, 9 animaux, nés et élevés en captivité dans un établissement agréé, seront utilisés sur une période de 5 ans pour évaluer 3 doses différentes d'injection de gène. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions, qui seront réalisées sous anesthésie générale (injection du traitement, imagerie in vivo) renforcée par des traitements analgésiques et anti-inflammatoires. Une observation régulière des animaux sera faite pour détecter tout signe de détresse, et des points limites sont prévus pour prendre en compte des effets inattendus. Les animaux seront hébergés en groupe, dans des conditions enrichies favorisant les interactions sociales.

19239 Les infections fongiques invasives sont une cause majeure de morbidité et de mortalité, avec plus de 800 000 décès par an dans le monde. Les espèces *Candida albicans* et *Candida glabrata* sont les pathogènes les plus souvent incriminés dans les infections fongiques à levures. Actuellement, seules quatre classes de médicaments sont disponibles pour traiter ces infections. Ces médicaments agissent en ciblant la paroi et la membrane fongiques, ou en inhibant leur multiplication.

Le nombre limité de traitements antifongiques, le coût élevé et la toxicité des médicaments disponibles, l'augmentation des souches résistantes et l'augmentation du nombre de patients à traiter rendent indispensables (i) le développement de nouveaux agents thérapeutiques et (ii) l'amélioration de l'efficacité et de la tolérance des médicaments existants.

Ce projet consiste à étudier une nouvelle stratégie thérapeutique antifongique en se basant sur l'utilisation de composés anticancéreux ou anti-inflammatoires qui ciblent une famille spécifique de régulateurs de l'expression des gènes. La découverte d'inhibiteurs de ces protéines humaines a permis d'établir qu'elles sont des nouvelles cibles thérapeutiques anticancéreuses. En effet, l'inhibition de la fonction d'une de ces protéines entraîne, dans des expérimentations sur des cultures de levures, une disparition des caractéristiques associées à la virulence (défaut de croissance, défaut de filamentation, sensibilité à différents stress) et une incapacité pour la levure à se développer et à se multiplier.

A ce stade, après validation in vitro et/ou in vivo sur modèle alternatif invertébré, des expérimentations animales sont indispensables afin de confirmer la pertinence thérapeutique de l'inhibition de ces protéines dans les levures *C. albicans* et *C. glabrata* dans un contexte d'infection fongique disséminée (REEMPLACER). Les modèles cellulaires ne permettent pas d'analyser la réponse immunitaire associée à une infection. Le recours à des animaux vivants (modèle murin) est indispensable pour évaluer l'efficacité des traitements par la diminution réelle de la virulence des levures après inhibition de ces protéines. Les animaux étudiés seront des souris nées en captivité et provenant d'élevages reconnus et autorisés. Le nombre maximal d'animaux nécessaire a été évalué à 432 grâce aux expériences décrites dans la littérature et a été REDUIT au maximum tout en garantissant la significativité des résultats. Les animaux seront hébergés dans un établissement agréé, surveillés durant toute l'expérience afin de détecter tout signe d'inconfort. Des

critères d'arrêt de l'expérience sont définis précisément et permettent d'éviter toute souffrance inutile. Les protocoles d'anesthésie sont clairement établis dans le but de RAFFINER.

19240 Chez l'homme, le cancer de la prostate est la première cause de morbidité et la troisième cause de mortalité par cancer. Les traitements de référence comme la radiothérapie et la chimiothérapie induisent des effets indésirables comme l'incontinence ou l'impuissance pour une efficacité limitée. L'utilisation de traitements thermiques ciblés est une voie prometteuse pour augmenter l'efficacité et diminuer la toxicité des traitements conventionnels du cancer de la prostate. Différentes sources d'énergie thermique (Ultrasons Focalisés de Haute Intensité, Cryothérapie, Lasers, ...) ont déjà été proposées pour cette indication. Néanmoins, la diffusion de ces énergies a encore un impact négatif à l'origine d'effets secondaires. Une nouvelle approche propose d'utiliser différentes sources d'énergie (champ magnétique alternatif, ultrasons à basse fréquence, laser 808nm) pour induire un effet thermique local et modéré potentialisé par l'accumulation de nanoparticules d'oxyde de fer dans la tumeur. L'utilisation des nanoparticules montre un potentiel grandissant comme outils de diagnostic, pour traiter des pathologies comme l'anémie mais aussi dans le traitement de certains cancers. Pour les traitements anticancéreux, ces nanoparticules sont accumulées dans la tumeur et peuvent absorber de l'énergie provenant de différentes sources externes pour générer une augmentation localisée de la température. Cela peut induire par la chaleur la destruction sélective de la tumeur sans occasionner d'effets secondaires graves/irréversibles. On parle d'hyperthermie magnétique pour l'utilisation d'un champ magnétique alternatif ou d'hyperthermie ultrasonique pour l'utilisation d'ultrasons.

Au laboratoire, nous développons plusieurs traitements innovants qui reposent sur l'utilisation de l'hyperthermie. Pour activer ce type de traitement, nous utilisons des nanoparticules d'oxyde de fer plus efficaces répondant mieux que des nanoparticules classiques aux différentes sources d'excitation comme le champ magnétique, les ultrasons ou la lumière. L'administration des nanoparticules se fait en voies intra-tumorale ou intra-veineuse. Nous avons démontré l'efficacité de ces nanoparticules dans le traitement, par hyperthermie ultrasonique chez la souris, de tumeurs de la prostate implantées en sous cutané. Avant le passage en phase clinique, il est indispensable de comprendre le devenir des nanoparticules une fois injectées dans l'organisme vivant. C'est pourquoi, ce projet cherche à étudier sur des souris mâles adultes (n=840) la bio-distribution, l'élimination et la toxicité des nanoparticules d'oxyde de fer, après leur injection intra-tumorale ou intra-veineuse, sous les conditions optimales du traitement déterminées avec l'ultrason à basse fréquence.

Ce projet a été conçu en utilisant la règle des 3R. C'est-à-dire : en substituant l'utilisation des animaux par une méthode alternative quand cela était possible (Remplacer) ; en limitant au strict nécessaire le nombre d'animaux utilisé au cours de cette étude (Réduire) ; en définissant des points limites concernant le bien-être des animaux, la prise en compte de la douleur, l'arrêt des traitements, l'euthanasie des animaux et en appliquant le suivi journalier des animaux et l'enrichissement du milieu par installation d'un élément de nidification (Raffiner). Au préalable, une étude in vitro est réalisée pour déterminer la dose de nanoparticules à administrer dans les tumeurs chez la souris ainsi que les paramètres d'application des ultrasons à basse fréquence permettant d'activer le traitement thermique. Le nombre de souris (840 sur une période de 5 ans) a été finement défini afin de pouvoir obtenir des résultats fiables et reproductibles. Des points limites classiques mais aussi spécifiques ont été prévu concernant notamment d'éventuelles effets secondaires liés au traitement thermique sur les tissus sains des souris pour permettre la meilleure adéquation entre l'obtention des informations scientifiques et le respect absolu de la souffrance et du bien-être animale.

19241 L'accident vasculaire cérébral (AVC) est la 2nd cause de décès dans le monde et la 1^{ère} cause de handicap acquis chez l'adulte dans les pays industrialisés. Il se produit lorsqu'un vaisseau sanguin du cerveau est obstrué (accident ischémique) ou rompu (accident hémorragique). L'interruption de l'apport de sang au cerveau provoque une cascade d'événements conduisant à de sérieux dommages cellulaires qui se traduisent par de lourdes conséquences fonctionnelles. L'un des facteurs principaux pouvant conduire à la mort du patient est l'œdème cérébral. Il se forme par

infiltration progressive de sang dans les tissus, causant une hypertension intracrânienne responsable de la majorité des décès consécutifs à un AVC. Les premières heures qui suivent un AVC ischémique (AIC) sont déterminantes quant à ses conséquences. Actuellement, aucun traitement médicamenteux n'est efficace contre cet œdème. Les approches thérapeutiques actuelles visent à rétablir la circulation sanguine. Cependant, elles ne protègent pas les cellules cérébrales et ne peuvent contrer l'œdème, qui ne peut être soulagé que par une chirurgie décompressive invasive : l'hémicraniectomie. De plus, elles ne permettent d'intervenir que sur une fenêtre temporelle très courte après l'occlusion du vaisseau, au-delà de laquelle les dommages cellulaires sont trop étendus et le risque d'hémorragie trop élevé.

L'objectif aujourd'hui pour la recherche est de proposer un traitement neuroprotecteur permettant d'élargir cette fenêtre thérapeutique en protégeant les cellules le temps de restaurer la circulation dans le tissu et en limitant l'œdème cérébral. Les recherches précédemment menées au laboratoire ont permis d'identifier et de sélectionner un candidat médicament répondant à ces attentes. C'est un inhibiteur de kinases dépendantes des cyclines (CDKI) qui permet une réduction du volume de l'œdème de 50% et protège l'unité neurovasculaire (UNV), un complexe de cellules à l'interface entre le sang et le tissu cérébral. L'objectif de cette étude s'inscrit dans la continuité des travaux de notre équipe et est de comprendre quels mécanismes et quelles interactions permettent l'effet anti-œdémateux et neuroprotecteur du CDKI. L'objectif final de ce projet est de pouvoir tester cette molécule en phase de développement clinique dans le but de développer une nouvelle stratégie thérapeutique pour la prise en charge précoce des AIC, permettant d'améliorer les chances de récupération des patients.

A cet effet, nous comparerons l'expression de protéines très impliquées dans la formation de l'œdème cérébral : les aquaporines-4, chez des rats recevant le traitement à ceux recevant le placebo. D'autre part, l'activation des cellules immunitaires autour de l'ischémie dégrade l'unité neurovasculaire et aggrave l'œdème cérébral en proliférant et libérant de nombreuses molécules inflammatoires. Nous avons montré que ce CDKI bloque la prolifération de ces cellules après une ischémie cérébrale. Par conséquent, nous souhaitons étudier ici son effet sur les molécules inflammatoires libérés par les cellules immunitaires du cerveau lors de l'AVC. L'inhibition de l'inflammation cérébrale pourrait également s'accompagner d'une inhibition de l'inflammation périphérique (globules blancs sanguins). Nous étudierons ainsi l'effet de ce CDKI sur les globules blancs, cellules également impliquées dans les effets délétères de l'AVC.

Au total, 240 rats Sprague-Dawley seront inclus dans ce projet comportant deux procédures : une procédure sévère réalisée selon les principes d'asepsie et permettant de générer un AVC chez le rat, et une procédure de classe sans réveil pour la mise à mort par une méthode non réglementaire justifiant une dérogation. Ce modèle nous permet de reproduire au plus près les mécanismes d'occlusion vasculaire causant un AVC ischémique chez l'homme. Les animaux recevront ensuite un traitement : soit notre candidat médicament, soit un placebo. Ils seront ensuite mis à mort 24 ou 48h après l'induction de l'AVC afin d'étudier l'effet du traitement sur les tissus cérébraux et sanguins à un stade précoce de l'AVC.

S'il existe des modèles alternatifs in vitro recréant des conditions ischémiques sur des cultures de cellules cérébrales, ils ne permettent pas d'étudier les mécanismes inflammatoires complexes et coordonnés entre différents tissus (cerveau-sang), formés de multiples types cellulaires, ni le développement de l'œdème cérébral et sont donc inappropriés à notre étude. Cependant, en accord avec les exigences de remplacement et de réduction, des tests in vitro ont préalablement permis de sélectionner la molécule traitement parmi plusieurs candidats médicaments et de définir une gamme étroite de concentrations efficace in vivo. Une étude pilote réalisée chez l'animal a permis d'ajuster la dose et de tester différentes voies d'administration du traitement en vue de réduire le nombre d'animaux utilisés. Les expérimentateurs étant déjà formés au modèle, aucun animal supplémentaire ne sera inclus pour la formation et la mise au point des techniques chirurgicales. Afin de réduire le nombre d'animaux nécessaires à notre étude tissulaire, les cerveaux seront inclus en paraffine, un composé permettant de conserver les tissus à long terme et de les réutiliser pour étudier plusieurs paramètres. Pour raffiner, une période d'acclimatation d'une semaine sera respectée à l'arrivée des animaux. Ils seront hébergés par deux, en milieu enrichi avec un tunnel

en PVC. Dès leur entrée dans la procédure sévère, ils bénéficieront d'un suivi adapté par l'utilisation d'analgésiques et d'antalgiques selon les critères définis dans notre table de suivi de soins. A l'issue de la chirurgie, leur bien-être (poids, comportement et apparence) sera évalué tout au long du protocole et comparés à notre liste de points limites.

19242 La résistance aux antibiotiques constitue un réel problème de santé publique. L'ampleur de ce phénomène est telle qu'il est qualifié comme l'une des trois principales menaces en termes de santé publique du 21^{ème} siècle par l'Organisation Mondiale de la Santé. L'apparition des bactéries multirésistantes (BMR) a entraîné l'émergence d'infections presque incurables qui ne laissent que peu d'alternative fiable de traitement pour les cliniciens. La dissémination globale de ces bactéries complique non seulement les traitements mais implique la mise en place de mesures d'isolement dans les établissements de santé et augmente la mortalité chez les patients. La transplantation de microbiote fécal (TMF) est une procédure thérapeutique qui permet de rétablir un microbiote riche, équilibré et diversifié dans l'intestin d'une personne (receveur) via l'administration d'une suspension fécale issue d'un individu sain (donneur). Ce traitement dont l'efficacité est prouvée et recommandée pour le traitement des infections récidivantes à Clostridiodes difficile pourrait être une stratégie intéressante à envisager pour décoloniser efficacement les porteurs de BMR au niveau intestinal en permettant le rétablissement d'un microbiote équilibré. En effet, le microbiote intestinal est le principal réservoir de BMR et son déséquilibre en favorise l'émergence.

Notre objectif est d'étudier l'effet de la transplantation de microbiote fécal préparé selon divers protocoles sur la décolonisation des BMR.

L'impact de la TMF sur le microbiote intestinal et sur le dialogue microbiote-hôte est un processus extrêmement complexe et dynamique que seule l'expérimentation animale peut mimer le plus fidèlement possible. Nous utiliserons donc un modèle murin de portage intestinal de BMR, portage induit par une pression antibiotique qui entraîne un déséquilibre du microbiote intestinal favorisant l'implantation de ces bactéries comme chez les patients. Il s'agit d'un projet de recherche translationnelle. Les souris seront traitées par antibiotique via l'eau de boisson et les souches d'intérêt (BMR) leur seront administrées par gavage. Une fois l'implantation de la souche de BMR vérifiée par une analyse sur des prélèvements de fèces, une TMF sera réalisée par gavage. Le suivi du portage de la souche BMR après TMF sera réalisé par recherche dans les selles. Ce projet nécessitera 1020 souris pour l'ensemble des procédures expérimentales sur une période de 5 ans. Ce nombre rend compte des différents modèles (plusieurs types d'antibiothérapie, plusieurs types de BMR) et groupes (type de TMF). Ce nombre a été élaboré en respectant la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner).

Remplacer : Le modèle BMR/TMF n'est à l'heure actuelle pas remplaçable car aucune approche in vitro ne permet de rendre compte de la complexité de l'impact et du mécanisme d'une TMF sur la décolonisation intestinale de BMR. Seuls les transplants fécaux qui au regard des connaissances actuelles et d'une sélection au préalable in vitro et qui nous semblent les plus prometteurs seront testés chez l'animal.

Réduire : Les groupes ont été conçus de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Un calcul statistique a été réalisé afin d'évaluer le nombre d'animaux à inclure pour obtenir des résultats significatifs tout en minimisant ce nombre. Ces calculs ont été possibles grâce aux données de la littérature.

Raffiner : Le soin et le suivi des animaux seront évalués par des personnes compétentes et expérimentées, quotidiennement par le zootechnicien et de manière bi-hebdomadaire par l'expérimentateur. Il s'agit d'un modèle de portage donc d'un modèle léger. Des points limites bien définis à l'aide d'une grille de score sont mis en place avec réhydratation ou euthanasie selon les scores atteints.

A terme, ce modèle permettra de caractériser et d'évaluer la(les) meilleure(s) préparation(s) permettant une décolonisation efficace des BMR intestinales. Cette validation de l'efficacité de la TMF sur la décolonisation de BMR offrirait en clinique une solution thérapeutique à ces infections et pourrait également freiner la dissémination de ces bactéries.

19243 La coccidiose, causée par des parasites du genre *Eimeria*, représentent le premier fléau parasitaire de l'aviculture induisant des pertes de production ayant de graves conséquences économiques dues à de la mortalité mais surtout de la morbidité. L'infection par *Eimeria* conduit à une inflammation intestinale importante. L'inflammation intestinale a pour conséquence une rupture de la barrière épithéliale qui, à l'homéostasie, protège l'animal contre l'invasion par les bactéries commensales ou pathogènes du microbiote intestinal. Ainsi, il a été montré une prédisposition des oiseaux infectés par *Eimeria* à développer des pathologies secondaires telles que l'entérite nécrotique due à *Clostridium perfringens* ou des affections osseuses. Ces données soutiennent l'hypothèse d'une perméabilité importante de la barrière intestinale causée par *Eimeria*.

L'objectif premier de ce projet est d'étudier la perméabilité intestinale.

Pour ce faire nous utiliserons au maximum 480 poulets EOPS (exempt d'organisme pathogène spécifique) âgés de 3-7 semaines en fin d'expérimentation et de sexe indifférent.

Les animaux seront inoculés ou non par voie orale par *Eimeria* (témoins non infectés). Les animaux recevront oralement une solution de molécules de poids moléculaire variable (un mélange d'une grosse et d'une petite molécule BSA et Na-FITC ou une solution de Dextran-FITC, molécule de poids moléculaire intermédiaire). Afin de déterminer l'importance des dommages de la barrière intestinale, des prises de sang seront effectués. Les plus petites molécules passeront plus rapidement dans le sang que les grosses molécules qui ne passeront que quand l'épithélium est complètement érodé. Ainsi, plus les grosses molécules sont présentes dans le plasma, plus les dommages de la barrière intestinale sont importants.

Dans ce projet la règle des 3R est respectée comme suit :

Remplacement : l'étude de la perméabilité intestinale ne peut être réalisée in vitro.

Réduction : Le nombre d'animaux par lot est adapté aux buts de cette expérimentation pilote, preuve de concept. Il y aura 10 animaux par lot (4 temps : 30min, 1h, 2h, 4h, 10 animaux par groupe, infectés et non infectés = 80 poulets EOPS x2 molécules (mélange NaF et BSA) et dans une autre expérimentation une solution de Dextran-FITC / espèce parasite = 160. Pour tester la perméabilité avec 3 espèces parasite indépendamment : 480 poulets au total).

Raffinement : Les poulets seront hébergés en cages adaptées à leur taille, dans des conditions environnementales contrôlées, avec nourriture et eau à volonté et disposeront d'un enrichissement social et comportemental (dans les cages : petites plaques en inox suspendues ce qui permet aux animaux de piquer dedans et tapis plastique pour soulager les pattes). En ce qui concerne les prélèvements de sang, les prises de sang aussi rapprochées dans le temps sur le même animal peuvent être compliquées (cause d'hématomes pas résorbés) et causer une souffrance de l'animal. Nous avons donc décidé d'utiliser un animal par temps. Une visite quotidienne est réalisée dans la salle expérimentale afin de surveiller l'état général des animaux et l'apparition d'éventuelle symptômes liés à la maladie : plumes ébouriffées, prostration, ailes pendantes. Pour *E. tenella*, l'espèce la plus virulente, les symptômes arrivent souvent vers le 6ème jour d'infection. Cet état peut s'accompagner de diarrhées hémorragiques pour l'espèce *E. tenella*. Même si les doses administrées sont déterminées de manière à éviter toute pathogénicité qui entraverait le développement cette étude, le point limite défini est l'observation d'un état de prostration tel que l'animal ne s'alimente plus. La décision est prise de le mettre à mort.

19244 Les probiotiques de type bactérie ou levure sont définis comme des microorganismes vivants pouvant apporter un bénéfice au bien-être et à la santé humaine. Par exemple, certaines levures, sous forme de médicaments ou de compléments alimentaires, sont prescrites dans le traitement des diarrhées induites par les antibiotiques ou dans les troubles gastro-intestinaux (colique) chez l'enfant. Le but du projet est l'étude du devenir d'un microorganisme probiotique dans l'organisme suite à son administration orale. Cette étude pharmacocinétique chez l'animal permettra de déterminer des paramètres comme la concentration maximale (C_{max}), le temps au bout duquel cette concentration est atteinte (T_{max}), le temps au bout duquel la concentration du probiotique est stable (steady-state), la demi-vie ou temps au bout duquel la quantité du composé est réduite de moitié (demi-vie d'élimination), et le temps d'élimination pour ne citer que les principaux. La

quantification des probiotiques sera réalisée dans les crottes étant donné que ces microorganismes ne sont pas absorbés dans le tube digestif et ne rejoignent pas la circulation sanguine. Les produits seront administrés par voie orale puis les crottes seront prélevées à différents temps. Les probiotiques seront quantifiés par différentes méthodes avec pour but de déterminer les paramètres décrits ci-dessus. La connaissance de ces paramètres permettra d'ajuster les doses et d'affiner la posologie chez l'homme. A ce jour, aucune méthode alternative ne permet de se substituer aux modèles animaux pour ce type de protocole.

L'étude sera réalisée chez une espèce animale, le rat. Le nombre maximal d'animaux utilisés sera de 12 animaux x 2 sexes x 5 produits étudiés x 4 posologies (une ou deux administrations quotidiennes pendant un jour ou répétées jusqu'à 7 jours) soit au maximum 480 animaux sur une durée de 5 ans.

Compte tenu de la sensibilité des méthodes analytiques actuelles et pour la pertinence statistique des résultats, le nombre d'animaux a été réduit à 12 par posologie. Les fèces seront récupérées quotidiennement dès le premier jour d'administration et jusqu'au 12^{ème} jour après le dernier traitement. Les animaux seront groupés par 2 dans des cages avec enrichissement de type tunnel. Des études antérieures ont permis de choisir les doses du composé dénuées de toute toxicité ou d'effets délétères affectant le bien-être de l'animal. La survenue d'un inconfort, d'une souffrance ou d'un stress chez les animaux sera identifié au cours des études et des mesures seront mises en œuvre pour la réduire au minimum par la surveillance de points limites.

19245 Nos travaux de recherche portent sur l'étude de la maladie du greffon contre l'hôte, une complication majeure de la greffe de cellules souches hématopoïétiques provenant d'un donneur sain. Ces greffes restent le seul traitement de recours pour les patients atteints de différentes formes de cancers du sang qui ne répondent pas aux chimiothérapies classiques.

Notre approche globale consiste à réguler la réponse immunitaire en testant différentes stratégies thérapeutiques allant de l'injection de cellules (thérapie cellulaire) à l'injection de molécules thérapeutiques (anticorps monoclonaux) dirigées contre des molécules clés de la régulation de la réponse immunitaire.

Cette demande d'autorisation de projet est nécessaire pour valider le meilleur modèle d'étude utilisant des cellules humaines dans des souris sans système immunitaire permettant d'étudier l'efficacité de médicaments, ici un anticorps, développé pour une application chez l'homme. Ce modèle de souris sans système immunitaire permet d'injecter des cellules humaines, sans qu'elles ne soient rejetées et d'étudier donc l'effet de médicament sur ces cellules humaines. Nous souhaitons comparer le devenir d'un anticorps ciblant une molécule humaine dans deux modèles de souris sans système immunitaire afin de choisir le meilleur et d'optimiser nos recherches précliniques. Cet anticorps a déjà été injecté chez l'homme mais nous devons essayer de reproduire son devenir (durée de vie, disponibilité, élimination) chez la souris. L'anticorps sera donc administré dans ces deux lignées de souris cibles en présence ou non de cellules humaines. Une fois l'administration du composé effectuée, des prélèvements sanguins au cours du temps seront réalisés afin de déterminer les concentrations restantes du composé administré. Les procédures expérimentales de cette demande sont de courtes durées (de quelques heures à 14 jours) et les animaux ne développent pas de signes cliniques. Les animaux seront mis à mort à la fin de la procédure. Des mesures de raffinement seront mises en place pour limiter au maximum le stress des animaux et contribuer à leur bien-être. Les animaux seront suivis tout au long de la procédure pour pouvoir identifier les signes éventuels de souffrance : les changements physiques (pelage, peau), la mobilité, l'agressivité, la consistance des fèces. Si les signes persistent au cours de la procédure, l'animal sera mis à mort. Notons que l'anticorps sera injecté à des doses dont on sait qu'ils n'induisent pas de douleur ou de détresse.

Pour nos expérimentations, nous avons prévu le nombre nécessaire et suffisant d'animaux, pour garder une puissance statistique dans le traitement des résultats et pour avoir le nombre de contrôles internes suffisant, afin de pouvoir conclure sur la pharmacocinétique du traitement. Pour l'ensemble de ce projet qui sera réalisé en 6 mois, nous allons utiliser 120 animaux.

19246 Les myopathies sont des maladies rares (moins d'une naissance sur 2000) affectant la structure et la fonction des muscles squelettiques. Elles sont souvent héréditaires (liées à la déficience d'un gène particulier) et sans traitement. Elles entraînent des pertes de la fonction motrice, pouvant aboutir dans les cas les plus graves à des invalidités sévères accompagnées de problèmes respiratoires et/ou cardiaques, et dans certains cas au décès prématuré du patient.

La thérapie génique, qui consiste à apporter un gène sain fonctionnel au cœur des cellules malades à l'aide d'un transporteur biologique appelé vecteur, est une des approches thérapeutiques les plus prometteuses pour cet ensemble de maladie. Les vecteurs utilisés apportent le gène-médicament dans les cellules musculaires malades, mais également dans le cœur. Dans certain cas, la présence du gène sain dans le cœur est susceptible d'entraîner des effets secondaires. Afin de prévenir l'apparition de ces effets indésirables lors des essais précliniques sur l'animal, puis cliniques chez l'homme, il est nécessaire de pouvoir mesurer le niveau de molécules prédictives (biomarqueurs) et/ou de disposer d'outils pour mesurer la fonction cardiaque.

Notre projet vise 1) à identifier des biomarqueurs et des outils permettant de mesurer et de prévenir les complications cardiaques au cours de nos essais précliniques et 2) à tester de nouveaux vecteurs permettant de diminuer la quantité de gène-médicament dans le cœur pour réduire le risque d'effets secondaires. Dans un premier temps, des pathologies cardiaques connues et caractérisées seront créées sur des rats (création d'infarctus ou de trouble du rythme cardiaque) pour valider les différents tests. Dans un second temps, les vecteurs contenant des gènes-médicaments seront injectés par voie intraveineuse à des rats normaux et les tests seront réalisés sur des prélèvements de sang, urine et tissus.

Remplacement : L'utilisation d'animaux est indispensable pour faire ces études, car les modèles cellulaires ne permettent pas d'étudier les effets thérapeutiques et les effets secondaires sur l'ensemble des organes (notamment muscles et cœur), ni d'obtenir différents fluides (sang, urine) et tissus (plusieurs types de muscles, cœur), ni de faire la mesure de fonction sur des organes en activité.

Raffinement : Les prélèvements hebdomadaires de sang seront effectués en alternance sur trois sites pour réduire les douleurs (alternance veine caudale, sous-mandibulaire et rétro-orbitaire) et des anesthésiques seront administrés pour les deux dernières voies de prélèvement. Des anesthésiques et analgésiques seront administrés dans les expériences de création d'infarctus ou en cas de complication cardiaque. L'euthanasie des animaux sera réalisée si les douleurs persistent. Chaque biomarqueur et chaque test fonctionnel sera validé sur des modèles de pathologie cardiaque bien décrits, puis appliqué à nos modèles de thérapie génique, ce qui permettra d'exploiter au mieux les résultats.

Réduction : Le nombre de rats nécessaire a été estimé au plus juste pour pouvoir tirer des conclusions (6 par groupe) par une étude statistique prédictive (test de comparaison des moyennes). Une sélection précise des candidats-biomarqueurs a été réalisée avant le projet, permettant d'effectuer l'ensemble des tests sur chaque prélèvement et réduisant le nombre d'animaux nécessaire.

Les rats seront fournis par un éleveur agréé. Notre projet durera 3 ans et nécessitera l'utilisation totale de 182 rats.

19247 De nos jours, l'hyperthermie d'un tissu tumoral a été reconnue comme traitement du cancer, en synergie avec une chimiothérapie ou une radiothérapie. En effet, il a été montré qu'une élévation de la température locale des tumeurs entraînait une diminution de la croissance du cancer à des températures supérieures à 42°C, alors que les tissus sains pouvaient tolérer ces températures élevées. L'hyperthermie peut être induite par l'application d'un champ radio-fréquence (RF) externe aux patients. L'avantage de cette méthode est sa non-invasivité, mais ce chauffage ne peut pas être localisé. Dans le but d'améliorer la précision du chauffage, l'hyperthermie peut s'accompagner d'une incorporation de particules d'oxydes de fer (IOP) dans le tissu tumoral. Ces particules peuvent détruire les cellules cancéreuses en chauffant localement sous l'action d'un champ magnétique radio-fréquence. De plus, ces particules sont d'excellents agents de contraste pour l'imagerie par

Résonance Magnétique (IRM). Le succès récent de l'hyperthermie magnétique dans le traitement anti-cancéreux est très prometteur, mais la méthode nécessite d'être améliorée, autant au niveau de la synthèse des particules de fer, de leur distribution au sein de la tumeur, ou du suivi de la température par IRM. Il a aussi été montré que les particules de fer pouvaient améliorer le chauffage par ultra-sons focalisés (FUS) en réduisant les dommages aux tissus sains avoisinants et en réduisant leur durée d'application.

Afin de continuer les avancées sur la thermo-ablation, notre projet consiste à optimiser les conditions d'application du champ RF ou des FUS.

Plus précisément, ce projet consistera à injecter des particules de fer en intra-tumoral, comme ce qui est réalisé chez l'humain, puis d'appliquer un champ radio-fréquence ou des FUS sur un modèle de tumeurs primaires du sein chez la souris. Cette efficacité thérapeutique de l'hyperthermie sera suivie par IRM (détection de la distribution des particules au sein de la tumeur, suivi du volume tumoral et de la présence de métastases).

Le nombre total d'animaux envisagé pour les expérimentations est de 160 souris pour 5 ans. Des expérimentations in vitro sur cellules et sphéroïdes seront préalablement réalisées pour pré-déterminer les paramètres optimaux des deux thérapies (RF ou FUS). Quatre groupes de souris seront soumis à la RF ou aux FUS (1 ou 3 sessions espacées de 24h). Un groupe contrôles ne subira pas de traitement par RF ou de FUS. Ces groupes seront dupliqués pour inclure des souris injectées seulement avec des cellules tumorales mais sans particules de fer pour vérifier la non-toxicité de l'application d'un champ RF ou des FUS ainsi que la validité des diagnostics IRM. Finalement, pour chacun de ces groupes, des excrèses de tumeurs primaires (1cm) pourront être pratiquées sur les animaux dont la tumeur primaire continue de se développer afin de pouvoir suivre l'apparition de métastases sur le long terme.

Chaque groupe contiendra 8 souris. Le nombre d'animaux utilisés est au plus bas, est strictement nécessaire pour le projet, tout en s'assurant que nous aurons suffisamment de données pour être valables statistiquement. Des analyses in vitro sur cellules et sphéroïdes seront réalisées au préalable pour déterminer les paramètres optimaux.

Pour pouvoir réaliser un suivi du développement métastatique, le passage au modèle animal est irremplaçable.

Afin de réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux, les mesures suivantes sont appliquées :

- Respect des normes d'hébergement (taille des cages, densité etc.)
- Application de conditions d'ambiance en accord avec l'âge et l'espèce (température, éclairage, hygrométrie) ;
- Fourniture d'eau et d'aliment sans restriction ;
- Manipulation des souris par du personnel qualifié ;
- Enrichissement de l'environnement (maisonnette, paille, etc.)
- Mise en place d'un suivi clinique (fiche de suivi post-opératoire, grille d'évaluation de la douleur)
- protocole d'analgésie pré/post-opératoire

L'état de santé des animaux sera suivi quotidiennement pendant toute la durée du protocole.

Nous avons défini des points limites qui permettent d'évaluer l'arrêt du protocole pour limiter la souffrance.

19248 Environ 15% des cas d'infertilité masculine ont une origine immunologique, de l'inflammation chronique à la réaction auto-immune qui détruit les spermatozoïdes. Notre objectif est d'acquérir une meilleure connaissance du système immunitaire et de son organisation au sein des organes sexuels mâles, et plus particulièrement au niveau post-testiculaire. En effet, suite à leur production dans le testicule, les spermatozoïdes acquièrent leur pouvoir fécondant au cours d'une phase de maturation post-testiculaire. Du point de vue immunologique, il y a un véritable challenge : contrôler efficacement les pathogènes entrants tout en évitant un emballement de la réponse immunitaire

pouvant mener à une réponse auto-immune et donc à une infertilité. De façon classique, la réponse immunitaire est initiée par la reconnaissance d'une partie du pathogène (appelée antigène) par des cellules spécialisées, les cellules présentatrices d'antigène, qui migrent alors dans le ganglion drainant de l'organe où a été détecté l'antigène et présentent ce dernier à des cellules effectrices, les lymphocytes T (LT) afin de les activer. Les LT activés sont en retour recrutés sur le site de l'infection pour éliminer les pathogènes présents. Des travaux antérieurs ont cependant identifié différentes populations de cellules présentatrices d'antigène et de LT au niveau post-testiculaire, dans l'épididyme de la souris, en dehors de toute infection. Il apparaît dès lors qu'une présentation de l'antigène aux LT de l'épididyme pourrait avoir lieu au cours d'une infection de l'organe. Cette possibilité impliquerait une réponse rapide au pathogène ascendant des voies urogénitales et représenterait un possible levier pour des stratégies ciblées de traitement des infertilités masculines. Afin de déterminer dans quelles conditions pourrait se faire l'activation locale des LT épididymaires, il faut déterminer leur phénotype, naïf ou mémoire. La différence entre ces deux phénotypes se fait sur le niveau d'expression de marqueurs de surface, aisément quantifiable par cytométrie en flux. La rate est la plus grande réserve de LT de l'organisme. Elle sera notre organe de référence, nous permettant d'avoir accès à un grand nombre de LT naïfs et mémoires. Si les LT naïfs seront obtenus chez des souris n'ayant subi aucune intervention (non concernées par cette demande), les LT mémoires seront générés par l'injection intrapéritonéale d'un mélange d'antigène exogène (ovalbumine) en présence d'adjuvant, c'est le principe de la vaccination. C'est l'induction de ces LT mémoires qui fait l'objet de cette demande d'autorisation de projet. Une fois les conditions optimales d'obtention de LT mémoires déterminées, nous pourrions comparer les niveaux d'expression des marqueurs de surface choisis présents sur les LT résidents de l'épididyme à l'état physiologique avec celui des LT de rate naïves et mémoires. Ce projet s'applique à combler l'exigence de la règle des 3R. En effet, le nombre d'animaux est réduit car nous aurons recours à 30 souris mâles BALB/c sauvages afin d'atteindre notre objectif. Notre étude portant sur l'immunité des organes reproducteurs mâles, nous utiliserons des souris mâles sexuellement matures, âgées de trois à six mois. Le deuxième R s'attache au raffinement des conditions de vie des animaux ou la souffrance créée par l'injection est modérée selon les critères officiels (arrêté du 1er février 2013 relatif à l'évaluation éthique et à l'autorisation des projets impliquant l'utilisation d'animaux dans des procédures expérimentales). Cependant, les animaux seront supplémentés en anti-douleurs dans l'eau de boisson dès le jour de l'injection et pendant au moins trois jours après. Ils seront également surveillés jusqu'à leur mise à mort qui est prévue au maximum 28 jours après l'injection. Finalement, le troisième R, qui vise à remplacer l'expérimentation sur animaux ne peut malheureusement pas s'appliquer dans notre étude. En effet, le recours au modèle animal est ici incontournable étant donné que notre objectif global est de caractériser les LT résidents du tractus génital mâle. Notre choix du modèle murin repose sur le fait que la souris est une référence en immunologie. De plus, l'objectif à long terme est d'étudier la réponse immune mise en place dans l'épididyme murin et de nombreux mécanismes, cellules immunitaires et cytokines sont communs à l'homme et à la souris. Cette première étape est indispensable au bon déroulement du projet qui amènera à une meilleure compréhension de l'environnement immunitaire de l'épididyme, des mécanismes mis en jeu dans les réponses aux pathogènes du tractus uro-génital et pourrait à terme permettre une prise en charge adaptée de l'infertilité masculine.

19249 Le foyer de la pandémie de Covid-19 est né il y a plus d'un an, à Wuhan, en Chine. Aujourd'hui le SARS-CoV-2 (coronavirus responsable de la maladie) continue de se répandre à travers le monde: il est responsable à ce jour de plus de 136 millions cas d'infection et près de 3 millions de décès. Pour contenir cette avancée du virus, de nombreux pays ont adopté des mesures sanitaires parmi lesquelles on peut citer la distanciation physique, le lavage des mains, l'identification de chaque cas et de chaque contact par des tests de dépistage. Certains pays, les plus touchés, ont toujours recours à des mesures de confinement plus ou moins strictes, afin de contenir/ralentir la propagation du virus et soulager la pression énorme subit par les hôpitaux, les unités de soins intensifs et les agents de santé.

Les scientifiques sont à la recherche de divers moyens pour endiguer la propagation virus: conversion de médicaments déjà sur le marché pour traiter les malades, mise au point de nouveau

médicaments, mise au point de vaccins, étude de l'activité antivirale et immunitaire de certains probiotiques. Une autre stratégie envisagée est la mise au point d'un leurre capable de bloquer, de façon irréversible, le virus SARS-CoV-2 en l'empêchant d'infecter les cellules pulmonaires.

Le présent projet se propose d'évaluer l'efficacité d'un leurre (peptide) qui imite le récepteur ACE2, présent sur la membrane des cellules pulmonaires, et qui sert de porte d'entrée au virus SARS-CoV2. Pris en traitement préventif (voire thérapeutique), ce leurre se fixe sur la protéine d'enveloppe du virus et empêche donc ce dernier de se fixer sur le récepteur ACE2 des cellules pulmonaires. Des études préliminaires in-vitro ont montré que ce peptide est capable de bloquer totalement l'infection par le SARS-CoV-2 au niveau de cellules pulmonaires mises en culture, et ce sans aucune toxicité sur ces mêmes cellules même en cas de surdosage du peptide.

Pour ce projet, nous mènerons donc une étude in-vivo (le remplacement du modèle animal n'est ici pas possible) afin de confirmer les résultats prometteurs obtenus avec les peptides pré-sélectionnés lors des expériences in-vitro. Nous aurons recours à des hamsters dorés qui présentent une forte sensibilité au SARS-CoV-2 (atteintes respiratoires, perte de poids) ainsi qu'une forte réceptivité (multiplication du virus dans les poumons) et qui sont des modèles de choix pour l'évaluation de l'efficacité de nouvelles molécules thérapeutiques. Huit groupes de 6 hamsters (soit 48 hamsters, effectif réduit au minimum afin de garantir l'obtention de résultats robustes scientifiquement et statistiquement) seront donc traités pendant 4 jours, à raison de deux fois par jour, avec différentes doses de ce leurre peptidique (associé avec différents véhicules) administré par instillation nasale, et infectés avec une souche SARS-CoV2. A l'issue de l'expérimentation, qui n'excède pas 5 jours, nous évaluerons ainsi la capacité du peptide à bloquer l'entrée du virus in-vivo et empêcher le développement de la maladie (réduction de la perte de poids, réduction des signes cliniques et de la charge virale dans une sélection d'organes d'intérêt).

Ces hamsters seront hébergés en cage de 2 à 3 individus avec un enrichissement composé de nombreux tunnels, abris (afin de satisfaire leur besoin de cachette), cellulose, et de bâtonnets de bois à ronger. Un contrôle de leur état de santé sera assuré tous les jours. Des points limites précis et suffisamment précoces pour leur éviter toute souffrance prolongée et inutile ont par ailleurs été définis.

19250 Les érythrocytes ou globules rouges du sang contiennent l'hémoglobine, qui permet de fixer l'oxygène au niveau des poumons et le transporter vers les tissus. L'érythropoïèse est le processus par lequel l'organisme assure la production des globules rouges. Elle implique des macrophages dans la moelle osseuse autour desquels les érythroblastes sont regroupés, formant des îlots érythroblastiques. La perte de ces macrophages conduit à une incapacité de l'organisme de répondre à un stress par une production renforcée de globules rouges afin de maintenir l'homéostasie des érythrocytes. A l'opposé les macrophages contribuent à la prolifération pathologique des érythroblastes dans la Maladie de Vaquez, aussi appelé la polycythemia vera. Il a été montré dans un modèle murin qu'une réduction en macrophages des îlots érythroblastiques permet de réduire la quantité des érythrocytes sanguins, ainsi diminuant le risque de d'hémorragies et de thromboses. La recherche sur la différenciation cellulaire a mis en lumière un processus qui s'appliquerait aux macrophages des îlots érythroblastiques ouvrant la possibilité de modifier leur nombre de manière pharmacologique, une avancée majeure dans la prise en charge des maladies liées à l'érythropoïèse.

Dans ce contexte, les souris seront soumises à prélèvements sanguins ou recevront un composé chimique qui provoque la destruction d'une partie des globules rouges afin de stimuler l'érythropoïèse. La récupération en globules rouges sera alors déterminée dans des conditions normales où en absence de macrophages des îlots érythroblastiques.

Remplacement : L'érythropoïèse est un processus complexe qui ne peut pas être reproduit en culture cellulaire. Dans l'objectif de confirmer des résultats sur la différenciation des macrophages des îlots érythroblastiques des expérimentations chez l'animal sont nécessaires.

Raffinement : Les expérimentations sont effectuées sur des souris sous anesthésie générale et par un personnel compétent. Les animaux seront observés quotidiennement. Nous vérifierons le bien

être des souris par une grille d'évaluation. Des points limites prédictifs adaptés à la procédure ont été déterminés afin d'interrompre les procédures limitant ainsi la douleur animale à son minimum. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux dans un environnement enrichi comprenant des nids et frisure de carton.

Réduction : Nous utiliserons les connaissances rapportées dans la littérature et acquises par les laboratoires. Le nombre total des souris pour ce projet est de 672 souris. Le nombre d'animaux est le minimum permettant une analyse de nos données par des tests statistiques de type ANOVA/Bonferroni.

19251 L'objectif de ce projet est d'évaluer les effets protecteurs et réparateurs d'une autogreffe de fraction vasculaire stromale (FVS) issue du tissu adipeux à la suite d'une contusion thoracique de la moelle épinière chez des rats. Quatre groupes expérimentaux de 24 animaux seront réalisés (total n = 96). Les animaux seront suivis pendant 3 mois et évalués hebdomadairement par des tests sensorimoteurs. Quelques animaux seront sacrifiés pendant les 3 premières semaines suivant le traumatisme afin de déterminer le niveau d'inflammation de part et d'autre de la lésion. D'autres seront suivis par imagerie afin de suivre l'évolution de l'inflammation, l'apoptose, l'angiogenèse et le devenir des cellules greffées. A l'issue des 3 mois, des enregistrements électrophysiologiques seront réalisés afin de vérifier le fonctionnement de la boucle sensori-motrice. Puis, les rats seront sacrifiés et une étude histologique et biochimique sera conduite afin d'évaluer l'étendue de la lésion et de la cicatrice gliale, la présence de prolongements axonaux néoformés, la néoangiogenèse, et l'état du tissu médullaire au niveau du site lésionnel.

Ces travaux devraient permettre d'apporter la preuve de l'effet protecteur et réparateur de la FVS à la suite d'une lésion médullaire aiguë, de comprendre les mécanismes à l'origine de l'aggravation des déficits fonctionnels post-traumatiques et, de proposer, à terme, une prise en charge immédiate et efficace des blessés médullaires afin de limiter les déficits sensori-moteurs.

Il s'agit d'une étude pré-clinique non-humaine qui ne peut être substituée (R de Remplacer). Le nombre d'animaux requis (R de Réduire) a été estimé à la suite d'expérimentations préliminaires réalisées sur 3 animaux et à l'aide d'un test statistique approprié. Une attention sera particulièrement portée au bien-être et au soin des animaux (R de Raffinement) afin d'éliminer toute potentielle souffrance.

19252 Dans la perspective d'une production alimentaire durable et sûre, l'industrie porcine doit faire face à un nombre de défis croissants. La réduction de l'utilisation d'antibiotiques et l'apparition de résistances aux antibiotiques augmenteront l'impact des maladies, entraînant des coûts économiques importants. La stimulation par la flagelline, un agoniste spécifique du système immunitaire inné, est une stratégie alternative pour favoriser la résistance aux maladies. Notre projet propose une approche biologique multiparamètres, tels que les marqueurs de l'immunité, afin de déterminer les facteurs qui contrôlent la résistance aux maladies.

Le but de notre projet est donc de développer une nouvelle stratégie pour traiter/prévenir les infections respiratoires à *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Cet agent pathogène est l'une des principales causes de perte économique dans la production porcine. Différentes stratégies sont généralement mises en place pour réduire son incidence et sa gravité, notamment l'amélioration de l'élevage, la vaccination et le traitement antibiotique. Ce dernier est essentiel pour limiter la gravité et la propagation de la pleuropneumonie. Toutefois, les porcs qui survivent au traitement antibiotique présentent des lésions pulmonaires, un taux de croissance réduit et sont souvent porteurs de bactéries résistantes aux antibiotiques, ce qui entraîne des épidémies cliniques récurrentes de pneumonie atypique dans l'exploitation.

L'immunité innée des porcs peut être stimulée grâce à des molécules très spécifiques et non toxiques qui vont induire des réponses antibactériennes naturelles. Pour atteindre notre objectif, nous testerons sur le modèle porcin (40 porcs répartis en 4 lots de 10) la capacité de la flagelline à augmenter la réponse immunitaire contre les infections à *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Cette approche servira à développer des thérapies plus efficaces et plus sûres induisant un niveau élevé de protection aux infections pulmonaires.

Remplacement : La réponse immunitaire contre *Actinobacillus pleuropneumoniae* est très complexe et implique plusieurs acteurs (épithélium, mucus, transport mucociliaire, cellules immunitaires), ce qui rend difficile la modélisation in vitro. Aucune méthode alternative ne peut remplacer ce modèle d'infection de porc in vivo.

Réduction : Sur la base d'expériences antérieures, le nombre de 10 animaux a été déterminé à l'aide d'outils statistiques garantissant une puissance de test de 80% minimum en s'appuyant sur les données de la littérature et l'expérience des projets passés ($p < 0,05$, puissance 0,8). Nous proposons donc 10 animaux par groupe pour avoir des comparaisons statistiquement significatives et confirmer ainsi l'effet immunostimulant de la flagelline en comparant les lots deux par deux. Ce nombre permet ainsi de réduire le nombre d'animaux pour ce projet en respectant les 3Rs.

Raffinement : les porcelets seront maintenus sous anesthésie durant l'inoculation et l'administration de la flagelline pour contrôler la douleur ; sous supervision de personnel qualifié et formé. Les porcs seront hébergés dans des conditions d'enrichissement social (groupe/visites animalières) et environnementales (ballon, chaînes).

19253 La myopathie à némaline (NM), aussi appelée myopathie à bâtonnets, est une maladie héréditaire touchant les muscles squelettiques, avec une sévérité variable. Cette pathologie appartient au groupe des myopathies congénitales. Elle se caractérise par une diminution du tonus musculaire (hypotonie), une atrophie musculaire de sévérité variable et des lésions des fibres musculaires. Elle touche 1 personne sur 50 000 et aussi bien les hommes que les femmes. A l'heure actuelle, cette maladie ne bénéficie d'aucun traitement et se traduit dans la majorité des cas par un décès à un âge précoce.

Une dizaine de gènes cibles responsables de la maladie ont été répertoriés, dont le gène ACTA1 codant pour la protéine de l' α -actine squelettique. Cette protéine forme les filaments fin d'actine qui sont un des éléments les plus abondants du muscle. L'actine et ces protéines associées permettent le maintien de la structure de la fibre musculaire.

Dans le cas des myopathies à némaline causées par une mutation du gène ACTA1, les cellules des muscles produisent une protéine mutée non fonctionnelle qui ne permet pas la formation des filaments fin d'actine. La protéine d'actine mutée s'accumule dans des agrégats à l'intérieur des cellules musculaires avec d'autres protéines interagissant avec l'actine. La fibre musculaire ne fonctionne donc plus normalement et les capacités de contraction des muscles sont diminuées.

Nous avons travaillé sur des souris ayant une mutation du gène de l'actine. Elles reproduisent les symptômes observés chez les patients : hypotonie, faiblesse musculaire, présence d'agrégats dans les fibres musculaires et diminution de la taille des fibres. Elles présentent aussi un ptosis (une fermeture progressive des yeux) qui n'est pas présent chez les patients. Une analyse des muscles des souris a montré que les gènes impliqués dans la fonte de la masse musculaire présentaient une expression anormale. Parmi eux, nous avons identifié un gène régulant la croissance de la masse musculaire : le gène de la myostatine.

Il n'existe pas d'interaction directe entre la myostatine et l'actine. Pourtant, une équipe de recherche utilisant des molécules pharmacologiques agissant sur la myostatine a constaté une augmentation de la taille des fibres musculaires et de la force des souris.

En raison de ces résultats prometteurs, nous avons décidé de cibler à notre tour la myostatine. Plutôt que de nous limiter à des molécules pharmacologiques qui corrigeraient temporairement la maladie, nous avons préféré utiliser une approche de thérapie génique qui serait permanente et plus efficace puisqu'agissant sur la myostatine directement dans les fibres musculaires. Cette approche a déjà été utilisée par notre équipe pour agir sur la voie de la myostatine dans un modèle murin pour la pour une autre maladie neuromusculaire. Il n'a pas entraîné d'effets secondaires et a amélioré l'état général des souris traitées avec succès grâce à l'augmentation de la masse musculaire et de la force musculaire.

A la suite du traitement, nous réaliserons une analyse fonctionnelle des souris traitées.

En tenant compte du bien-être des animaux, nous avons conçu les procédures expérimentales en respectant la règle des 3R.

Remplacement : Il existe des modèles cellulaires de la maladie sous forme de cellules de muscle isolées poussant en boîte de Pétri. Ces cultures sont utiles pour tester les capacités du vecteur viral à pénétrer dans les fibres musculaires. En revanche ils ne peuvent pas reproduire la structure et les tensions mécaniques d'un muscle locomoteur à l'échelle d'un organisme vivant. De même, ils ne peuvent pas servir à évaluer la toxicité hépatique ou la réponse immunitaire. C'est pour cette raison que nous avons besoin de travailler avec un modèle animal qui permette d'évaluer l'efficacité du traitement sur un organisme complet.

Le modèle murin de la maladie reproduit bien les aspects cliniques de la maladie humaine (faiblesse musculaire, présence d'agrégats protéiques dans les fibres musculaires, réduction de l'espérance de vie, altération de la voie de la myostatine ciblée par l'approche de thérapie génique). Les souris présentent alors une faiblesse musculaire et une réduction du poids corporel dès l'âge de 4 semaines. Nous pourrions ainsi suivre l'évolution de la maladie suite à l'injection de notre thérapie.

Réduction : Le nombre de souris utilisées sera le résultat d'un calcul statistique basé sur le nombre d'animaux minimum nécessaire pour observer une différence significative entre nos groupes. Par ailleurs, chez les patients humains la maladie n'est pas affectée par le sexe. En revanche, il existe un dimorphisme sexuel chez notre modèle murin, les mâles étant plus affectés que les femelles. Ainsi, il sera nécessaire d'étudier indépendamment les souris mâles et femelles.

Raffinement : les souris seront surveillées par observations quotidiennes sans manipulation de l'état général et pesées à raison de 2 fois par semaine, afin de détecter toute dégradation de leur état. Il arrive que les animaux mâles développent des infections oculaires. Le cas échéant, les souris seront traitées avec une pommade oculaire d'antibiotiques. Les éventuelles plaies cutanées et infections locales seront traitées avec de la biatine pour les premières et de la vétédine pour les secondes.

Pour les animaux avec un phénotype dommageable présentant un défaut de motricité, un aliment spécifique hydratant et nourrissant sera placé au sol de la cage afin de leur en faciliter l'accès «DietGel® Recovery ».

Les injections en intra-musculaire seront réalisées sous anesthésie générale de la souris afin de ne pas générer de douleurs. La douleur générée par les injections intraveineuses est légère, donc les injections seront réalisées sans antalgie préalable.

Nous procéderons à des analyses fonctionnelles qui permettront de vérifier que nos traitements améliorent la fonction du muscle. Ces analyses consisteront à faire courir les souris sur un tapis roulant pour évaluer leur endurance à la course ou à les poser sur une grille puis les tirer en arrière afin de mesurer avec quelle force elles s'accrochent à leur support. Ces analyses font appel à des procédures légères qui ne causent pas de douleur à l'animal. En effet, l'animal peut choisir de ne pas courir ou ne pas s'accrocher, le test d'arrêtant le cas échéant. En addition, juste avant le sacrifice, l'animal sera anesthésié et recevra une dose d'analgésique pour procéder à la mesure de force du muscle tibialis anterior. L'animal sera sacrifié juste après la mesure.

La durée du projet sera de 3 ans et il nécessitera l'utilisation de 84 souris pour la procédure 2, puis 141 souris pour la procédure 3, soit un total de 225 souris.

19254 Des études épidémiologiques ont révélé l'émergence de multiples variants préoccupants du SRAS-CoV-2 (dont la lignée B. 1. 1. 7 – variant anglais- mais aussi des variants B. 1. 351 sud-africains) qui remplace rapidement les anciens variants.

Notre projet a pour but d'étudier les conséquences d'une ré-infection de hamsters dorés par deux variants différents et administrés à un mois d'intervalle. Les manifestations cliniques après la première infection puis après la ré-infection seront étudiées. L'immunité par production d'anticorps sera explorée ainsi que la distribution cellulaire et tissulaire des variants. Le niveau de protection induit par un variant vis-à-vis d'un second sera ainsi évalué.

Les études visées dans ce projet concernent le hamster doré (*Mesocricetus auratus*) qui est naturellement sensible à ce virus. Ce projet vise à d'étudier la réinfection par le variant du variant sud Africain sur un animal déjà infecté par la souche UK.

Nous avons déjà utilisé ce modèle de hamster doré pour des études sur les mécanismes physiopathologiques de l'infection (notamment les mécanismes d'induction de la perte de l'odorat mais aussi pour l'évaluation de molécules thérapeutiques). Lors de cette étude, des analyses post-mortem (virologiques, histologiques et sérologiques) seront réalisées sur les animaux infectés et sur les animaux réinfectés.

Ces études in vivo, seront réalisées dans le respect de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). Les modèles in vivo sont les seuls capables de mimer les infections humaines et ne peuvent donc pas être remplacés. Ces hamsters seront hébergés en cage individuelle avec un enrichissement composé de tunnels, abris (afin de satisfaire leur besoin de cachette), cellulose, et de bâtonnets de bois à ronger. Un contrôle de leur état de santé sera assuré tous les jours. Des points limites précis et suffisamment précoces pour leur éviter toute souffrance prolongée et inutile ont été définis. 40 hamsters mâles seront utilisés.

19255 Le pancréas est composé d'une part exocrine (cellules produisant les enzymes de la digestion) et d'une part endocrine (les îlots de Langerhans), produisant les hormones de régulation du taux de sucre. Le diabète de type 1 est dû à la destruction des cellules bêta pancréatiques qui produisent l'insuline et qui sont incluses dans les îlots de Langerhans. Son traitement reste l'injection d'insuline, méthode efficace mais imparfaite. De nouvelles stratégies sont nécessaires pour réduire les complications de la maladie. Parmi celles-ci, des stratégies de thérapie cellulaire ont été développées au fil du temps. En 1977, JS Najarian rapporta la première greffe d'îlots. Cette technique est maintenant utilisée de manière reproductible mais comporte des contraintes : le traitement antirejet, la durée de vie limitée des îlots et le faible nombre de donneurs. Une autre approche serait de produire des cellules bêta à partir de cellules souches humaines. Des progrès ont été accomplis vers la production de telles cellules, mais celles-ci ont un profil immature par rapport à de « vraies » cellules bêta. Un des objectifs du laboratoire est de comprendre les différences entre cellules pancréatiques à différents stades de développement ou les différences entre cellules pancréatiques normales et pathologiques.

Des prélèvements de tissus pancréatiques humains ou murins seront ainsi greffés dans le muscle de la cuisse ou sous la capsule rénale d'une souche de souris tolérante pour ce type de greffe. En effet, ces souris ont un système immunitaire déficient ce qui permet à un greffon de se développer sans mécanisme de rejet. L'étude du développement des greffons se fera par analyse clinique, analyse sanguine (test de tolérance au glucose et test de sécrétion d'insuline) et analyse radiologique (échographie, IRM, tomographie par fluorescence). A partir de ce modèle expérimental initial, différentes contraintes de développement sont appliquées à la souris greffée (infusion sous cutanée continue par pompe induisant une insulino-résistance) et le pancréas greffé sera récupéré après mise à mort de la souris.

La méthode de greffe décrite ci-dessus est le seul modèle, à ce jour, qui permet de récapituler les différentes étapes longues du développement pancréatique endocrine in vivo et donc de répondre à des questions comparatives aux modèles murins. Ce modèle permet aussi de maintenir des tissus pancréatiques in vivo et notamment pour réaliser des études dynamiques de pathologie pancréatique

Le préalable reste systématiquement le travail in vitro réalisé dans le laboratoire afin de limiter au maximum les questions posées sur le modèle in vivo et ainsi réduire le nombre d'animaux utilisés. Le projet sera mené en appliquant la règle des 3R :

1/ Remplacement : La culture cellulaire β (cellules produisant l'insuline) permet de tester nos hypothèses mécanistiques mais la complexité du pancréas et des maladies pancréatiques endocrines nécessite l'utilisation d'un modèle animal pour confirmer ou infirmer les hypothèses issues du travail in vitro.

2/ Réduction : Nous utiliserons le nombre optimal d'animaux requis pour obtenir des résultats statistiquement interprétables.

3/ Raffinement : Afin de prévenir au maximum la souffrance et l'angoisse des animaux, les procédures chirurgicales longues sont maîtrisées et se dérouleront sous anesthésie générale avec une surveillance régulière et des antalgiques sont prévus à toutes les étapes pré et post-opératoires. Enfin, des points limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire. Les souris sont ensuite élevées dans un environnement stérile, sans besoin d'isolement et avec des soins quotidiens attentifs et adéquats pour vérifier la bonne cicatrisation et le bon développement, dans une cage enrichie selon les recommandations (coton, modules de jeu, congénères).

Ce projet s'inscrit sur une durée de 5ans. Le nombre de souris utilisées sera de 405 souris.

A terme, les résultats de ce projet permettront de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le développement et la pathologie du pancréas endocrine humain et aider au développement de cellules productrices d'insuline humaine en laboratoire. Ils pourraient également permettre l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et ainsi aboutir à une meilleure prise en charge des pathologies du pancréas endocrine.

19256 Le syndrome myasthénique congénital (SMC) est une maladie rare d'origine génétique, retrouvée chez 1 personne sur 250 000. Les patients présentent divers symptômes en fonction du gène retrouvé muté. Un peu plus d'une trentaine de gènes ont été identifiés comme pouvant être liés au SMC : CHAT, COLQ, CHRNA1, CHRNB1, CHRND, CHRNE, RAPSN, MUSK, DOK7, SCN4A, ... Les protéines codées par ces gènes interviennent dans le bon fonctionnement des muscles en permettant la transmission de l'information nerveuse vers les muscles.

Ainsi, en cas de SMC, les patients présentent une faiblesse musculaire et une fatigue importante lors d'efforts physiques. La faiblesse musculaire entraîne des symptômes au niveau des yeux avec une faiblesse des muscles des paupières (induisant des infections oculaires et des difficultés de vision), une paralysie plus ou moins importantes des muscles des yeux, du larynx et des muscles nécessaires à la mastication et la déglutition. Dans la majorité des cas, les patients atteints de SMC présentent également des difficultés respiratoires.

Pour le moment, il n'existe pas de traitement curatif pour le SMC mais des traitements pouvant uniquement favoriser la contraction des muscles.

Parmi ces SMC, nous allons nous intéresser aux SMC associés à des mutations du gène COLQ (collagène Q). Ces SMC sont principalement associés à un déficit en acétylcholinestérase (AChE) une enzyme impliquée dans la transmission de l'influx nerveux aux muscles. Ce déficit est responsable de faiblesse musculaire sévère, de fatigue et de scoliose importante (une déviation permanente de la colonne vertébrale) chez les patients. Le but du projet est de concevoir une thérapie génique pour traiter le SMC lié à COLQ. La thérapie génique est une approche thérapeutique qui consiste à modifier génétiquement certaines cellules afin de réparer un gène défectueux, de suppléer ou inhiber un gène malade ou d'introduire un nouveau gène pour obtenir un effet thérapeutique.

Nous allons utiliser le modèle murin ColQ^{-/-}, ce modèle reproduit plusieurs symptômes du SMC lié à COLQ. Grâce à l'aide de vecteur de type AAV (dérivés de virus associés à l'adénovirus), nous allons introduire le gène humain COLQ dans le modèle murin lors des premiers jours de vie (J0/J1) par voie intraveineuse afin de restaurer le niveau de collagène Q aux seins des différents tissus et permettre une amélioration du phénotype des souris.

En tenant compte du bien-être des animaux, nous avons conçu les procédures expérimentales en respectant les 3R.

Remplacement : il n'existe pas de moyen de remplacer l'utilisation d'animaux pour l'étude de cette pathologie, car bien que des modèles cellulaires présentant une inactivation du gène COLQ existent, ils ne permettent pas d'étudier certains défauts fonctionnels majeurs de la pathologie. Le modèle murin utilisé ici présente une espérance de vie réduite avec la manifestation des premiers symptômes avant le sevrage. Les souris présentent alors une faiblesse musculaire, une réduction

du poids corporel et la présence d'une scoliose dès l'âge de 4 semaines. De plus, l'activité de l'ACHé est absente dès le sevrage. Nous pourrions donc suivre l'impact de l'approche thérapeutique sur l'évolution de la maladie, avec pour objectif la non apparition des symptômes suite à l'injection à la naissance du vecteur.

Réduction : Certaines souris issues des croisements mais ne présentant pas de pathologie seront utilisées pour les croisements nécessaires au maintien de la lignée. La maladie affecte indifféremment les hommes et les femmes : des souris des deux sexes seront donc utilisées. Afin de limiter le nombre d'animaux, le nombre de souris nécessaire a été estimé à 11 souris par groupe par une étude statistique prédictive (test non paramétrique de comparaison de moyenne).

Raffinement : les souris seront surveillées par observations de l'état général et pesées à raison de 3 fois par semaine, afin de détecter toute dégradation de l'état général de l'animal. Des soins seront administrés (désinfection locale (vétédine) et pansements de plaies cutanées et oculaires si nécessaire (biafine), la fréquence de surveillance des animaux sera augmentée et l'animal sera euthanasié en absence d'amélioration de l'état général. La douleur générée par les injections intraveineuses est légère. Pour les animaux malades présentant un défaut de motricité, un aliment spécifique hydratant et nourrissant sera placé au sol de la cage afin de leur faciliter l'accès. Lors des analyses qui permettront de vérifier que nos traitements améliorent la fonction du muscle, l'animal recevra une injection d'analgésique de type morphinique ce qui permettra de prévenir les douleurs intenses éventuelles. L'animal sera également disposé sur un tapis chauffant tout au long de l'anesthésie lors de ces mesures. Des prélèvements sanguins seront réalisés au cours du protocole sous anesthésie générale à raison d'un prélèvement toutes les quatre semaines (à 4, 8, 12, 16, 20 semaines post-injection et au sacrifice).

Notre projet durera 3 ans et nécessitera l'utilisation totale de 242 souris.

19257 La formation réglementaire d'expérimentation animale niveau Concepteur de projet (ou fonction b) permet l'apprentissage de la réglementation, du bien-être animal, de l'éthique et des bonnes pratiques de manipulation des animaux. Elle est destinée aux personnes qui auront en charge la responsabilité et la mise en œuvre de projets d'expérimentation animale.

Nous proposons une formation Concepteur spécialisée pour le modèle rongeur accréditée par la FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations).

Cette formation comprend une séance de travaux pratiques de 4 heures permettant aux candidats d'appréhender les bonnes pratiques des manipulations de base des animaux de laboratoire. Le but de cette séance est de présenter les techniques de contention des rongeurs ainsi que les différentes méthodes d'administrations, de prélèvements et d'euthanasie.

- Pour les rats, les techniques seront montrées par les formateurs et mis en pratique sur des rats factices (rats Koken) puis seulement réalisés par les candidats devant travailler avec ce modèle. Nous utiliserons deux rats (un mâle et une femelle) par session. Un animal de chaque sexe est suffisant.

- Les candidats manipuleront eux-mêmes les souris après entraînement sur souris factice et sous contrôle des formateurs expérimentés.

Les procédures effectuées permettront l'apprentissage des techniques utilisées en routine pour l'administration de substance et les prélèvements sanguin.

Nous ferons 2 sessions successives de 18 candidats par an (présence de 4 formateurs). Chaque candidat et trois formateurs auront une souris (mâle ou femelle). Dix souris de la session 1 n'ayant subi que les procédures d'administrations et une procédure de prélèvement légère seront réutilisées pour la session 2, ce qui permet de réduire le nombre d'animaux. Nous commanderons donc 16 mâles et 16 femelles par an.

Pour répondre à la règle des 3R, nous utilisons de nombreux supports vidéos et des mannequins factices afin de remplacer l'animal dans les toutes premières phases d'apprentissage. Les participants recevront tous un livret décrivant les procédures avant les travaux pratiques et s'entraîneront d'abord sur des modèles factices rats et souris.

Lorsque c'est possible, nous réduisons le nombre de souris commandées en utilisant les surplus des élevages des animaleries voisines (anciens reproducteurs) et les rats serviront ensuite au TP d'Anatomie.

Les animaux sont hébergés dans des cages standard en présence de copeaux pour enrichissement. Pour réduire le stress des animaux, les rats et les souris ne sont jamais présents en même temps dans la salle. Lors des travaux pratiques, nous ajoutons dans chaque cage de souris un tunnel de contention (plexi rouge) qui sert aussi de refuge.

Le nombre total d'animaux utilisé sur 5 ans sera donc :

- $5 \times 4 = 20$ rats.

- $5 \times 32 = 160$ souris.

Les plus hauts standards en termes de pratique seront enseignés et participeront au raffinement des procédures réalisées.

19258 L'autorisation de mise sur le marché (AMM) d'un produit (médicament, agent de contraste...) nécessite au préalable de caractériser notamment sa pharmacocinétique et sa pharmacodynamique.

La pharmacocinétique consiste à évaluer l'absorption, la diffusion, la métabolisation et l'excrétion du produit par l'organisme. Elle permet notamment d'améliorer les dosages et la posologie du produit par l'étude de sa concentration sanguine au cours du temps. Elle permet également de déterminer les voies d'administrations optimales selon la métabolisation du produit dans l'organisme. La pharmacodynamique consiste quant à elle à évaluer les effets du produit sur l'organisme.

Ce projet a pour objectif de caractériser la pharmacocinétique et la pharmacodynamique après administration de produits chez le hamster, le cobaye et le rat.

Il n'existe pas de méthode alternative à l'heure actuelle permettant de modéliser de manière fiable l'évolution et les effets d'un produit dans un organisme vivant. Le recours à l'expérimentation animale est donc nécessaire à l'objectif de ce projet.

Dans le cas où les produits sont radio-opaques ou rendu fluorescent, le recours à l'imagerie médicale (imagerie à rayons X ou imagerie optique) permet alors de suivre au cours du temps la distribution des produits de manière quantitative et spatiale. Cette méthode d'analyse présente l'avantage d'être non invasive, nécessitant seulement une anesthésie générale. Elle permet également de suivre un même animal au cours du temps et donc de diminuer l'impact de la variabilité individuelle sur les résultats et de réduire le nombre d'animaux nécessaires et s'inscrivent donc dans une démarche éthique de réduction du nombre d'animaux.

Dans ce projet, des produits radio-opaques ou fluorescents ou non seront évalués.

En fonction des espèces, un nombre différent d'animaux par groupe et par étude sera prévu :

- Cobaye : 300 cobayes au total sont prévus dans ce projet, ce qui correspond à 30 cobayes par étude soit à 3 groupes de 10 cobayes et 10 études au cours des 5 années.

- Rat : 500 rats au total sont prévus dans ce projet, ce qui correspond à 50 rats par étude soit à 5 groupes de 10 rats et 10 études au cours des 5 années.

- Hamster : 1500 hamsters au total sont prévus dans ce projet, ce qui correspond à 150 hamsters par étude soit 3 groupes de 50 hamsters et 10 études au cours des 5 années.

Soit au total pour ce projet, un maximum de 2300 animaux pourront être utilisés.

Dans la mesure du possible, les animaux seront hébergés en groupes en cage (ou en parc pour les cobayes) pour une plus grande liberté de mouvement et pour favoriser leur comportement naturel exploratoire et social.

Des suivis cliniques quotidiens des animaux seront réalisés afin de détecter tous signes cliniques anormaux. De plus, des suivis cliniques plus approfondis et des pesées corporelles seront réalisés au minimum 1 fois par semaine. Cette fréquence pourra être augmentée en cas de signe clinique anormal détecté. Toute anomalie clinique observée sera rapportée au personnel responsable du

projet ou à un vétérinaire si nécessaire dans le but de réaliser un examen clinique plus approfondi. Si possible des mesures thérapeutiques seront mises en place pour essayer de traiter les animaux en fonction des signes cliniques observés sans interférer sur l'étude en cours (injection de fluides, d'analgésiques, isolement, réchauffement, etc...). Des critères d'interruption ou « points limites » ont été définis et seront appliqués tout au long de ces études.

19259 Dans le cerveau, le système endocannabinoïde (le système par lequel agit le cannabis) a un rôle majeur dans la modulation de l'apprentissage et de la mémoire. Nous avons récemment montré que ce système affecte aussi la production d'énergie dans la cellule et que ce processus est essentiel pour la mémoire. Nous voulons maintenant confirmer ces résultats à l'aide d'une nouvelle technique, la photométrie par fibre optique. Cette technique, essentielle pour poursuivre nos études, permet d'enregistrer l'activité et le métabolisme cellulaires dans le cerveau de souris éveillées et libres de se mouvoir. Le projet a pour finalité une meilleure compréhension du système endocannabinoïde qui pourrait permettre la mise en place de nouvelles et de meilleures cibles thérapeutiques. La durée de ce projet sera de 5 ans. Il est essentiel d'utiliser des souris car nous voulons étudier des mécanismes et circuits neuronaux conservés chez les mammifères y compris l'homme. Ainsi, l'usage des invertébrés qui ont un système nerveux complètement différent serait inapproprié. Notre caractérisation inclura 1800 souris chez lesquelles la photométrie par fibre optique sera couplée à différents tests comportementaux. D'un point de vue méthodologique, nous nous engageons à respecter la règle des 3R (remplacement, réduction, raffinement) :

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

Réduction : les animaux utilisés dans chacun des groupes expérimentaux n'excéderont pas 15 animaux c'est-à-dire le nombre minimal d'échantillons permettant l'application de tests statistiques classiques dans le domaine. Les nombres avancés permettent de garantir une bonne interprétation des résultats. Néanmoins, si l'expérience nous montre que les échantillons peuvent être réduits, ces nombres seront réduits en conséquence.

Raffinement : les animaux sont observés quotidiennement par un personnel qualifié et le milieu d'élevage des souris est enrichi (matériel de nidification) avec l'existence de points limites adaptés et de critères d'arrêt suffisamment prédictifs et précoces.

19260 Nous avons mis en évidence qu'une protéine appelée récepteur de chimiokines jouait un rôle dans la capacité de migration de cellules de cancer du sein en culture. En utilisant deux modèles de cancer mammaire chez la souris, le but du projet est de supprimer ce récepteur de chimiokines afin d'évaluer son rôle sur la cancérogenèse in vivo. Nous avons déjà montré que ces souris qui n'expriment pas ce récepteur développent plus rapidement des tumeurs que les souris sauvages. C'est un modèle préclinique essentiel pour comprendre la carcinogenèse mammaire et proposer de nouvelles pistes thérapeutiques.

Remplacement : Nos souris qui n'expriment pas le récepteur développent spontanément des tumeurs mammaires. Les souris sont indispensables à ce projet car la carcinogenèse mammaire implique un dialogue entre la glande mammaire et les autres organes de la souris, qui ne peut pas être reproduit in vitro. Cette étude permettra de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement du cancer du sein.

Réduction : le nombre de souris est limité au minimum pour maintenir la colonie et produire les animaux nécessaires pour notre étude.

Raffinement : Les souris sont élevées dans des portoirs ventilés avec un enrichissement du milieu au niveau de la litière (coton) et la présence d'igloos. Les souris sont suivies quotidiennement (WE et jours fériés compris) avec fiche de suivi par les zootechniciens et à partir de 8 semaines lorsque des tumeurs mammaires apparaissent, un suivi visuel et par palpation et pied à coulisse est réalisé. Si le zootechnicien constate l'apparition d'une tumeur approchant les 1.5cm³, il doit le signaler immédiatement et l'équipe de recherche demande la sortie de l'animal en vue de prélèvement post-mortem ou l'euthanasie dans les 48h maximum.

228 souris développant des tumeurs seront utilisées sur la durée du projet : 5 ans.

19261 Le comportement des ectothermes est très étudié depuis plusieurs décennies dans le contexte de la biologie thermique de ces animaux. Le modèle dominant prédit que l'investissement dans la thermorégulation comportementale est limité par des coûts énergétiques et on s'attend donc un effet fort des contraintes nutritives sur ces comportements. La thermorégulation comportementale présente aussi des coûts hydriques car les pertes en eau de l'organisme sont plus fortes quand sa température corporelle augmente, mais les études portant sur l'hydrorégulation comportementale, définie comme l'ensemble des comportements impliqués dans la régulation de l'état d'hydratation de l'organisme, sont très rares. Chez les reptiles, il existe aussi de nombreuses inconnues sur le rôle de l'alimentation dans la balance hydrique individuelle. L'objectif de ce projet consiste donc à mettre en évidence les effets des ressources alimentaires sur les comportements d'hydrorégulation quand un animal est exposé à une restriction en eau au laboratoire dans des conditions contrôlées. Nous prédisons que la restriction en eau devrait stimuler des comportements d'hydrorégulation servant à limiter le stress physiologique, soit quand les ressources nutritives sont limitantes si l'alimentation peut se substituer à la ressource hydrique soit indépendamment de l'alimentation sinon.

Pour répondre à ces questions, nous utiliserons une approche d'écologie comportementale expérimentale avec des mâles adultes du lézard vivipare (*Zootoca vivipara*) issus de populations captives. Nous étudierons des individus exposés à une restriction hydrique chronique et quantifierons leurs comportements et leur activité, ainsi que leur température corporelle, sur la même période pour différentes conditions nutritives (pas de nourriture ou nourriture ad libitum) et pour différentes opportunités d'hydrorégulation comportementale (présence d'un abri froid sec ou froid humide, l'utilisation de l'abri humide plutôt que sec étant considéré comme le comportement d'hydrorégulation). Notre groupe expérimental comprendra un total de 60 individus adultes mâles qui seront testés seul dans une même grande cage après une période d'habituation de deux jours. Nous séparerons les individus en quatre sous-groupes égaux pour étudier le comportement des lézards pendant une durée de 5 journées (N=15 dans chaque sous-groupe). Un premier traitement expérimental subira une restriction alimentaire pendant 5 jours ou non. Le deuxième traitement expérimental aura des opportunités d'hydrorégulation pendant 5 jours ou non. Les quatre sous-groupes seront constitués par l'association factorielle des deux traitements. Pendant la période d'habituation de deux jours et au cours de la manipulation de 5 jours, nous observerons plusieurs comportements dans des cages leur permettant une diversité de répertoires comportementaux. Au début et à la fin de l'expérience, les animaux seront aussi mesurés et subiront une prise de sang pour évaluer leur état physiologique de déshydratation et le niveau total circulant de corticostérone.

Dans les conditions de cette étude, il est impossible de remplacer le modèle biologique par un équivalent cellulaire ou in silico. Par contre, un échantillon minimum sera utilisé en étudiant uniquement une seule classe d'âge (adulte) et de sexe (mâle) et on raffinerà les conditions d'élevage grâce à un enrichissement des cages et à l'utilisation de conditions climatiques optimales du milieu naturel pour le printemps. Des points limites associés à la perte de masse seront appliqués avec arrêt des procédures expérimentales et maintien en vie des animaux dans des conditions optimales sur les points limites sont dépassés.

19262 Le médulloblastome (MB) est une tumeur pédiatrique invasive du cervelet. Il représente la tumeur maligne du système nerveux central la plus fréquente chez l'enfant. Même si le taux de guérison a été amélioré par les traitements classiques, associant chirurgie, chimiothérapie et radiothérapie, 30% des patients restent incurables et ne survivent pas. Quatre groupes de MB ont été identifiés possédant des caractéristiques moléculaires et cliniques différentes et répondant différemment aux traitements. Le groupe 3, le plus problématique d'un point de vue clinique, est métastatique, de très mauvais pronostic et résistant aux thérapies actuelles. Les MB de ce groupe restent encore mal caractérisés. Il est donc urgent d'identifier les événements oncogéniques participant à leur carcinogenèse afin de proposer des stratégies thérapeutiques alternatives.

Remplacement : In vitro, nous avons sélectionné et validé l'importance dans la progression tumorale de plusieurs gènes dont l'expression est augmentée dans le MB de groupe 3 par rapport aux trois autres groupes dans nos modèles de lignées cellulaires.

Pour cela, nous allons implanter des cellules de MB qui expriment ou non notre gène d'intérêt chez la souris pour évaluer si son expression module la croissance tumorale.

Réduction : Nous mettrons en place un système non-invasif pour le suivi du développement tumoral dans le cervelet au cours du temps. Ce système nous permet de réduire le nombre de souris utilisées. Nous analyserons également les effets d'inhibiteurs pharmacologiques in vivo. Nous évaluerons si un traitement avec ces inhibiteurs conduit à une régression de la croissance du MB ainsi qu'à une augmentation de la survie des souris. Au préalable, ces inhibiteurs pharmacologiques, potentiels agents thérapeutiques, seront testés in vitro dans différents modèles. Seules les plus prometteurs seront testés in vivo (remplacement et réduction)

L'ensemble de ce projet pour l'étude portant sur l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques dans le MB de groupe 3 requiert un nombre total d'animaux estimé à 4558 souris.

Raffinement : Dès que cela n'implique pas de stress ou de l'anxiété supplémentaire, une méthode d'anesthésie par voie gazeuse sera utilisée pour réaliser les gestes techniques nécessaires à l'expérimentation. De plus, des méthodes analgésiques seront appliquées avec l'utilisation d'analgésiques locaux ou généraux pendant l'opération et si besoin post-opératoire. En accord avec les recommandations internationales dans le domaine de la cancérologie, les animaux sont suivis quotidiennement afin d'assurer leur bien-être et les expérimentations sont arrêtées avant la souffrance des animaux

La réalisation de ce projet de recherche pourrait permettre d'identifier de nouveaux acteurs clés de la carcinogenèse du médulloblastome et de proposer de nouvelles approches thérapeutiques pour ces MB agressifs résistants à l'ensemble des thérapies actuelles.

19263 Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de mortalité dans le monde, aussi bien dans les pays développés que dans ceux en voie de développement. De plus, l'incidence de la mortalité cardiovasculaire augmente avec l'âge, du fait, au moins en partie, d'une augmentation de l'incidence des facteurs de risques cardiovasculaires avec l'âge.

Les maladies cardiovasculaires et leurs facteurs de risques sont associés précocement à un dysfonctionnement de l'endothélium vasculaire. Cette monocouche cellulaire située sur la face interne de l'ensemble des vaisseaux sanguins joue un rôle central dans le maintien d'un état vasculaire optimal, notamment grâce à la formation des facteurs vasoprotecteurs comme le monoxyde d'azote. La fonction endothéliale diminue avec l'âge, ce qui se traduit entre autres par une diminution de la dilatation artérielle dépendante de l'endothélium progressive au cours du vieillissement physiologique. La dysfonction endothéliale liée à l'âge, caractérisée par une diminution de la formation des facteurs vasoprotecteurs, va favoriser le développement des facteurs de risques cardiovasculaires pouvant à terme aboutir à des événements adverses tels que l'infarctus du myocarde ou l'AVC. La plupart des thérapeutiques actuelles pour la prise en charge des facteurs de risque cardiovasculaires n'ont peu ou pas d'effet sur la fonction endothéliale. Le développement d'une nouvelle approche visant à améliorer la fonction endothéliale présente donc un intérêt majeur.

Plusieurs études épidémiologiques et cliniques ont montré un intérêt des molécules d'origines naturelles (acides gras polyinsaturés omega-3, phénols végétaux, etc.) dans la prévention primaire et secondaire des maladies cardiovasculaires. Ainsi, la consommation d'omega-3 sous forme de poisson, d'huile de poisson ou de composés purifiés a été associée à une diminution du risque cardiovasculaire dans diverses populations à risques. De même, la consommation de régimes riches en polyphénols est associée avec une diminution du risque cardiovasculaire et une amélioration de la fonction endothéliale.

Le but du présent projet est d'étudier l'effet de traitements chroniques courts avec des formulations optimisées de produits naturels (acides gras polyinsaturés omega-3 d'origine marine ou végétale, extraits d'origine végétale) sur la dysfonction endothéliale liée à l'âge.

Pour se faire, des rats seront gardés en stabulation jusqu'à l'âge de 7-12 mois (rats moyennement âgés) ou de 20-24 mois (rats très âgés) pour permettre l'apparition d'une dysfonction vasculaire liée à l'âge. Pour objectiver les dysfonctions endothéliale et vasculaire liées à l'âge, des rats jeunes (10-15 semaines) seront inclus dans le protocole. Les traitements par les formulations optimisés seront administrés dans l'eau de boisson. Toutefois, si cela n'était pas possible (non miscibilité à l'eau, sensibilité à l'oxygène ou à la lumière), les formulations seront administrées quotidiennement par gavage intra-œsophagien dans un volume minimal (et ne dépassant pas 5 ml/kg) d'un solvant adapté. Les rats pourront être soumis à des procédures permettant d'évaluer in vivo des paramètres vasculaires, cardiaques et métaboliques. La pression artérielle systolique sera mesurée par sphygmomanométrie à la queue, la fonction et la structure cardiaques par échocardiographie sous anesthésies gazeuse, l'intolérance au glucose par injection IP de glucose, la fonction rénale par collecte des urines sur 24h maximum en cage à métabolisme.

Le nombre maximal d'animaux utilisés pour ce projet est de 1175 rats du fait de l'application de la règle des 3R. Le remplacement du modèle animal par un autre modèle n'est pas possible du fait que le vieillissement physiologique est un processus complexe issu des interactions multi-tissulaires dans l'organisme. Toutefois, la mise au point des formulations optimisées et l'identification de certains mécanismes moléculaires ont été faites à l'aide de méthode alternative. La réduction des effectifs est liée à l'utilisation de techniques et à une approche statistique adaptées (ANOVA et/ou tests non-paramétriques). Enfin, le raffinement se fait par une prise en compte du bien-être animal (enrichissement du milieu et soins quotidiens aux animaux), par le recours à des méthodes de mesures non-invasives (prise de pression par brassard à la queue, cage à métabolisme, échocardiographie), et par l'utilisation d'anesthésiques et d'antalgiques.

19264 Le TRALI (Transfusion-Related Acute Lung Injury) est une réaction caractérisée par une détresse respiratoire aiguë survenant quelques heures après une transfusion de produits sanguins labiles. Bien qu'il s'agisse d'un événement rare, il reste une des premières causes résiduelles de mortalité transfusionnelle. Le TRALI est provoqué le plus souvent par les anticorps de type immunoglobulines G (IgG) présents dans les produits transfusés, qui se lient par leur partie dite « variable », à des molécules présentes sur les cellules endothéliales des vaisseaux ou sur les globules blancs, et qui se lient par leur partie dite « constante » à des récepteurs spécifiques présents sur les cellules de types leucocytes et plaquettes causant leur activation, qui résulte dans un œdème à l'origine de la détresse respiratoire.

En raison de sa rareté, les observations cliniques sont difficilement exploitables. Les mécanismes cellulaires participant au développement du TRALI sont complexes, aussi, sa compréhension requiert des explorations expérimentales complémentaires in vitro et in vivo dans des modèles animaux. Les mécanismes moléculaires et cellulaires qui conduisent au TRALI ne sont pas encore bien compris. Des modèles de TRALI ont le plus souvent étudiés le développement de cette réaction dans des souris sauvages, qui ne sont pas des bons modèles pour éclaircir les rôles d'interactions entre IgG et récepteurs aux IgG. Effectivement des importantes différences entre les récepteurs aux IgG humains et murins existent en termes d'expression, d'affinité et de polymorphismes, qui rendent l'extrapolation à la physiologie humaine très complexe.

Objectifs du projet : Caractériser les mécanismes physiopathologiques sous-jacents le TRALI grâce à un modèle murin humanisé. Dans ce modèle, les souris sont pré-sensibilisées avec une injection intrapéritonéale de lipopolysaccharides suivie, 24 heures après, d'une injection, sous anesthésie générale, de l'anticorps anti-MHCI qui déclenche le TRALI.

Bénéfices attendus du projet : Notre projet vise à évaluer le rôle des récepteurs aux IgG, les cellules les exprimant et des médiateurs libérés dans le TRALI pour mieux comprendre la physiopathologie de la réaction et pour à terme pouvoir proposer des nouvelles approches thérapeutiques.

Espèce et nombre approximatif d'animaux utilisés : souris ; 1069 animaux sur 5 ans maximum

Nombre de procédures et leur degré de sévérité : Ce projet comporte sept procédures de classe légère.

Domages prévisibles pour les animaux :

Ces protocoles ne semblent pas, à priori, induire de douleur aux animaux, au sens de l'absence de critères visibles de douleur/souffrance (comportement social, attitude corporelle, propreté de l'animal).

Justification du recours à l'animal : Le recours à l'utilisation d'animaux est justifié par le fait que les mécanismes cellulaires et moléculaires de TRALI sont difficiles, voire impossible à étudier chez l'homme, vue l'imprévisibilité de l'évènement et sa rareté.

Se déployant dans des poumons dont les fonctions, la structure et la vascularisation sont uniques, les pathologies et les thérapies objets d'investigations, ne peuvent pas être remplacées par des modèles in vitro: nos procédures expérimentales ont un caractère de stricte nécessité et ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information biologiquement pertinente.

Moyens de s'assurer de l'utilisation du nombre minimum d'animaux nécessaires: Le recours à des lignées consanguines de souris permet entre autres de réduire le nombre d'animaux par groupe expérimental, et de ne pas prolonger les explorations dès lors que sont initiées et mesurables les conséquences biologiques des interactions entre les anticorps et leurs récepteurs (FcR). Les nombres d'animaux utilisés lors des expériences sont minimalisés, avec la contrainte d'obtenir des données statistiquement significatives. Une analyse de variances de type ANOVA sera réalisée entre les groupes.

Justifier le choix de l'espèce et du modèle animal.

La souris de laboratoire partage des nombreuses propriétés des populations de biomolécules et de cellules du système immunitaire inné et du système immunitaire adaptatif avec ceux de l'Homme. En conséquence, les résultats expérimentaux sont le plus fréquemment transférables aux humains. L'utilisation de souris 'humanisées' exprimant les récepteurs humains aux anticorps à la place des récepteurs murins permettra d'assurer que nos résultats expérimentaux soient potentiellement transférables aux humains.

Mesures prises pour minimiser les atteintes au bien-être des animaux.

Les conditions d'environnement sont optimisées par l'enrichissement des cages avec du coton compressé pour permettre aux souris de construire des nids comme dans la nature, ce qui leur permet de compartimenter leur environnement selon leurs besoins. Elles ont un accès permanent à l'eau de boisson et à la nourriture. Des points limites adaptés ont été définis pour chaque procédure afin d'anticiper toute douleur et/ou détresse de l'animal.

L'expérience de TRALI est réalisée sous anesthésie générale et a une durée maximale de deux heures. À la fin de l'expérimentation, les animaux sont mis à mort avant leur réveil.

19265 Les maladies chroniques du foie, en particulier la maladie du foie gras (encore appelée NAFLD) représentent un enjeu majeur de santé publique. Il n'existe pas de modèle in vitro reproduisant de manière fiable la NAFLD, ses complications (comme la fibrose ou la cirrhose), ni sa réparation (comme la régénération hépatique). D'autre part, plusieurs modèles doivent être utilisés pour reproduire fidèlement toutes les étapes de l'évolution de la maladie (stéatose, stéatohépatite, fibrose, cirrhose). La NAFLD est une maladie du foie liée au surpoids et au diabète qui touche plus de 18% de la population française. La maladie commence par l'accumulation de graisses dans les cellules du foie (stade de stéatose) puis apparaît une inflammation (stade de stéatohépatite) aboutissant à la formation d'un tissu cicatriciel appelé fibrose. Si on ne stoppe pas l'inflammation, la fibrose évoluera vers un stade plus grave, la cirrhose, dont souffrent plus de 700 000 patients en France et qui est responsable de 14 000 décès par an. Les mécanismes mis en jeu au cours de la progression de la maladie sont encore mal compris. De plus, il n'existe pas actuellement de traitement validé pour cette maladie. Il s'agit donc d'un enjeu de santé publique.

Le foie est capable de réparer les lésions qu'il subit, notamment en multipliant ses cellules : c'est ce qu'on appelle la régénération hépatique. Cette régénération est altérée en cas de NAFLD. Chez la souris, la régénération du foie est classiquement étudiée grâce à deux modèles : l'amputation des 2/3 du foie (encore appelée hépatectomie partielle), et l'injection d'un produit toxique, le tétrachlorure de carbone (Ccl4). Il est également possible de voir régresser la fibrose ou la cirrhose.

Ces processus de réparation sont dynamiques et nécessitent, pour les comprendre, une étude fine à différents temps après l'agression du foie.

L'objectif général de ce projet est donc de comprendre les mécanismes impliqués dans la progression, la régression et la réparation de la NAFLD dans le but d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

L'ensemble des procédures de ce projet vise à concilier une interprétation fiable des résultats et le respect du bien-être animal dans le respect de la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement).

Nous travaillerons également sur des prélèvements de foie de souris en culture ce qui permettra de tester plusieurs agents à partir d'un seul animal mais de conserver le contexte des relations physiologiques entre les cellules (Remplacement). Notre expérience antérieure ainsi que des tests statistiques de prédiction nous ont permis de déterminer le nombre minimal de souris (Réduction) nécessaires pour obtenir un résultat significatif à savoir 12 animaux par lignée, par temps et par procédure pour les temps courts (de 24 heures à 72 heures) et 20 pour les procédures plus longues (entre 2 et 24 semaines) où la variabilité inter-individuelle et le risque de sortie de protocole sont plus importants. Le nombre total d'animaux s'explique donc par le nombre de lignées (15), le nombre de procédures (6), et le nombre de temps d'analyse par procédure (1 à 4 en fonction des procédures). Par ailleurs, une fois les gènes ou les composés d'intérêt identifiés, ils seront testés *in vitro* en culture pour mieux comprendre les mécanismes mis en jeu (Réduction). Afin de réduire la souffrance, le stress et l'angoisse des souris, les interventions chirurgicales se feront sous anesthésie générale avec prise en charge de la douleur post-opératoire par administration d'antalgiques. Nous avons inclus dans les procédures des grilles d'observations des animaux et des points limites détaillés et adaptés à chaque procédure requérant l'euthanasie de l'animal ainsi que des grilles de suivi de poids et de prise alimentaire journalière (Raffinement). Les animaux seront placés dans des cages enrichies en bâtonnets en bois et en coton et seront surveillés par les expérimentateurs quotidiennement en cas de chirurgie (procédures 2 et 6), et d'injection unique de Ccl4 (procédure 3), et deux fois par semaine avec pesée des animaux pour les autres procédures de 2 à 24 semaines. Ils seront de plus observés quotidiennement par le personnel qualifié de l'animalerie tout au long de la procédure.

Nous disposons de 15 lignées de souris génétiquement modifiées (et des animaux contrôles) dont un gène a été inactivé spécifiquement dans un type cellulaire du foie. Nous utiliserons 6 procédures différentes dans une même finalité d'étudier la progression ou la régression de la maladie à différents temps. La procédure 1 est un régime alimentaire enrichi en graisses pendant 8, 16 et 24 semaines qui entraîne une stéatose hépatique. Les procédures 2 et 3 visent à étudier la réparation du foie après une intervention chirurgicale retirant une partie du foie appelée hépatectomie partielle (procédure 2) ou après injection d'un produit toxique le Ccl4 (procédure 3) sur un temps court allant jusqu'à 72 heures. Les procédures 4 à 6 induisent une fibrose du foie par administration répétée de Ccl4 sur 2 à 10 semaines par voie injectable intrapéritonéale (procédure 4) ou par gavage (procédure 5) ou enfin par voie chirurgicale en bloquant l'évacuation de la bile pendant 2 semaines (ligature de la voie biliaire principale -procédure 6). Les injections intrapéritonéales et les gavages ne nécessitent pas d'anesthésie générale. Les procédures 2, 3 et 6 sont considérées comme procédures à court terme (24 heures à 72 heures et 2 semaines pour la procédure 6), contrairement aux autres procédures (jusqu'à 24 semaines). Les procédures chirurgicales (hépatectomie partielle et ligature de la voie biliaire) se feront sous anesthésie générale par des expérimentateurs ayant validé la formation de chirurgie du petit animal. Les animaux sont euthanasiés en fin de procédure.

Des groupes de 12 (9 dans le groupe expérimental, 3 dans le groupe contrôle) pour les procédures à court terme à 20 souris (16 dans le groupe expérimental, 4 dans le groupe contrôle) pour les procédures à long terme seront utilisés par temps, ce qui correspond au minimum pour obtenir des résultats significatifs.

Ce projet se déroulera sur cinq ans et nécessitera 7388 souris.

19266 Chez l'Homme, les dépôts de cristaux d'urate de sodium (UMS) sont responsables de la goutte et les dépôts de cristaux de pyrophosphate de calcium (PPC) de la chondrocalcinose. La prévalence de ces maladies est fréquente, dépasse 17% chez des patients âgés de plus 70 ans pour la chondrocalcinose. Ces cristaux peuvent provoquer des crises inflammatoires douloureuses et handicapantes. Cette inflammation dépend d'une protéine appelée interleukine 1b (IL-1b). La production de l'IL-1b dépend de l'activation d'une protéine appelée inflammasome NLRP3. La protéine NLRP3 peut être activée par des modifications des concentrations des molécules intra- ou extracellulaires. Une baisse de la concentration des molécules extracellulaires (c'est à dire de l'osmolarité) crée un gradient osmotique qui entraîne un mouvement d'eau à l'intérieur des cellules et un gonflement de la cellule. La cellule régule son volume en déclenchant un mécanisme de compensation appelé « regulatory volume decrease » (VRD) ou décroissance volumique. Cette décroissance volumique dépend de canaux ioniques qui activent la sortie des molécules pour annuler le gradient osmotique. Le canal LRRC8 ou canal anionique de régulation volumique (VRAC) est le principal canal impliqué dans ce mécanisme.

Nos résultats préliminaires in vitro montrent que l'inflammation déclenchée par des cristaux d'UMS et de PPC dépend de gradient osmotique et du canal LRRC8

Les objectifs de ce travail sont d'étudier i) le rôle de l'osmolarité dans l'inflammation déclenchée par les cristaux ii) le rôle du canal LRRC8 dans l'inflammation microcristalline; iii) l'efficacité de l'inhibition du canal LRRC8 par une approche pharmacologique.

Pour répondre à ces questions, nous utiliserons in vivo le modèle murin de poche à air que nous maîtrisons et qui a permis l'identification des propriétés inflammatoires des cristaux de pyrophosphate (#apafis 6535). La poche, créée en injectant de l'air stérile sous la peau des souris, mime une cavité articulaire. Ce modèle décrit depuis les années 1990 est reconnu au niveau international et permet de mimer la réaction inflammatoire microcristalline observée chez l'Homme. Dans ce modèle, l'inflammation déclenchée par les cristaux se déroule en trois phases : une phase d'amplification, de plateau puis de résolution.

Pour chaque expérience, 10 animaux/groupe expérimental sont nécessaires pour obtenir une puissance statistique suffisante (tests non-paramétriques de Mann-Whitney et Kruskal Wallis), en raison de la variabilité individuelle de la réponse inflammatoire.

Les expériences seront effectuées en respectant la règle des 3 R :

Remplacement : un maximum de tests in vitro sera réalisé pour déterminer les conditions optimales à tester in vivo. Les expériences in vivo permettront de confirmer les résultats obtenus in vitro en intégrant les résultats au sein d'un organisme entier.

Réduction : pour réduire au minimum le nombre de souris, nous réaliserons le maximum de tests in vitro afin de déterminer les deux inhibiteurs les plus efficaces du canal LRRC8 et leurs doses à utiliser in vivo. Les expériences in vivo seront adaptées au fur et à mesure afin de limiter le nombre d'expérience et de limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés.

Raffinement : les souris seront, à la réception dans l'animalerie, réparties de façon aléatoire par groupes de 10 dans un environnement enrichi (jeux, abris). La poche à air ne sera créée qu'après une semaine d'adaptation dans l'animalerie.

La création des poches et les injections des microcristaux se font sous anesthésie par inhalation d'isoflurane. Chaque injection dure au maximum 30 secondes, les souris sont endormies pendant au maximum deux minutes. Le comportement des souris sera observé après la création des poches. Dans notre expérience, il n'est pas modifié par la présence d'une poche à air en sous-cutanée. Localement, nous n'avons jamais observé de complication en dehors des lésions induites par les combats. Le poids des animaux sera relevé avant et 6 jours après la création des poches, juste avant les injections des microcristaux. Si les souris montrent des signes de souffrance (comportements inhabituels, repli, perte de poids supérieur à 20%) ou en présence de lésions locales, elles seront séparées. Un traitement analgésique et des soins locaux seront administrés en cas de lésions de la poche.

Au total, ce projet utilisera 470 souris pour tester le rôle de l'osmolarité, du canal LRRC8 et de deux inhibiteurs les plus efficaces de LRRC8, deux doses différentes et deux voies d'administration

(injection locale et systémique) au cours de l'inflammation déclenchée par les deux types de cristaux. Ce nombre élevé est nécessaire et permet de tester les différents groupes expérimentaux (réduits au minimum) avec un effectif suffisant par groupe pour avoir un pouvoir statistique suffisant. Les résultats attendus permettront d'identifier un nouveau mécanisme physiopathologique et de nouveaux traitements de l'inflammation microcristalline.

19267 Depuis ces dernières décennies, on assiste à une augmentation des cas d'asthme allergique dans les pays industrialisés. Environ 300 millions d'individus seraient affectés. C'est une maladie inflammatoire chronique particulièrement invalidante conduisant à l'essoufflement du patient et pour laquelle il n'existe aucun traitement curatif. Les traitements prescrits agissent sur la survenue des symptômes ou servent à limiter l'inflammation pour permettre un meilleur contrôle de la maladie. Parmi les médicaments disponibles actuellement, les anti-inflammatoires ont des activités limitées et/ou présentent de nombreux effets indésirables. De fait, il apparaît donc nécessaire de mettre au point des traitements anti-inflammatoires efficaces et présentant moins d'effets secondaires, permettant un traitement continu des patients.

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

Adéquation avec la règle des 3R

Remplacer

Pour réaliser ce projet, l'activité anti-inflammatoire et antiasthmatique de produits pharmacologiques sera évaluée chez la souris, car c'est l'espèce la plus utilisée pour le développement des candidats médicaments dans l'asthme.

A ce jour, aucun modèle moléculaire et/ou cellulaire n'est suffisamment intégré et complexe. Il est impossible de reproduire l'ensemble des phénomènes biologiques et immunitaires impliqués dans la réaction inflammatoire allergique, ainsi que les mécanismes d'absorption, de distribution, de dégradation et d'élimination pouvant affecter la pharmacocinétique, l'innocuité et l'efficacité des candidats-médicaments. C'est pourquoi une approche chez l'animal reste une étape indispensable.

Raffiner

La procédure expérimentale est conçue pour garantir le bien-être de l'animal et réduire au maximum l'inconfort, le stress et la souffrance de l'animal. Les souris seront maintenues en groupes sociaux, dans un environnement enrichi de tubes en carton. Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude avec un suivi régulier des animaux. La température corporelle des animaux sera maintenue dès lors que les animaux seront anesthésiés, jusqu'à leur réveil complet. La douleur liée aux injections des allergènes et des candidats médicaments est une douleur ponctuelle réversible qui fera l'objet d'une surveillance de l'animal. Les animaux seront particulièrement surveillés après l'administration des candidats-médicaments pour pallier à la survenue de tout signe de toxicité. Des critères d'interruption de l'expérimentation sont mis en place en fonction de l'aspect clinique des animaux (évolution pondérale, l'apparence physique général, comportement).

Réduire

Seuls les candidats médicaments sélectionnés sur un ensemble de modèles alternatifs, dont l'efficacité et leur innocuité a été appréciée sur les modèles cellulaires et possédant les caractéristiques physicochimiques adaptées seront évalués chez l'animal.

La réalisation de ces procédures par un technicien rompu à ces manipulations garanti une bonne reproductibilité et permet de limiter le nombre d'animaux à engager dans les protocoles. De plus, cela garantie que les procédures n'auront pas à être reproduite, sauf à vouloir confirmer l'activité d'un composé. Nous avons montré que la procédure expérimentale parfaitement maîtrisée permet une évaluation efficace de l'activité anti-inflammatoire et antiasthmatique à l'aide de 3 à 12 souris pour chacun des groupes, en fonction des paramètres mesurés.

Nous prévoyons d'évaluer l'activité de 10 candidats-médicaments par an sur une période de 5 ans soit un maximum de 2000 souris.

19268 La pollution atmosphérique est un problème majeur de santé publique dans les zones urbaines. Outre les conséquences directes de l'inhalation de polluants sur le système cardiorespiratoire et les décès prématurés, l'exposition prénatale à la pollution urbaine serait associée à une augmentation du risque de développer un autisme ou une schizophrénie. Les dommages cérébraux liés à la pollution ont principalement été étudiés chez l'homme au travers d'études épidémiologiques. Ces dernières sont souvent limitées par des facteurs de confusion, qui résultent de l'histoire personnelle de l'individu et de l'évaluation rétrospective de l'exposition aux polluants. En outre, elles ne permettent généralement pas d'évaluer comment ces polluants affectent le système nerveux central. Les modèles animaux apportent des solutions à ces limites. Ils permettent une maîtrise des conditions d'exposition et la reproductibilité des expériences. Notre projet propose ainsi d'évaluer l'impact de l'exposition prénatale ou aiguë à des polluants atmosphériques sur le développement et le fonctionnement cérébral. Pour ce projet, nous utiliserons pour étudier les effets de l'exposition prénatale 240 souris gestantes et 1152 descendants. Les souris gestantes seront exposées au cours de leur dernière semaine de gestation aux atmosphères rencontrées dans deux grandes mégapoles, que sont les villes de Paris et de Pékin. Pour les expositions aiguës, 480 souris seront directement exposées à des pics de pollution de ces mêmes cités. Au total, 1872 animaux seront étudiés dans ce projet. Nous évaluerons l'impact de cette exposition sur le développement et le fonctionnement du cerveau par des approches de neuronatomie et d'analyses de transcriptome et de marqueurs épigénétiques ainsi que sur le comportement des animaux. Les variations observées seront comparées à celles rapportées dans les troubles psychiatriques, comme les troubles du spectre de l'autisme, la schizophrénie, les troubles bipolaires ou les troubles dépressifs majeurs.

Les objectifs scientifiques de ce projet, ne sont envisageables que chez l'animal, car ils nécessitent le contrôle de l'environnement complet de l'animal, depuis son développement jusqu'à l'âge adulte. Le développement du système nerveux central est complexe et ne peut pas être complètement modélisé par des cultures cellulaires dans lesquelles nous ne pourrions pas mesurer les protections naturelles apportées par le placenta et la barrière hématoencéphalique. Par ailleurs, les animaux invertébrés ont des structures cérébrales qui ne sont pas comparables à celles observées chez l'homme, contrairement à ce que nous observons chez la souris. Toutes les méthodes possibles sont utilisées pour limiter le nombre d'animaux, en étudiant notamment les mâles et les femelles descendants des femelles gestantes exposées ou non à la pollution. Les procédures que nous proposons ne doivent pas entraîner de souffrance des animaux. Néanmoins, afin d'assurer leur bien-être tout au long des expériences, les animaux seront élevés dans un environnement aussi enrichi que possible et observés quotidiennement.

L'ambition de notre projet est de fournir des preuves des conséquences directes de l'exposition à la pollution atmosphérique sur le développement et les fonctions cérébrales et de découvrir des marqueurs biologiques prédictifs du risque de développer des troubles cognitifs ou psychiatriques.

19269 L'objectif de ce projet est de valider un nouveau type d'implant de télémétrie. Ces implants pourront ensuite être utilisés dans les études précliniques réglementaires de toxicologie afin d'évaluer l'impact de candidats produits pharmaceutiques sur les paramètres cardiovasculaires et respiratoires. L'utilisation d'implants bien que plus invasifs lors de l'implantation est moins contraignante et génère moins de stress pour l'animal que la mise en place de gilets de télémétrie. Ils laissent les animaux libres de tout mouvement, et permettront d'obtenir, dans ces études, de bien meilleurs signaux que les gilets, plus proches de ceux obtenus dans les études de pharmacologie de sécurité dédiées. En effet, comme autorisés dans le cadre de lignes directrices ICH S6 et ICH S9, pour l'étude des produits biologiques et anticancéreux respectivement, les études de toxicologie incluent de plus en plus d'évaluations de paramètres de pharmacologie de sécurité, qui doivent être aussi fiables que celles réalisées dans le cadre d'études dédiées.

Le projet comprend une seule procédure incluant une première étape de validation de la technique chirurgicale d'implantation d'un nouveau type d'implant de télémétrie sur quatre primates non

humains issus d'un projet antérieur. Cette implantation se fera sous anesthésie générale avec une analgésie et un suivi postopératoire approprié. La seconde étape comprend l'administration de produits de référence à ces 4 animaux afin de tester la capacité de l'implant de télémétrie à détecter, sans manipulation ou contrainte, des variations des signaux physiologiques mesurés chez l'animal vigile.

Le projet est réalisé dans le respect des 3R :

Il n'existe pas de méthodes *in vitro* alternatives pour analyser ces paramètres, dont la variabilité est majoritairement dépendante des différentes fonctions vitales d'un organisme, des systèmes hormonaux et des aspects de pharmacodynamie. Il n'est donc pas possible de remplacer le modèle animal dans ce type d'évaluation. Le primate non humain a été choisi car c'est une espèce largement utilisée pour les molécules telles que les biologiques, pour sa proximité antigénique, avec l'homme et parce que leur petite taille impose d'adapter légèrement la technique chirurgicale déjà utilisée sur le site de l'établissement utilisateur.

Le nombre d'animaux pour ce projet est réduit au nombre minimum possible pour permettre d'obtenir suffisamment de données dans une étude de télémétrie afin de voir une différence significative entre les différentes doses testées et pouvoir tirer des conclusions pertinentes scientifiquement.

Dans le but de raffiner les conditions d'utilisation des animaux, les primates non humains sont hébergés en groupes sociaux, en cages ou en volière, et disposent d'un programme d'enrichissement avec un aménagement de leur environnement (litière, balcons, boîtes à fourrager, jouets, balançoires, perchoirs, etc...) ainsi que des récompenses. Ils font l'objet d'une surveillance quotidienne (incluant les sites chirurgicaux) sous le contrôle d'un vétérinaire ou d'un technicien animalier. Des points limites spécifiques et précoces seront appliqués.

19270 Le projet vise à tester des composés potentiellement actifs *in vivo* pour le traitement des maladies métaboliques et de leurs complications sur des modèles animaux normaux ou physiopathologiques. Les modèles physiopathologiques sont obtenus par induction alimentaire, chimique ou chirurgicale (cf. projet « Obtention de modèles animaux induits pour l'évaluation de l'effet de composés potentiellement actifs *in vivo* dans le traitement des maladies métaboliques et de leurs complications ») ou par l'intermédiaire de centres d'élevage agréés.

Les techniques employées dans ce projet sont des techniques réalisées chez l'homme (par exemple : cinétique d'effet, hyperglycémie provoquée, clamp hyper insulinémique), des techniques permettant l'évaluation de l'action d'un composé sur un organe d'intérêt (perfusion) ou des procédés non invasifs comme l'analyse de la composition corporelle. Elles ont pour finalité des dosages plasmatiques à partir de prélèvements sanguins effectués au cours et en fin d'étude. Des mesures en continu de marqueurs biochimiques (glucose, lactate, glycérol,...) peuvent également être réalisés par dosage biochimique de dialysat ou de perfusat permettant ainsi de caractériser l'action du produit au cours du temps dans un organe d'intérêt. Des dosages tissulaires à partir de prélèvements des organes cibles (par exemple foie et pancréas) peuvent être effectués en fin d'étude.

Le nombre total d'animaux nécessaire à la réalisation du projet est estimé à 11250 (rats / souris / hamsters confondus). Afin de limiter l'utilisation de ces animaux (remplacement et réduction), les seuls composés testés dans ce projet sont ceux ayant montré au préalable des effets positifs dans des tests *in vitro* (screening). Tous les animaux du projet font l'objet (raffinement) d'un enrichissement systématique et de conditions d'hébergement conformes à la directive 2010/63/UE, d'une période d'habituation par la manipulation avant l'expérience afin de limiter le stress, d'un protocole d'atténuation de la souffrance par l'administration d'anesthésique quand nécessaire et d'un suivi systématique des critères d'interruption (points d'arrêt anticipés)

19271 L'hypertension pulmonaire (HTP) est caractérisée par une élévation de la pression dans les artères pulmonaires. Il s'agit d'une maladie rare mais grave, conduisant au décès des patients. De plus, l'HTP est une maladie prédominante chez la femme. Les traitements actuels n'étant pas curatifs,

nous cherchons à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dans cette maladie. Divers modèles existent pour étudier cette pathologie. Nous souhaitons mettre en place au laboratoire un modèle d'HTP similaire à l'HTP retrouvée chez l'homme : il s'agit d'un modèle chez la souris. Nous étudierons notamment le rôle d'une protéine dans l'HTP en comparant les résultats obtenus entre des souris sauvages contrôles (ctrl) et des souris chez qui le gène a été invalidé (Souris KO), phénotype non dommageable. De plus, nous évaluerons des

différences éventuelles en fonction du sexe en comparant les résultats entre des souris mâles et des souris femelles. L'utilisation de souris dans ces expériences est indispensable pour identifier le rôle de la protéine d'intérêt dans l'HTP. En effet, les phénomènes développés dans la maladie sont complexes et ne peuvent être modélisés dans leur ensemble dans un système cellulaire in vitro. Pour respecter la règle des 3R, une planification précise des expériences a été établie afin de réduire au maximum le nombre d'animaux inclus dans cette étude, et nous proposons un projet portant sur 240 souris. Une attention permanente sera portée au bien être des animaux avant et tout au long du protocole, notamment en assurant leur surveillance quotidienne et un enrichissement de leur milieu (mélange de litière fine et copeaux, tunnels, maisons à roue). Tout au long du protocole, la surveillance des animaux sera réalisée, de manière à détecter tout signe de stress et/ou de douleur. Les mesures de la pression ventriculaire droite seront réalisées sous anesthésie afin d'éviter le stress et/ou la perception de la douleur, et les animaux seront euthanasiés sans réveil à la fin de ces expérimentations par dislocation cervicale. Suite aux résultats obtenus dans ces expériences et pour maintenir un nombre restreint d'animaux, des expériences complémentaires sur cellules humaines en culture seront réalisées pour compléter les résultats obtenus sur ce modèle. Ceci nous permettra ainsi de ne pas utiliser d'animaux dans cette partie de nos recherches.

19272 L'objectif de cette demande d'expérimentation animale est de tester la formation osseuse induite par de nouveaux biomatériaux destinés au comblement et à la régénération des pertes osseuses. Les retards ou les défauts de cicatrisation osseuse chez l'Homme sont fréquents et peuvent toucher à la fois des os longs et porteurs comme le tibia mais aussi des os de petite taille comme ceux de la main. Dans tous les cas ces pathologies sont invalidantes car douloureuses et retardent la reprise d'une activité normale.

Nous avons démontré lors de précédentes expérimentations l'efficacité vis-à-vis de la régénération osseuse : a) d'une part d'un biomatériau composé de particules d'apatite biomimétique et de sang et ; b) d'autre part de fibres de carbone utilisés sous la forme de patches. En parallèle nous avons montré, in vitro, que le carbone, grâce à sa forte porosité, pouvait véhiculer des substances médicamenteuses.

Basés sur ces résultats nous émettons l'hypothèse que l'association des deux types de particules - carbone et apatite - pourrait apporter des potentialités nouvelles et constituer un nouveau biomatériau de comblement osseux encore plus performant. Ce nouveau biomatériau serait donc constitué d'un mélange de particules de carbone et d'apatite biomimétique, l'ensemble de ces particules étant incluses dans un caillot sanguin.

Ce programme a pour but premièrement, d'obtenir la preuve de concept du potentiel ostéogénique du mélange de particules de carbone et d'apatite enrobées dans un caillot sanguin. Nous chercherons notamment à déterminer quelle proportion de particules de carbone et d'apatite se révélera la plus efficace pour induire une formation osseuse après implantation en sous-cutanée chez la souris. Deuxièmement ce programme permettra de tester l'efficacité de molécules thérapeutiques déjà connues pour favoriser la formation osseuse, véhiculées par les particules de carbone. Nous chercherons à déterminer si l'apport de ces molécules thérapeutiques in situ via ce biomatériau permet d'améliorer son potentiel ostéogénique.

Nous souhaitons utiliser 200 souris pour former 28 groupes de 7 souris (total 196). Nous avons ajouté 4 souris pour anticiper certaines difficultés lors des expérimentations. Chaque groupe de 7 sera constitué de 2 souris « donneuses » chez qui nous prélèverons du sang (le sang est nécessaire pour préparer les implants) et de 5 souris « receveuses » chez qui nous placerons sous la peau 2

implants chacune. Chaque groupe sera implanté avec le même biomatériau de sorte que nous disposerons de 10 implants par groupe ce qui est suffisant pour avoir des résultats statistiques. Notre étude comprendra ainsi deux procédures. La procédure P1 « prélèvement de sang à partir de souris donneuses » ; et la procédure P2 « implantation sous-cutanée des souris receveuses ». Pour répondre à la première question (proportion optimale de particules apatite / carbone) nous prévoyons 12 groupes et pour répondre à la seconde question (efficacité de molécules thérapeutiques) nous prévoyons 16 groupes (total 28 groupes).

Ce projet a été conçu dans le respect de la règle des 3R, i. e. remplacement, réduction et raffinement. Remplacement : il n'existe pas à l'heure actuelle de méthodes permettant d'éviter l'expérimentation animale pour tester le pouvoir ostéogénique de biomatériaux destinés à la reconstruction osseuse chez l'Homme.

Réduction: Ce modèle d'implantation, qui permet de placer deux implants par souris permet de réduire de moitié le nombre d'animaux. Nous avons calculé le nombre minimum d'animaux par groupe permettant d'appliquer une analyse statistique.

Raffinement : Toutes les expériences et manipulations des animaux seront effectuées avec le souci de préserver le bien-être de l'animal grâce à la combinaison d'une anesthésie générale, d'une analgésie pré opératoire et d'un suivi des animaux selon une grille d'évaluation prévoyant le recours à des points limites précoces et adaptés.

19273 Avec plus de 650 millions de personnes touchées dans le monde en 2016, l'obésité est devenue un enjeu de santé publique avec les problèmes sanitaires et économiques qu'elle entraîne. L'obésité est corrélée à l'apparition d'autres troubles métaboliques tel que le diabète de type 2. Le diabète se développe lorsque les cellules β -pancréatiques n'arrivent plus à produire suffisamment d'insuline pour maintenir le taux de sucres stable dans le sang (la glycémie). L'insuline étant la seule hormone qui diminue la glycémie, des défauts dans sa sécrétion ou son action dans les tissus engendrent un grand nombre de problèmes. Nous savons aussi que la consommation d'un régime gras et sucré entraîne des altérations dans une région du cerveau, l'hypothalamus, qui contrôle le métabolisme et qui peut influencer la sécrétion d'insuline et son action dans l'organisme. Il est donc déterminant de mieux comprendre comment notre organisme répond à la surcharge calorique, trouver de potentielles cibles thérapeutiques et ainsi élaborer de nouveaux traitements pour l'obésité et le diabète.

Ces dernières années, le système endocannabinoïde (SEC) a été reconnu comme cible thérapeutique potentielle pour combattre l'obésité de par sa capacité à réguler la prise alimentaire et la balance énergétique. Lors de l'obésité, le SEC est suractivé. Le récepteur aux cannabinoïdes de type 1 (CB1) est le récepteur aux cannabinoïdes le plus étudié. Il est exprimé dans un grand nombre d'organes. On le trouve au niveau hypothalamique, mais aussi dans les cellules β -pancréatiques, où il régule la sécrétion d'insuline ainsi que la glycémie. Le rôle déterminant de CB1 dans la régulation du métabolisme en fait une cible préférentielle dans le traitement pharmaceutique de l'obésité. Cependant, les fonctions physiologiques de CB1 ne sont pas seulement reliées aux types cellulaires dans lesquels il est exprimé mais aussi à sa localisation intracellulaire. En effet, CB1 est présent sur la membrane plasmique des cellules (pmCB1) mais aussi au niveau des mitochondries (mtCB1) qui constituent la source d'énergie des cellules. Sachant que la mitochondrie a un rôle crucial dans les neurones et pour la sécrétion d'insuline, il est déterminant d'étudier le rôle des mtCB1 dans l'hypothalamus et la cellule β -pancréatique et son impact sur la balance énergétique.

Nous allons utiliser un modèle animal qui a une mutation qui limite l'adressage de CB1 vers la mitochondrie, mais la quantité et la fonction de pmCB1 ne sont pas modifiées. Ceci est possible suite au troncage des 22 premiers acides aminés de CB1 (DN22CB1). Grâce à ce modèle, nous pourrions manipuler l'expression de mtCB1 dans certains types de neurones et les cellules β -pancréatiques pour étudier son rôle dans la balance énergétique et le métabolisme du glucose.

Nous prévoyons d'utiliser un maximum de 980 souris, car ce projet sera réalisé pendant 5 ans.

Au cours de notre étude, nous porterons une attention particulière à la mise en œuvre des principes éthiques fondamentaux (principe des 3Rs : Remplacement, Réduction et Raffinement) :

Remplacement : Le modèle animal présentant un défaut de localisation mitochondrial de CB1 est nécessaire pour étudier le rôle de ce récepteur dans le métabolisme énergétique. Les études in vitro ne peuvent cependant pas remplacer l'utilisation d'animaux, étant donné la nécessité d'évaluer plusieurs paramètres in vivo.

Réduction : Tous les efforts seront faits pour réduire le nombre d'animaux utilisés afin d'éviter des répétitions inutiles. Des tests de puissance ont été réalisés afin de déterminer le plus petit nombre d'animaux par groupe nécessaire afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs.

Raffinement : Afin de définir les dommages et contraintes subis par les animaux, nous avons établi une grille qui permet de surveiller leur bien-être général grâce à un système de score par points.

L'ensemble des procédures proposées est en conformité avec les directives européennes 2010/63/UE et françaises, dans le respect des nouveaux standards de soin et de bien-être des animaux, appliqués dans notre équipe de recherche.

19274 La maladie de Huntington (HD) est une maladie héréditaire et orpheline, qui se traduit par une dégénérescence neurologique provoquant d'importants troubles moteurs, cognitifs et psychiatriques, et évoluant jusqu'à la perte d'autonomie puis la mort. Cette maladie neurodégénérative est d'origine génétique. Les chromosomes, support du patrimoine génétique, sont composés d'ADN et de protéines. Les gènes sont des fragments d'ADN. Chaque gène, lorsqu'il est connu et identifié, est localisé précisément sur un chromosome. La maladie de Huntington est due à une mutation d'un gène nommé IT15 et situé sur le chromosome 4. La molécule d'ADN est constituée de quatre bases (qui constituent l'alphabet du code génétique), à savoir A(adénine), T(thymine), G(guanine), et C(cytosine). Le gène responsable de la maladie de Huntington possède une région dans laquelle une séquence de trois bases (CAG) est répétée de nombreuses fois. Le gène muté comporte une augmentation du nombre de ces répétitions. Ce gène porte l'information pour la fabrication d'une protéine, la huntingtine, dont la fonction normale est inconnue à ce jour, même si l'on sait qu'elle a un rôle protecteur sur le cerveau. La mutation responsable rend toxique la protéine huntingtine mutée. Celle-ci forme des agrégats dans les neurones du noyau caudé et putamen, et ultérieurement le cortex cérébral.

Dans ce projet, nous proposons d'étudier l'efficacité de composés en développement sur les altérations du fonctionnement neuronal qui sous-tendent la HD. Pour ce projet, nous utiliserons des souris transgéniques, modèles de la maladie. Les modifications du réseau neuronal induites par l'administration unique ou répétée de composés en développement par voie entérale (orale) ou parentérale (intraveineuse, intrapéritonéale, sous-cutanée, intramusculaire) seront évaluées sur ces souris, après la période d'administration, par des enregistrements électrophysiologiques sur coupes cérébrales.

Ce projet, d'une durée de 5 ans, nécessitera 5550 souris.

Avantages :

Ce projet scientifique associé à notre plateforme d'électrophysiologie ex vivo (sur coupes cérébrales) permettra de tester les effets neurotoxiques/neuroprotecteurs de composés en développement sur les modifications du réseau neuronal liées à la HD. La technique utilisée sera l'électrophysiologie ex vivo, c'est-à-dire sur coupes cérébrales. L'électrophysiologie est une technique très puissante qui permet l'enregistrement de l'activité électrique à l'échelle d'un réseau de neurones ou de neurones isolés.

Dommages escomptés :

Les modèles de souris transgéniques que nous utiliserons présentent un phénotype dommageable mais ne nécessitent pas de conditions d'hébergement ou d'enrichissement spécifiques. Leur bien-être sera attentivement suivi durant toute la durée du projet grâce à des fiches d'observation/points limites. Suite à l'administration des composés à tester, il se peut que des signes d'inconfort ou d'intolérance se manifestent. Dans ce cas, les points limites préalablement définis et adaptés à

chaque mode d'administration permettront d'assurer un suivi de l'état général des animaux et de mettre en place des interventions précoces et adaptées en cas de souffrance animale.

Méthodes alternatives (principe de remplacement) :

L'étude du système nerveux, de par sa complexité d'organisation, de développement et de fonctionnement, ne saurait être envisagée hors du contexte intégré retrouvé au sein de l'organisme entier. En ce sens, seules des approches menées chez un modèle animal, certes simplifié, peuvent améliorer la connaissance du cerveau humain et son développement, et ainsi aboutir au développement de nouvelles thérapies pour des pathologies neurodégénératives. Nos expérimentations sont réalisées chez la souris, car il existe de nombreux modèles transgéniques associés à la HD, utilisés communément par la communauté scientifique nationale et internationale pour la recherche fondamentale et l'étude de l'effet de composés. Ces rongeurs, de petite taille et d'élevage facile, possèdent un système nerveux dont le développement est extrêmement proche de celui du système nerveux humain, et dont l'organisation, certes simplifiée, est suffisamment complexe.

Nombre et type d'animaux, conditions d'hébergement et de soins (principe de réduction et principe de raffinement) :

-réduction : le nombre de souris utilisé a été réduit autant que possible, tout en étant suffisant pour l'obtention de résultats exploitables. Sur un même animal, nous pourrions enregistrer simultanément différents paramètres électrophysiologiques (plasticité synaptique, transmission synaptique de base, activité neuronale). L'évaluation du nombre d'animaux nécessaire a été effectuée par l'utilisation du programme GPower 3.1. Les résultats seront analysés avec le logiciel GraphPad Prism. Nous adapterons les tests statistiques en fonction de la distribution des observables, qu'elle soit normale ou non.

-raffinement : les animaux seront hébergés dans des cages collectives avec un environnement enrichi (jouets, copeaux de bois à grignoter, contact visuel et olfactif entre les animaux, musique, commutation progressive de la lumière et interactions fréquentes avec les humains). Boisson et nourriture seront disponibles ad libitum. Avant les expériences, les animaux seront acclimatés pendant une période d'au moins 5 jours. Dès que l'administration des composés débutera, une observation journalière des animaux sera mise en place. Des points limites préalablement définis et adaptés à chaque mode d'administration permettront d'assurer un suivi de l'état général des animaux et de leur bien-être (souffrance, stress, angoisse). En cas d'altération de l'état de l'animal, la surveillance sera rapprochée et les animaux seront soignés en fonction de la sévérité de la douleur observée et selon les points limites définis.

19275 La maladie de Marek (MD) est associée à un lymphome T, un cancer mortel chez la poule. Cette maladie hautement contagieuse est due à un alphaherpesvirus du genre *Mardivirus*, le virus de la maladie de Marek (MDV). Bien que la vaccination soit largement utilisée depuis les années 1970, cette maladie reste une maladie d'importance économique chez la poule au niveau mondial. La persistance de l'infection est attribuée au fait que les vaccins préviennent la formation des tumeurs mais n'empêchent pas la réplication du virus et son excrétion dans l'environnement. Aussi trouver des vaccins qui bloqueraient la maladie, mais aussi l'excrétion virale, est l'un des objectifs prioritaires de la recherche actuelle sur le MDV. Le follicule plumeux est le seul tissu connu capable de multiplier le virus de façon très efficace, ce qui permet sa diffusion dans l'environnement. Les causes de cette spécificité restent inconnues.

Le présent projet vise à étudier plus en détail le rôle d'une protéine virale dans la transmission horizontale du MDV. Il vise également à étudier si la délétion du gène codant cette protéine abolit également la transmission entre animaux de virus vaccinaux utilisés pour vacciner contre la MD (Rispens ou SB-1).

Ce projet nécessitera au maximum l'utilisation de 180 poules.

Ces expérimentations répondent aux exigences de la règle des 3 R :

Remplacement: il est impossible de remplacer le modèle par des approches in vitro ou in silico car le but de notre étude est la dissémination virale entre animaux qui, par définition, ne peut être étudiée que sur des animaux.

Réduction : Le nombre d'animaux par lot sera adapté aux buts de l'expérimentation. Ce nombre d'animaux est optimisé en s'appuyant sur les résultats obtenus lors d'autres expérimentations.

Raffinement : Les animaux seront maintenus en groupe dans des isolateurs adaptés en nombre et en taille, dans des conditions environnementales contrôlées (température et éclairage), avec nourriture et boisson à volonté. Ils bénéficieront d'un enrichissement de l'hébergement (élevés en groupe, petits perchoirs, jouets pour picorer). Les prélèvements sur animal vivant se limiteront à des prises de sang et de plumes. Une visite des animaux est effectuée 2 fois par jour par le personnel qualifié. Des points limites adaptés et des critères d'arrêt ont été prévus.

19276 La maladie de Pompe est une maladie lysosomale génétique fatale due à une anomalie de fonctionnement de l'alpha-1,4-glucosidase acide (GAA), une enzyme lysosomiale qui hydrolyse le glycogène en glucose. La déficience en GAA entraîne donc une accumulation importante de glycogène dans les lysosomes des cellules de différents organes (cœur, muscles squelettiques, système nerveux central...). Elle se manifeste par une faiblesse musculaire progressive (myopathie) et des difficultés respiratoires en fonction de l'âge d'apparition de la maladie. Ainsi, chez les enfants atteints de la forme précoce ou forme infantile, le muscle du cœur est gravement touché entraînant des troubles cardiaques sévères. En l'absence de traitement, ces enfants meurent dans les deux premières années de vie à cause d'une insuffisance cardio-respiratoire.

Malgré le développement au cours des dernières décennies de biothérapies comme les enzymes recombinantes humaines, la maladie de Pompe souffre d'une absence de prise en charge thérapeutique importante. En effet, l'efficacité thérapeutique de ces macromolécules dépend fortement de leur capacité à accéder aux organes et/ou cellules cibles. Or, du fait de leur poids moléculaire très élevé, ces molécules ont une faible distribution tissulaire notamment dans des organes possédant une barrière physiologique étanche avec le sang comme le cerveau. Cela a pour conséquence une absence totale ou partielle de ces enzymes dans certains organes et limite fortement l'efficacité du traitement à long terme. Afin de surmonter ces limites, nous avons développé de nouvelles méthodes de vectorisation permettant d'augmenter la distribution tissulaire des protéines recombinantes humaines. Ainsi, en les couplant à un système de transport spécifique au niveau des barrières physiologiques, nous avons réussi à les faire rentrer dans des organes jusqu'à maintenant inaccessibles ou difficilement accessibles.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'effet thérapeutique de ces nouvelles molécules dans des modèles transgéniques murins de la maladie de Pompe.

L'efficacité de ces molécules sera évaluée dans un premier temps in vitro dans des modèles cellulaires, organotypiques ou biophysiques. Ils permettent donc de présélectionner les meilleurs candidats médicament. Cependant, ces modèles bien que reproduisant certaines caractéristiques de la maladie humaine, ne permettent pas de prendre en compte la complexité et l'interaction de l'intégralité des systèmes biologiques, en particulier la coexistence de plusieurs barrières physiologiques et les différentes voies de métabolisme. L'évaluation complète de l'effet thérapeutique de ces nouvelles molécules vectorisées ne peut être faite qu'avec des modèles in vivo. Les études dans le modèle transgénique de la maladie permettent donc de s'assurer que les effets thérapeutiques de nouvelles biothérapies sont évalués dans un organisme entier et complexe, possédant ainsi de façon intégrée tous les paramètres comportementaux, biochimiques et pathophysiologiques de la maladie humaine. Jusqu'à présent, il n'y a pas de méthode alternative à l'utilisation de l'animal pour évaluer les aspects mentionnés.

Les produits sont administrés par les voies systémiques classiques (intra-veineuse, intra-péritonéale...) à des doses qui ne doivent pas induire d'effets secondaires. En fonction du stade de la pathologie, le traitement peut être chronique ou aigu. Les effets thérapeutiques seront évalués grâce au suivi longitudinal des animaux par imagerie TEP (tomographie par émission de positons) sous anesthésie générale, qui présente l'avantage de réduire le nombre d'animaux nécessaires et,

avec une technique non-invasive, de suivre les modifications phénotypiques de la pathologie et les effets du traitement sur le plan anatomique, fonctionnel et moléculaire. En fin d'étude, les données in vivo sont confrontés aux données post mortem. L'ensemble de ces données permettront de valider la preuve de concept et de sélectionner les meilleurs candidats pour des études de sécurité préclinique et éventuellement pour des études cliniques.

Les gestes d'administration et de prélèvements peuvent provoquer un inconfort léger et de courte durée. Les examens d'imagerie sont réalisés sous anesthésie générale gazeuse. Pour les animaux transgéniques des points limites spécifiques sont identifiés afin de limiter l'inconfort ou le stress lié au modèle pathologique entraînant des contraintes évoluant progressivement du léger à modéré voire sévère au-delà de ***5 mois d'âge***.

A la demande du scientifique, un support du service biostatistiques sera apporté aux expérimentateurs pour optimiser le nombre d'animaux utilisés dans les études.

La manipulation d'animaux, les techniques d'administration et de prélèvement sont réalisées selon les bonnes pratiques vétérinaires. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux avec de l'enrichissement et des interactions quotidiennes avec le personnel. De plus des points limites spécifiques sont identifiés pour les modèles pathologiques afin de limiter la contrainte liée au développement des pathologies.

Le nombre maximal d'animaux utilisés dans ce projet sera de 300 souris sur une période de 3 ans.

19277 Les Lymphomes B Diffus à Grandes Cellules (LBDGC) sont des cancers du système lymphatique (ensemble de cellules immunitaires qui assurent la défense de l'organisme contre divers pathogènes) à prolifération rapide, les plus fréquents dans les pays industrialisés. Les LBDGC sont hétérogènes au niveau moléculaire, une diversité qui explique pourquoi 40% des patients sont résistants (ou répondent faiblement) à l'immunochimiothérapie. Devant le peu d'alternatives thérapeutiques disponibles pour traiter les patients réfractaires, il est évident qu'il faut mobiliser nos efforts de recherche.

Nous avons récemment identifié un traitement conduisant à des régressions tumorales chez des patients atteints de LBDGC, réfractaires à l'immunochimiothérapie. Ce traitement, déjà disponible en clinique pour traiter les leucémies chez l'enfant, vise la production énergétique des cellules tumorales. L'énergie cellulaire est produite par toutes les cellules de mammifères en division et fonctionne comme un carburant. Les cellules tumorales se caractérisent par une production d'énergie exacerbée qui leur permet d'assurer une division rapide et incontrôlée. Nous avons ainsi montré qu'en exploitant cette caractéristique, nous pouvions réduire la taille des lymphomes B à des stades avancés de la maladie, ce qui représente un espoir thérapeutique considérable. C'est grâce à l'utilisation d'un modèle murin de genèse spontanée du lymphome B qui partage de nombreuses caractéristiques semblables à celles des LBDGC humains, que l'efficacité anti-tumorale de ce traitement a été validée.

Cependant, en dépit des régressions tumorales observées en clinique, 100% des patients ayant reçu ce nouveau traitement ont rechuté. Ceci suggère la présence de cellules résiduelles capables d'adaptation(s). Chez la souris, nos résultats préliminaires montrent un échappement des cellules tumorales au traitement, en raison de l'utilisation d'un nouveau mécanisme de production d'énergie. En effet, les cellules de mammifères ont à disposition différents réseaux de production d'énergie, appelés « voies métaboliques ».

Notre objectif est d'empêcher la reprogrammation métabolique qui a lieu au cours du traitement, en ciblant, spécifiquement, ces voies métaboliques dérégulées. Nous souhaitons ainsi proposer une alternative thérapeutique pour maintenir un effet durable du traitement initial, sans rechute. L'activation des voies métaboliques est un phénomène influencé par l'organisme en général et par l'environnement au contact de la tumeur (les vaisseaux sanguins modulent l'apport en oxygène et en nutriment) en particulier. C'est une des raisons pour laquelle cette étude ne peut pas être menée à l'extérieur d'un organisme vivant (comme des cellules tumorales isolées in vitro). Pour cela, nous travaillerons à partir d'un modèle murin de lymphomes B spontanés avec lequel nous avons précédemment acquis une grande expérience. Grâce à différents outils chimiques et moléculaires,

les voies métaboliques dérégulées seront bloquées et l'efficacité anti-tumorale qui en résulte sera évaluée sur le développement du lymphome et sur ses caractéristiques cellulaires, moléculaires et métaboliques.

Ce projet prend en compte les recommandations concernant les moyens à mettre en œuvre pour réduire l'utilisation des animaux (règle des « 3R ») :

- Le métabolisme tumoral in vivo est profondément différent de celui observé in vitro. Malheureusement, il n'existe pas à ce jour d'autre alternative à l'expérimentation animale pour étudier in vivo des mécanismes moléculaires et métaboliques impliqués dans l'échappement des cellules tumorales aux thérapies proposées (Remplacement).

- Pour réduire au minimum indispensable le nombre d'animaux utilisés, tout en garantissant l'obtention de résultats robustes d'un point de vue statistique, nous avons utilisé le logiciel de prédiction statistique (GPower) (Réduction). De plus, les animaux transgéniques générés (mâles et femelles) seront tous utilisés et cela nous permettra de maintenir l'élevage à bas bruit (Réduction). Lorsque les animaux devront être traités avec deux molécules simultanément, le nombre de groupe témoin sera réduit de deux (un groupe témoin par traitement) à un seul.

- Enfin, l'amélioration de certaines procédures sera possible dans le cadre de deux traitements administrés simultanément. Dans ce cas précis, les molécules seront mélangées pour pratiquer une seule injection au lieu de deux, lorsque ceci sera techniquement possible (solvant et voie d'administration identiques) (Raffinement).

Enfin, les animaux seront manipulés par le personnel formé qui assurera leur bien-être, et limitera leur stress et douleur en mettant en application des points limites précis précoces et adaptés au modèle murin utilisé et à la pathologie du lymphome.

Ce projet qui prévoit l'utilisation de 3830 souris, est soutenu financièrement par des organismes de recherche publics et privés.

19278 Le but de ce projet est l'amélioration des prélèvements de sang chez le rongeur et la diminution du volume prélevé par la mise en place du microsampling à la place du prélèvement traditionnel dans les études de toxicologie.

En effet, dans le cadre de la réglementation de mise sur le marché de substances actives (produits pharmaceutiques et/ou chimiques) », la concentration en produit actif dans le sang ou les tissus doit être déterminée chez les espèces appropriées pour augmenter la valeur des données générées dans les études de toxicologie ; ceci doit permettre de mieux comprendre les effets adverses parfois observés.

Le but de ces prélèvements est aussi de comparer l'exposition systémique (dose interne mesurée dans le sang de l'animal) avec la dose administrée (dose externe) ; permettant de déterminer des différences potentielles entre les espèces, les sexes, les âges spécifiques (foetus, animaux juvéniles, animaux en fin de vie), les durées d'exposition ... A terme, ces mesures permettent de raffiner les protocoles d'étude toxicologique et de mieux définir les doses pertinentes pour les études plus longues.

Actuellement, les volumes de sang prélevés sont de 100µL (3 fois par jour chez le rat et une seule fois chez la souris). Or, chez la souris, un prélèvement unique ne permet pas de corréler d'une manière robuste l'exposition avec la dose administrée en mélange avec la nourriture.

La mise en place du microsampling permettra de :

- Raffiner les techniques actuelles afin de diminuer le volume de sang prélevé (rat/souris),
- Raffiner le choix des différents sites de prélèvement sanguin en fonction de l'espèce (rat/souris), de l'âge de l'animal et de leur statut (gestant par exemple),
- Raffiner le choix des techniques de prélèvements et notamment les différents systèmes de collecte
- D'augmenter le nombre de prélèvements journalier chez la souris pour permettre une évaluation correcte de l'exposition des animaux,

Ce projet a pour but de valider ces différents points avant leur mise en œuvre dans les études de toxicologie.

Après une recherche bibliographique approfondie, il s'agit d'évaluer dans nos conditions de laboratoire les divers sites de prélèvements ainsi que les dispositifs disponibles tout en vérifiant l'impact sur le bien-être de l'animal.

Dans un premier temps, l'essai sera conduit chez la souris. L'objectif est de prélever un échantillon de 20µL à la veine saphène ou caudale (maximum 50µL en fonction des contraintes techniques) 3 fois par jour et d'en évaluer l'impact sur l'animal. En fin d'étude un prélèvement de sang sera analysé pour évaluer l'impact sur les paramètres hématologiques. Ensuite, une étude sera conduite avec un ou des produits connus pour comparer les résultats à ceux générés avec les techniques actuelles afin de valider la technique d'analyse.

Par la suite, le raffinement du site de prélèvement chez le rat sera réalisé afin de pouvoir le pratiquer aussi chez l'animal gestant ou juvénile.

Au total ce projet prévoit l'utilisation de 300 souris et 200 rats maximum sur 5 ans.

Les micro-prélèvements sont plus rapides et moins stressants pour l'animal. Le site et la technique de prélèvement sera adapté à l'espèce et à l'âge des animaux. Les procédures (administration, surveillance cliniques, anesthésie et autopsie si nécessaire) sont réalisées par du personnel qualifié et expérimenté. Des points limites appropriés sont définis et validés par la SBEA. A la fin de chaque test, une évaluation rétrospective est conduite par la SBEA et le comité d'éthique.

19279 L'ostéosarcome est la tumeur osseuse primaire la plus fréquente chez les enfants et les adolescents. Son traitement, les taux de guérison et de rechute demeurent inchangés depuis 30 ans. Il est urgent de mieux comprendre et de mieux traiter cette tumeur. Parce que les enfants ne sont pas des adultes en modèles réduits, il est nécessaire d'avoir des modèles reproduisant les caractéristiques tumorales liées à l'âge. Des analyses d'échantillons de patients ainsi que des expériences sur des cellules tumorales in vitro ont montré la validité de certaines immunothérapies ou thérapies ciblées, et ces agents ont été testés en clinique uniquement chez les patients adultes. Leur effet dans l'ostéosarcome pédiatrique n'a pas été testé à ce jour.

Nous avons des modèles d'ostéosarcome jeune adulte et pédiatrique tous les 2 établis chez des animaux disposant système immunitaire complet et en position physiologique. Le fait que ce modèle soit établi chez des animaux ayant un système immunitaire en fait un outil de choix pour l'évaluation d'immunothérapies. Ces modèles ont été caractérisés et reproduisent l'ostéosarcome humain en termes d'agressivité, d'environnement immunitaire, de croissance osseuse. Nous avons montré que la forme pédiatrique de l'ostéosarcome est plus agressive que la forme jeune adulte; mimant ainsi les caractéristiques de l'ostéosarcome pédiatrique humain.

Le présent projet va comparer la réponse de ces modèles à des nouvelles thérapies – pour identifier la meilleure à appliquer en fonction de l'âge d'apparition de la tumeur. Dans ce cadre nous allons tester des approches d'immunothérapie visant à booster le système immunitaire, et des thérapies ciblées stoppant notamment le cycle cellulaire.

Ce projet se déroulera en différentes étapes, nous permettant d'appliquer les 3R et donc notamment réduire au maximum le nombre d'animaux à inclure dans chacune d'elle :

Une première procédure permettra de décongeler le modèle et de le maintenir, sur des rats âgés de 4 semaines. Cette étape génère les greffons tumoraux et les suspensions cellulaires utilisés dans les procédures suivantes pour générer respectivement le modèle d'ostéosarcome jeune adulte et le modèle pédiatrique.

Les procédures suivantes vont permettre dans un premier temps de déterminer les doses optimales des traitements testés dans le modèle d'ostéosarcome pédiatrique puis de comparer l'effet antitumoral de ces traitements dans le modèle d'ostéosarcome du jeune adulte et le modèle pédiatrique. Nous testerons des agents réactivant l'immunité antitumorale (un ciblant les macrophages et un levant les freins de l'immunité) et des agents ciblant les voies de signalisation des facteurs de croissance et stoppant le cycle cellulaire. L'efficacité de ces nouvelles molécules

sera comparée à celle d'une chimiothérapie utilisée actuellement pour le traitement de l'ostéosarcome. Et enfin pour mieux comprendre les mécanismes d'action des traitements la vitesse à laquelle les meilleurs agents causent des changements de croissance et d'environnement des tumeurs sera testée. La chimiothérapie sera administrée par voie intrapéritonéale et les nouvelles thérapies par voie intraveineuse.

L'évaluation de chaque traitement sera réalisée sur le nombre de rats minimum afin d'obtenir des résultats statistiques qui montreront avec certitude l'effet anti-tumoral de ces thérapies. Cette approche comparative permettra d'identifier pour la première fois quelle approche est la plus appropriée en fonction de l'âge d'apparition de la tumeur.

Après chaque étape du projet, des analyses de la tumeur et du sang permettront de vérifier que les traitements testés causent un ralentissement de la progression tumorale et une réactivation, modification du système immunitaire.

Tout au cours de ce projet, les précautions seront prises pour stresser au minimum l'animal.

Dès leur arrivée, les animaux de la procédure 1, et servant à générer le modèle jeune adulte seront hébergés par cage de 3 individus, leur milieu sera enrichi d'objets à grignoter, de cachettes afin de les distraire.

Les animaux utilisés pour générer le modèle d'ostéosarcome pédiatrique arriveront à l'âge de 8 jours avec leur mère. Ils seront hébergés avec elle, leur milieu sera enrichi par des outils pour faire un nid : paille, boules de coton et des tunnels en carton. Au moment du sevrage, ils seront répartis par 3 animaux par cage.

Pour raffinement de nos protocoles en appliquant les 3R et donc réduire au maximum la douleur induite à l'animal au cours de toutes les opérations, un antidouleur sera administré à l'animal avant la chirurgie réalisée sous anesthésie générale. Lors de la chirurgie chez des animaux non sevrés, afin d'éviter tout possible rejet des petits par leur mère, avant leur réveil et retour dans leur cage, les petits seront frottés dans la litière sale contenant leur odeur.

L'état général et le comportement des animaux seront suivis quotidiennement et la taille des tumeurs sera mesurée 2 fois par semaine. Nous observerons tout signe de douleur relatif à la progression tumorale. En cas de signes de douleurs chez l'animal, une injection d'antidouleur sera effectuée.

Dans ce projet, un nombre maximum de 458 rats seront utilisés, répartis dans 5 procédures expérimentales. Le nombre d'animaux a été réduit au minimum mais dans des mesures satisfaisantes pour pouvoir conclure de façon statistiquement significative à l'établissement, la validation et à la conservation du modèle. L'administration d'anesthésique et d'analgésique, un suivi adapté des animaux et la définition précise des points limites précoces et prédictifs d'un mal être, permettent de limiter au maximum la souffrance animale. Ce projet peut aboutir à de nouveaux traitements pour l'ostéosarcome et pourrait ainsi permettre de proposer une alternative thérapeutique autre que la chimiothérapie aux patients atteints de cette maladie. C'est pourquoi le passage par une phase d'expérimentation animale est nécessaire.

Ce projet se déroulera alors entièrement en appliquant les 3R (réduire, raffiner, remplacer).

19280 La sclérose latérale amyotrophique (SLA) ou maladie de Charcot est une maladie neurodégénérative fatale et incurable caractérisée par la perte sélective des neurones moteurs de la moelle épinière et du cerveau. Les neurones moteurs contrôlant l'activité de l'ensemble des muscles volontaires, leur perte conduit irrévocablement à une paralysie générale et à la mort du patient dans les 2 à 5 ans. La SLA se déclare généralement entre 40 et 70 ans avec une incidence de 3-5 pour 100 000 personnes. Des lignées de souris montrent les principales caractéristiques de la maladie humaine et permettent de mieux comprendre les mécanismes conduisant à cette pathologie. Bien que les neurones moteurs soient sélectivement atteints dans la maladie, les cellules environnantes qui sont des partenaires essentiels des neurones, présentent des anomalies qui contribuent au processus dégénératif. Les cellules du système immunitaire se retrouvent également dans le système nerveux et participent au processus pathologique. Notre objectif est de comprendre la relation existant entre les motoneurones et leur environnement et de développer au

regard de cette compréhension de nouvelles thérapies. Les souris modèles de la SLA, qui présentent une atrophie musculaire progressive, ne présentent pas de signes de douleur chronique, comme il est également documenté dans les pathologies humaines.

Ce projet est connexe au projet déjà validé par le MESRI, notification du 7 juin 2018. Il consiste à délocaliser le maintien de la lignée et la génération de lots expérimentaux de souris modèles de la SLA dans une nurserie centrale.

La règle des 3R est appliquée à ce projet dans sa globalité.

Nous avons non seulement besoin de réduire le nombre d'animaux impliqués dans les expériences, mais aussi de réduire leur inconfort et douleur. Nous utilisons dès que possible des modèles in vitro de la pathologie qui permettent de réduire le nombre d'animaux. Mais la complexité des interactions cellulaires physiologiques et l'évaluation de thérapie requièrent l'utilisation d'animaux. Le raffinement expérimental est observé avec des installations réservées aux animaux conformes aux réglementations nationales et de l'UE. Cela garantit que le nombre d'animaux est réduit au minimum nécessaire pour le projet et que les normes de soins des animaux d'élevage sont maintenues. L'élevage des souris SOD1-G93A modèle de la SLA implique un suivi rigoureux des animaux afin de réduire toute souffrance, douleur et angoisse aux animaux. Une surveillance régulière est mise en place et nous travaillons étroitement avec la cellule du bien-être animal, avec enrichissement du milieu avec des copeaux dans les litières, igloo, PVC et du coton vierge pour faire un nid végétal.

Nous avons déterminé une durée du projet de 3 années pour correspondre au projet connexe, un nombre total de 200 souris portant la mutation causant la pathologie motrice. Ces souris produites porteuses de la mutation causant la SLA ont pour vocation d'être transférées avant que les symptômes ne surviennent à l'établissement utilisateur et ensuite rentrer dans le cadre du projet expérimental.

19281 L'épilepsie est une maladie neurologique fréquente, affectant 1% de la population. L'évolution de l'épilepsie commence par des crises sévères suivies d'une phase silencieuse qui peut durer plusieurs années avant que des crises ne réapparaissent et s'aggravent au cours du temps. Elle s'accompagne d'une lésion caractéristique dans le cerveau et de troubles de l'humeur et de la mémoire. Les médicaments actuels sont inefficaces chez la majorité des patients (70%). Il est donc indispensable de rechercher des traitements innovants pour réparer la lésion cérébrale et améliorer les symptômes. La mise au point de traitements nécessite une meilleure compréhension des mécanismes biologiques mis en jeu au niveau du foyer à l'origine des crises. Ces mécanismes biologiques sont autant de biomarqueurs qui permettent i) le diagnostic et le suivi de la maladie et ii) l'évaluation de l'efficacité de traitements de l'épilepsie. L'imagerie TEP (tomographie par émission de positons) permet l'étude de biomarqueurs dans le tissu cérébral, de manière non-invasive.

L'objectif principal du projet est donc d'évaluer de nouveaux biomarqueurs d'imagerie avant de les tester chez l'homme. Pour cela, nous devons utiliser un modèle d'épilepsie chez le rat. Ce modèle est très bien décrit depuis les années 1990, et reproduit fidèlement certaines caractéristiques de la pathologie humaine. Il n'existe pas d'équivalent expérimental utilisant des systèmes in vitro ou de modélisations informatiques permettant d'étudier l'évolution des crises épileptiques. Il est donc indispensable d'utiliser des animaux vivants capables d'exprimer les troubles neurologiques et de valider les biomarqueurs d'imagerie étudiés.

Le nombre d'animaux nécessaires à cette étude a été calculé grâce à une planification précise afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Il a été estimé à 150 pour les 5 ans à venir. Ce nombre est un minimum nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs.

L'épilepsie sera mimée chez une partie des animaux par l'injection d'un agoniste des récepteurs excitateurs dans une région cérébrale précise, l'hippocampe. Chez une autre partie des animaux, la neuroinflammation sera mimée par l'injection d'une endotoxine proinflammatoire au niveau de la même région. Ces deux modèles seront comparés entre eux et aussi comparés à des animaux qui auront reçu une injection de sérum physiologique, sans action au niveau cérébral. Ces injections sont réalisées lors d'une chirurgie cérébrale spécifique. Suite à la chirurgie, certains animaux seront

traités par une molécule visant à restaurer les fonctions cérébrales vis-à-vis des crises d'épilepsie, ou un placebo (groupe témoin). L'objectif de l'étude est d'évaluer l'efficacité de cette molécule dans l'épilepsie du lobe grâce au développement de biomarqueurs d'imagerie innovants. La molécule testée sera administrée selon des protocoles décrits dans la littérature, dont la bonne tolérance est connue chez l'Homme ou chez le rongeur. Une partie des animaux opérés et traités participera à des sessions d'imagerie sous anesthésie générale. Du fait du caractère non-invasif de l'imagerie, un même animal pourra participer à deux sessions d'imagerie afin de réduire le nombre d'animaux nécessaires. L'autre partie des animaux opérés sera implantée avec un dispositif crânien qui permet le suivi des crises d'épilepsie. L'implantation du dispositif sera réalisée dans le même temps chirurgical que les injections intracrâniennes sus-citées. Le suivi de ces paramètres aura lieu sur les animaux appropriés, pendant 15 jours. Etudier l'efficacité d'une molécule sur différents aspects d'une maladie complexe, telle que l'épilepsie, ne peut se faire qu'en utilisant des organismes vivants mimant la pathologie humaine. Dans un objectif translationnel les paramètres étudiés (suivi des crises d'épilepsie et imagerie cérébrale) ne peuvent l'être que sur un être vivant. Le projet met en jeu des approches qui ne peuvent être substituées par des approches in vitro.

Nous avons une grande expérience dans la manipulation des animaux et la minimisation des conditions de stress auxquelles les animaux pourraient être soumis. Les animaux seront hébergés en groupes sociaux dans des conditions de bien-être contrôlées, dans un milieu enrichi avec libre accès à la boisson et la nourriture. Nous surveillerons leur état de santé chaque jour pendant la durée des expérimentations. Pour toute intervention invasive, les animaux seront anesthésiés et un protocole d'analgésie sera mis en place pour éliminer la sensation de douleur. Des points limites adaptés, suffisamment prédictifs et précoces, seront déterminés afin de réduire la souffrance à son minimum.

Nous nous attendons à ce que la zone cérébrale à l'origine des crises puisse être correctement caractérisée grâce à l'imagerie moléculaire afin de mettre en évidence l'effet des traitements et leurs conséquences sur l'apparition des crises épileptiques et les troubles associés.

19282 La Fibrose Pulmonaire Idiopathique (FPI) est une forme fréquente et sévère des pneumopathies diffuses. Elle évolue souvent vers une insuffisance respiratoire progressive avec une médiane de survie inférieure à 5 ans après diagnostic. Les mécanismes à l'origine de ce processus pathologique irréversible restent actuellement largement méconnus.

Face à l'échec des traitements actuels contre ce type de pathologies pulmonaires, il apparaît essentiel de développer de nouvelles pistes de traitement. Les ARNs non-codants (ncRNA) représentent une classe de molécules ayant un rôle clé dans la régulation de divers phénomènes cellulaires tels que le développement, la différenciation, la survie, la réponse au stress, la prolifération et la mort cellulaire. Nous avons récemment mis en évidence le rôle de ces familles d'ARN dans le développement de la fibrose pulmonaire grâce à des études menées in vitro mais également in vivo. A ce stade de nos investigations, les essais précliniques dans un modèle murin doivent être poursuivis pour la validation de la stratégie thérapeutique (brevet international).

Le projet proposé a pour but de tester in vivo les effets de 5 molécules bloquant ces ARNs non-codants (ASOs) sur le développement de la fibrose pulmonaire chez la souris de type C57BL6 et de les comparer à 3 molécules à potentiel anti-fibrotique connues, soit un total de 8 molécules précédemment identifiées par notre laboratoire sur des modèles cellulaires in vitro.

Le protocole utilisé pour induire la fibrose pulmonaire chez la souris est largement éprouvé, et prévoit un ensemble de mesures de raffinement (analgésie, suivi quotidien) et des points limites destinés à minimiser toute souffrance, stress ou inconfort pour les animaux.

Nous attendons de ces expériences pré-cliniques des enseignements essentiels sur les propriétés des ASOs permettant d'envisager leur emploi pour le traitement des patients atteints de pathologies pulmonaires fibrotiques.

De plus, la fréquence de la plupart des pathologies fibrotiques étant fortement augmentée après 50 ans, nous incluons également dans notre étude des souris âgées (18 mois) pour être plus représentatif de la pathologie humaine.

Nous avons développé ce projet dans un souci de respect de la règle des 3R.

Remplacer: Le processus de fibrose étant un processus dynamique mettant en jeu de nombreux types cellulaires, son étude ne peut se concevoir que sur organisme entier et de ce fait nécessite de recourir à l'expérimentation animale.

Réduire: Les modèles utilisés dans ce projet utilisent des procédures déjà mises au point et couramment décrites, qui ont été élaborées afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en permettant d'obtenir des résultats statistiquement satisfaisants.

Raffiner: Le personnel impliqué dans ce projet est qualifié sur le plan technique et formé en continu sur les pratiques en expérimentation animale. Les animaux sont hébergés dans des cages enrichies avec des cotons de nidification. Une surveillance régulière des animaux sera effectuée afin de déterminer toute douleur ou souffrance éventuelle qui sera prise en charge le cas échéant, et des points limites pertinents seront déterminés.

Pour la mise en œuvre de ce projet qui durera 5 ans, le nombre total d'animaux estimé est de 1392 souris.

19283 La dépendance tabagique est l'une des causes de mort évitable la plus coûteuse pour la société. La dépendance à la nicotine, principal composé psychoactif addictif du tabac, est la principale cause de maladie et de décès prématurés chez les patients toxicomanes. De plus, l'exposition à la nicotine lors de l'adolescence pourrait avoir des conséquences à long terme sur le développement cérébral et être un facteur favorisant la survenue d'une dépendance à l'âge adulte. Comprendre les processus par lesquels la nicotine déclenche une addiction est donc un enjeu de santé publique majeur.

La nicotine agit sur le cerveau en se fixant sur des récepteurs de l'acétylcholine de type nicotinique (nAChRs). Ces récepteurs sont notamment présents sur les neurones dopaminergiques (DA) de l'aire tegmentale ventrale (VTA). En agissant sur le système DA de notre cerveau, la nicotine détourne les mécanismes naturels d'apprentissage, entraînant une surévaluation de la drogue au détriment d'autres récompenses naturelles.

La raison d'être de ce projet est de comprendre l'effet de la nicotine sur des neurones dopaminergiques qui innervent deux régions distinctes du cerveau, le nucleus accumbens et l'amygdale. Nous avons en effet montré que la drogue a une action différente sur ces deux voies neuronales et nous pensons qu'un déséquilibre entre ces voies est en cause dans la dépendance à la nicotine. Ces recherches ont pour but de 1) caractériser les différences anatomiques et cellulaires des neurones DA de ces deux voies ; 2) déterminer comment l'action de la nicotine sur ces neurones impacte les propriétés de récompense de la drogue et le renforcement menant à la dépendance ; 3) de déterminer si l'exposition répétée à la nicotine et le sevrage modifient ces deux voies, et comment ces modifications pourraient être liées à la consommation abusive de drogue et aux rechutes après sevrage ; 4) et enfin de déterminer si la nicotine affecte différemment ces voies DA chez les souris jeunes ou adultes, et si une exposition à l'adolescence favorise sa consommation à l'âge adulte.

Cette étude sera réalisée dans le respect du principe des 3R. Comprendre comment une drogue, en agissant sur ces neurones, va modifier les comportements d'un mammifère dans des proportions pathologiques, nécessite une approche globale et des recherches menées sur un modèle animal. En effet, pour mener à bien ce projet nous aurons besoin d'effectuer des enregistrements électrophysiologiques sur des cerveaux de rongeurs pour mesurer l'effet de la nicotine sur l'activité neuronale. Les différences anatomiques issues du développement normal du cerveau étant la clé de voûte du projet, nous travaillerons exclusivement sur des cerveaux entiers (in vivo ou ex vivo) sans possibilité de remplacement.

Nous prévoyons également des expériences comportementales incluant des outils optogénétiques et de l'imagerie calcique, nécessitant des procédures chirurgicales invasives en amont. Afin d'abolir au maximum la souffrance des animaux, l'ensemble des procédures chirurgicales et enregistrements in vivo seront réalisés sous anesthésie générale et sous analgésie locale ou générale. Enfin, afin de minimiser le stress des animaux et veiller à leur bien-être, les animaux

seront hébergés dans un milieu enrichi et feront l'objet d'une surveillance quotidienne. Les animaux ayant subi des procédures de chirurgie feront l'objet d'une surveillance accrue et des soins post-opératoires leur seront prodigués. Les signes de douleur des animaux seront quotidiennement évalués et la douleur, traitée par l'administration d'analgésiques. Enfin, des critères d'arrêt des expériences en cas de signes de douleur ou de détérioration de l'état général de l'animal sont établis pour limiter la souffrance des animaux. Ces points limites déclenchent l'euthanasie des animaux.

Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés ainsi que le nombre de procédures qu'ils subissent, les différents tests comportementaux de classe légère seront évalués chez les mêmes animaux quand cela est possible. Sur une durée de 5 ans, nous prévoyons d'utiliser 1400 souris pour l'ensemble des procédures de ce projet. Ce nombre est estimé sur la base de méthodes d'analyses statistiques permettant de minimiser le nombre d'individus tout en garantissant la force des résultats.

19284 La paralysie cérébrale (CP) est la principale cause de handicap moteur chez l'enfant (prévalence 2‰), liée à des lésions cérébrales autour de la naissance. Tandis qu'en l'absence de lésion cérébrale, les troubles d'acquisition de la coordination (DCD; 5-6% des enfants scolarisés) correspondent à des troubles sensorimoteurs, allant de difficultés à des déficits majeurs, qui sont associés à des désordres comportementaux et cognitifs, tels que les troubles autistiques, les troubles de l'apprentissage, de l'acquisition du langage et autres. Ces deux désordres neurodéveloppementaux sont étroitement liés à la prématurité. En effet, plus un enfant est né prématuré plus il est susceptible de développer ces désordres; or la prématurité est en nette augmentation ces dernières décennies. Nous avons développé des modèles de rongeurs reproduisant l'ensemble de ces symptômes afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents de ces désordres, et surtout dans ce projet de recherche nous cherchons à développer des pistes de prévention de l'émergence de ces désordres. Un premier modèle, consistant à restreindre les mouvements pendant le développement, reproduit les symptômes des DCD. Nous envisageons d'étudier l'influence de l'administration précoce de la toxine botulique ou la supplémentation en triptophane, un précurseur de la sérotonine impliquée dans le développement du cerveau. Notre deuxième modèle, basé sur une hypoperfusion intrautérine, reproduit les symptômes de l'encéphalopathie de la prématurité. Nous cherchons à étudier les effets de l'érythropoïétine (amélioration du métabolisme respiratoire et sanguin) ou des cellules souches mésenchymateuses (produisant des molécules anti-inflammatoires) sur la prévention des désordres de l'encéphalopathie de la prématurité. Nous cherchons à mieux caractériser ces modèles animaux et tester les pistes de prévention/remédiation les mieux adaptées.

L'ensemble des procédures expérimentales nécessaires à l'accomplissement de ce projet requiert un nombre total de 520 rats. Les mêmes animaux seront utilisés pour les tests comportementaux, électrophysiologiques puis histologiques afin d'en réduire le nombre. Le développement de modèles animaux afin d'étudier les pistes thérapeutiques ne permet pas de possibilités de remplacement par des études *in silico* ou totalement *in vitro*. Nous avons amélioré le raffinement, notre priorité pour le bien être animal, en augmentant les procédures avec anesthésie et analgésiques (antidouleurs) et en réduisant et limitant le nombre d'animaux utilisé par rapport au projet précédent. Nous sommes également très attachés aux points limites en inspectant quotidiennement les animaux en déterminant les signes cliniques modérés ou de détresse (Cf. Annexe 2) pour l'intervention qui correspond: isolement et observations plus fréquentes ou mise à mort si nécessaire.

19285 La leishmaniose est une maladie tropicale négligée. Elle englobe un large éventail de manifestations cliniques depuis la leishmaniose cutanée chronique, la leishmaniose mucocutanée destructrice des tissus, jusqu'à la leishmaniose viscérale, mortelle en absence de traitement. La leishmaniose cutanée est la forme prévalente et fait partie des maladies infectieuses qualifiées de priorité par l'OMS avec plus de 300 millions de personnes à risque. Les parasites du genre *Leishmania* sont transmis à leurs hôtes mammifères par la piqûre d'un insecte vecteur (phlébotome). Leur prolifération dans les tissus de l'hôte entraîne une morbidité importante avec, dans le cas de leishmaniose cutanée, l'apparition de lésions ulcérantes au point d'inoculation des

parasites pouvant laisser des cicatrices défigurantes très handicapantes. Les traitements sont limités en raison de toxicité ou d'apparition de parasites résistants aux médicaments. A ce jour, malgré les études réalisées sur différentes formulations de vaccins composés de parasites tués, vivants atténués ou bien les vaccins de type sous-unitaires ou à ADN, aucun vaccin homologué pour utilisation chez l'Homme n'est disponible. La mise en œuvre et le développement de nouvelles plates-formes de vaccins, de systèmes d'administration et de stratégies de vaccination sont donc essentiels à l'obtention d'un candidat vaccin sûr et efficace contre l'infection causée par les leishmanies.

Dans ce contexte nous avons produit six candidats vaccins à base d'ADN ou d'ARN codant pour une protéine parasitaire et une protéine salivaire de l'insecte vecteur pour prévenir la leishmaniose cutanée causé par *Leishmania major*.

Le but de ce projet est d'évaluer, dans un premier temps, l'immunogénicité des candidats vaccins puis, si les marqueurs retenus démontrent le développement d'une réponse immunitaire, de tester l'efficacité de trois de ces candidats vaccins à protéger l'animal contre l'infection causée par *Leishmania major*. Cette approche en deux étapes permettra, le cas échéant, une limitation du nombre de souris utilisées en conformité avec le principe de réduction de l'utilisation d'animaux. Nous attendons l'élaboration d'une réponse immunitaire chez les souris inoculées par les candidats vaccins par rapport aux groupes contrôles et de même une réduction de la taille de la lésion cutanée pour le groupe de souris ayant reçu le(s) candidat(s) vaccin(s) après inoculation des parasites démontrant l'efficacité de nos candidats.

Ce projet comprend 3 procédures, toutes 3 réalisées sur le modèle murin et plus spécifiquement l'espèce BALB/c, très susceptible aux infections causées par *Leishmania major*: (1) test de l'immunogénicité nécessitant l'utilisation de 60 animaux, de sévérité légère, (2) détermination de la cinétique d'apparition d'une lésion suite à l'injection des parasites et préparation d'un stock de parasites virulents pour laquelle 8 souris sont nécessaire et (3) test de l'effet protecteur contre l'infection parasitaire des 3 meilleurs candidats vaccins pour lesquels l'immunogénicité sera la plus élevée au terme de la procédure 1. Pour cette 3ème procédure le nombre d'animaux sera au maximum de 42 selon le nombre de candidats vaccins validés au cours de la procédure 1. La sévérité des procédures 2 et 3 est modérée.

Le nombre total d'individus (110) tient compte du respect des principes de remplacement et de réduction. En particulier, les candidats vaccins ont fait l'objet d'une analyse préalable *in silico* qui a permis de ne retenir que les candidats vaccins pour lesquels une réponse immunitaire pouvait être obtenue.

En absence de modèles *in vitro*, il reste indispensable de mesurer cette réponse immunitaire ainsi que l'efficacité protectrice au niveau d'un organisme entier. Le nombre d'animaux à utiliser pour chaque procédure a été calculé pour permettre la prise en compte de la variabilité interindividuelle au niveau des réponses immunitaires et de l'efficacité protectrice des candidats vaccins.

La procédure 1 se terminera 30 jours après l'inoculation des candidats vaccins ou si un effet nocif était constaté. L'état général des souris sera suivi régulièrement pour détecter au plus tôt une altération de leur comportement et l'apparition de signes cliniques. Pour les procédures 2 et 3, l'expérience sera terminée avant que les points limites de taille de lésion ne soient atteints chez les animaux contrôles recevant seulement les parasites. Toutes les souris seront donc observées quotidiennement afin de s'assurer du bon état général des animaux et la taille des lésions sera mesurée une fois par semaine.

Toutes les inoculations (vaccins et parasites) seront réalisées sur des animaux anesthésiés afin de minimiser stress et douleur. Un enrichissement sera apporté dans chaque cage.

Si nos résultats sont positifs, ils seront une première preuve de concept de l'efficacité de ce(s) candidat(s) vaccin(s) qui pourront ensuite être validés et considérés pour des tests cliniques.

19286 Le projet vise à développer un dispositif électronique ingérable prenant la forme d'une capsule, destinée à la mesure du temps de transit segmentaire chez l'Homme. Il s'agit d'un dispositif médical, son principe de fonctionnement repose sur l'antenne de la capsule.

L'antenne émet un signal radio qui est analysé en retour. Le signal d'origine rencontre les parois du tube digestif qui vont altérer le signal en fonction des caractéristiques électromagnétiques des tissus, déterminées par des critères de permittivité et de conductivité.

Le but de ce projet est de tester in vivo une capsule déjà validée ex-vivo qui est miniaturisée (environ 19mm x 9mm de largeur) suivant deux hypothèses de travail :

(1) Les différences entre les caractéristiques électromagnétiques des tissus des différents segments du tube sont suffisamment importantes pour être détectées par le système.

(2) Les différences constatées entre segments sont dans tous les cas supérieures aux différences inter-individuelles liées aux différences d'âge, de sexe, de morphologies...

Le dispositif devra être positionné à différents endroits du tube digestif et son correct positionnement dans les compartiments du tube digestif sera confirmé par scanner X.

Remplacement : Cette étude chez le porc devrait permettre un transfert rapide vers l'homme. La qualification du dispositif passe nécessairement par des phases d'évaluation in-vivo.

Deux phases seront à prévoir :

- phase 1 : évaluation du prototype sur modèle animal avec deux animaux maximum ;

- phase 2 évaluation du dispositif optimisé en version finale sur modèle animal avant utilisation chez l'homme avec un maximum de 8 animaux (répétabilité des mesures avec sexe différent et corpulence différente).

Le remplacement de l'utilisation des animaux n'est pas possible car l'étude se fait chez un organisme vivant ou le système digestif est proche de celui de l'homme.

Réduction : Le nombre d'animaux nécessaire est néanmoins réduit et l'étude globale prévoit 10 porcs au maximum. Si les résultats sont concluants avec un pool d'animaux moindre, l'étude sera arrêtée.

L'estimation du nombre d'animaux utilisé est principalement basée sur le nombre d'animaux nécessaire pour réaliser une analyse statistique pertinente des données prenant en compte la variabilité inter-individus. Elle tient compte de la nécessité de répétabilité des mesures avec sexe différent et corpulence différente.

Raffinement : Au cours de cette étude, toutes les dispositions seront prises afin de réduire au maximum la souffrance et le stress de l'animal. L'étude est menée par du personnel formé et expérimenté, sensible au bien-être et soins spécifiques des animaux. De plus, les animaux seront anesthésiés pendant toute l'expérience et bénéficieront de l'analgésie complémentaire spécifique. Toutes les précautions d'hébergement seront prises pour réduire le stress des animaux et permettre leur bien-être. Les animaux seront hébergés 2 par 2 dans des boxes contrôlés en hygrométrie (50-60%) et température (19-21°C) et un cycle jour/nuit (6h45 – 18h45).

19287 L'ensemble du corps humain et plus particulièrement l'intestin hébergent une communauté bactérienne résidente (microbiote), abondante et complexe, qui assure des fonctions essentielles pour la bonne santé de l'hôte ou au contraire le développement de maladies métaboliques, cardiovasculaires ou oncologiques. Le projet de recherche concerne la mise en place de colonies de souris « humanisées » avec différents microbiotes issus de patients sains ou atteints de pathologies telles que le diabète, l'obésité ou encore l'insuffisance cardiaque et les fonctions neurovégétatives. Ces colonies permettront une nouvelle approche dans l'étude de la compréhension de l'apparition de ces maladies et dans leurs traitements.

La stratégie consiste à utiliser des animaux dépourvus de tout microbiote, élevés dans des enceintes stériles ou isolateurs. L'élevage en isolateur permet d'obtenir des animaux dépourvus de microorganismes.

Nous allons implanter dans ces souris un microbiote contrôlé issu de 2 groupes de patients humains obèses avec ou sans fonctions cognitives altérées.

Des fécès issus de ces différents types de patients sont mis en suspension dans une solution saline anaérobie. Le surnageant obtenu est alors administré lors d'une unique administration orale aux souris mâles et femelles.

Ces souris « humanisées » seront ensuite utilisées pour générer un élevage dont les caractéristiques du microbiote

implanté se retrouveront dans les futures générations et permettront l'étude des différentes pathologies.

Nous estimons que nous utiliserons 30 trios (un mâle et deux femelles) de deux lignées de souris axéniques différentes et pour chacun des deux types de microbiote par an soit un total de 1800 animaux sur la durée du projet.

Dans le cadre de notre projet, nous effectuerons simplement des implantations de microbiotes définis, sans conséquences pathologiques à priori sur les animaux; l'implantation d'un microbiote donné n'entraînant pas l'apparition de la maladie. En effet, ce microbiote entraînera une susceptibilité accrue à l'apparition ou la sévérité des pathologies lors de mise sous régimes spécifiques ou de modèles chirurgicaux que nous décriront dans un autre projet qui sera soumis au comité d'éthique ultérieurement. Notre protocole expérimental respecte la règle des 3 R : remplacement, réduction et raffinement. Les mécanismes « d'humanisation » mettent en jeu des interactions complexes au sein de l'hôte que la culture de cellules en tapis ne saurait reproduire. Il est donc nécessaire de recourir à un modèle animal. Le modèle le plus approprié pour ce projet comprend actuellement l'utilisation de souris. Le nombre d'animaux utilisés est réduit pour atteindre une valeur minimale sans nuire à la qualité statistique des données. Les animaux sont hébergés dans une structure et des conditions parfaitement adaptées (élevage en isolateur, litière changée régulièrement, eau et nourriture à volonté, température et hygrométrie régulée,...) avec une surveillance quotidienne, week-end et jours fériés inclus. Les animaux bénéficient également d'un enrichissement de leur milieu (type feuille de cellulose, permettant une diminution du stress potentiel et la réalisation de petits nids par les animaux). Enfin, la souffrance éventuelle des animaux sera minimisée autant que possible et nous interviendrons immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance. tout animal présentant un aspect inhabituel : prostration, pelage terne et hirsute, traces de blessures infligées par les autres animaux sera isolé. Il fera l'objet d'une attention accrue et bénéficiera de soins appropriés (désinfection des plaies ou accès facilité à la nourriture si nécessaire). Si aucune amélioration de son état n'est constaté, il sera mis à mort le plus rapidement possible pour éviter toute souffrance inutile.

19288 La chirurgie bariatrique, inclue plusieurs techniques comme la sleeve gastrectomie (SG) et le bypass gastrique Roux en Y (RYGB). Récemment, le SADI-S (single-anastomosis duodeno-ileal bypass with sleeve gastrectomy) s'est imposé comme une nouvelle alternative intéressante chez les patients super-obèses). L'analyse des conséquences cliniques du SADI-S sur la perte de poids et l'amélioration des comorbidités (diabète, hypertension, dyslipidémies) démontre l'intérêt thérapeutique de cette procédure. La comparaison technique du RYGB et du SADI-S suggère que sa transposition chez le modèle murin pourrait avoir plusieurs avantages. En effet, le SADI-S nécessite une anastomose intestinale contre deux pour le RYGB. Cette simplification pourrait permettre 1) de limiter la nécrose observée parfois sur certaines anastomoses intestinales et 2) de réduire significativement le temps opératoire. Ces 2 améliorations devraient à terme réduire la mortalité post-opératoire observée après RYGB. Le premier objectif de ce projet vise donc à comparer les bénéfices du SADI-S vs le RYGB sur plusieurs paramètres tels que la mortalité post-opératoire, la perte de poids induite par la chirurgie, l'amélioration de l'homéostasie glucido-lipidique. Notre second objectif vise à déterminer l'importance du récepteur au LDL cholestérol dans les effets hypocholestérolémiants du RYGB et du SADI-S. Ainsi, nous mesurerons les voies d'apport et d'élimination du cholestérol chez ces souris.

Une meilleure compréhension des effets de ces chirurgies bariatriques sur le métabolisme du cholestérol et l'identification des molécules et mécanismes impliqués devraient permettre le développement de nouveaux traitements de l'hypercholestérolémie.

On estime à 391 le nombre de souris utilisées en 5 ans.

Afin de suivre la règle de 3R :

Réduire :

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

Remplacer :

Enfin, il n'existe pas à l'heure de méthodes ex vivo / in vitro de remplacement à l'expérimentation animale dans le domaine de la chirurgie bariatrique.

Raffiner:

Le procédé 1 est classée sévère. Un protocole péri-opératoire a été mis en place afin de limiter la douleur et la souffrance de l'animal. La chirurgie est réalisée sous anesthésie générale par Isoflurane. Les animaux reçoivent avant la chirurgie puis pendant une durée de 3 jours de la buprénorphine et de l'amoxicilline. Des injections de metoclopramide seront réalisées avant la chirurgie et jusqu'à J5. Les souris seront nourries avec une nourriture sous forme de gel riche en graisse (Geldiet highfat, 10% Saindoux, 10% sucre liquide, 57% eau, Safe) de J1 à J5, puis le régime riche en graisse sous forme solide sera réintroduit à partir de J3. Les souris seront supplémentées en fer et en vitamines ad libitum dans l'eau de boisson jusqu'à la fin du protocole afin de prévenir l'anémie et les carences nutritionnelles. Les souris seront placées en couveuse à 30°C pendant 5 jours post-chirurgie et leur cage sera enrichie par des frisottis ou une petite maison en carton.

19289 Les leucémies lymphoïdes chroniques (LLC) sont une tumeur des cellules du sang fréquente touchant les lymphocytes B, acteurs majeurs du système immunitaire. Cette maladie est caractérisée par une augmentation du nombre de lymphocytes présentant des altérations de la circulation entre le sang et les autres organes (rate, ganglions lymphatiques), ce qui suggère un rôle critique du microenvironnement (autres cellules du sang non tumorales). A ce jour, de nouvelles thérapies ont montré une remarquable efficacité afin de vider les stocks ganglionnaires de cellules tumorales. Cependant, l'arrêt de traitement conduit inévitablement à la rechute de la maladie voire à des résistances induites par la thérapie. Il est donc important de mieux comprendre et caractériser les mécanismes qui conduisent au trafic altéré des lymphocytes tumoraux afin d'identifier des cibles thérapeutiques alternatives. Pour cela, nous envisageons de mener une analyse comparative de la migration, de l'interaction et de la rétention de cellules B issues de patients atteints de LLC dans les organes lymphoïdes.

Le comportement des cellules B de LLC seront comparées à celui de cellules modifiées génétiquement afin de surexprimer ou de réprimer l'expression de certaines molécules clés de la migration et de l'adhésion.

Ce projet se déroulera sur 5 ans et nécessitera 1446 souris. L'approche de cette étude repose sur la capacité des cellules humaines leucémiques à migrer dans la moelle osseuse et les organes lymphoïdes chez la souris.

L'ensemble des souris qui seront utilisées dans ce projet ne présentent pas un phénotype dommageable. La conformité avec les exigences de réduction, raffinement et remplacement seront pris en compte :

1) Remplacement : Nous utiliserons autant que possible des approches in vitro pour la mise au point des protocoles. Des tests de migration et de co-culture seront réalisés in vitro.

2) Réduction : Dans ces modèles, le taux de mortalité est faible et le nombre d'animaux nécessaire et suffisant dans chaque sous-groupe pour avoir des résultats statistiquement exploitables.

3) Raffinement : Les méthodes et les mesures choisies visent à diminuer au maximum les contraintes imposées aux animaux. Une période d'acclimatation d'au moins 5 jours dans les mêmes conditions environnementales que celles qui prévaudront lors du protocole expérimental est prévue afin de stabiliser les animaux au point de vue physiologique et comportemental et de diminuer le stress. Une anesthésie sera effectuée lors des procédures douloureuses pour l'animal et l'utilisation d'antalgiques sera envisagée si l'animal présente des signes de douleur au cours de l'expérimentation. Les signes extérieurs de souffrance (perte de poids au-delà de 20% par rapport au groupe contrôle, prostration, poil hérissé, saignements) seront les critères de points limites à partir desquels nous procéderons à l'euthanasie de l'animal.

19290 Dans ce projet, des stratégies thérapeutiques innovantes sont étudiées dans deux types de cancers : le cancer du pancréas et le mélanome, deux pathologies extrêmement agressives et avec des taux de survie à 5 ans ne dépassant pas au stade métastatique 8% à 15% respectivement. Ces deux types de cancer se caractérisent par des résistances et des récurrences fréquentes et un taux de réponse encore bien trop faible pour des traitements extrêmement coûteux.

C'est dans ce contexte que se place ce projet de recherche qui a pour but d'associer de nouvelles molécules, des dérivés imiqualines, avec les chimiothérapies standards. Ces imiqualines sont des analogues de l'imiquimod qui est une molécule approuvée pour le traitement de certains cancers cutanés. Deux nouveaux dérivés ont été sélectionnés au laboratoire sur la base d'une toxicité plus faible et d'une activité plus importante. Ce projet consiste à étudier et valider le potentiel anticancéreux de ces molécules dans des modèles de souris (étude préclinique), seules ou combinées à des chimiothérapies et à de l'immunothérapie afin de déterminer le potentiel synergique de ces combinaisons thérapeutiques sur la réponse anti-tumorale.

Remplacer :L'ensemble des études décrites ci-dessus valident la nécessité de développer de véritables modèles précliniques. L'objectif est désormais d'étudier les effets de nos molécules seules et en association avec des thérapies conventionnelles dans un contexte de tumeur solide similaire à celui que l'on trouve chez l'homme. Seuls les modèles proposés nous permettront non seulement de mesurer l'efficacité de nos traitements sur la croissance tumorale mais aussi d'en étudier les mécanismes et la mise en place d'une réponse immunitaire antitumorale. A ce stade du projet il n'est donc plus possible de substituer l'animal à un modèle in vitro qui ne peut pas retranscrire la complexité des interactions entre le système immunitaire et les cellules tumorales.

Réduire :Le nombre d'animaux sera au maximum de 1020 souris sur 4 ans nous permettant d'évaluer de manière exhaustive les effets physiologiques (effets antitumoraux croissance tumorale et survie) mais aussi mécanistiques (implication du système immunitaire et composantes cellulaires et moléculaires associées) de nos molécules. Les expériences réalisées in vitro nous ont permis de sélectionner deux composés, ainsi que les doses efficaces tolérées chez la souris, réduisant ainsi le nombre de souris nécessaires à l'étude. D'autre part le projet est dessiné dans le but de réduire au maximum le nombre d'animaux dans le cheminement expérimental proposé, dans la mesure où la validation d'une étape donnera le feu vert à l'étape suivante uniquement si les résultats attendus sont significatifs. L'expertise que nous avons au laboratoire sur les deux modèles de cancer du pancréas et de la peau nous permettra de limiter le nombre d'animaux à son strict minimum afin d'avoir une validation statistique des résultats. Grâce à notre maîtrise et à notre connaissance du geste et des procédures de traitement, nous éviterons ainsi les artefacts et les pertes liées aux problèmes de greffes de lignées cancéreuses, ou aux ulcérations.

Raffiner :Les animaux seront hébergés (5 par cage) en milieux enrichis, la durée d'hébergement des animaux est réduite au minimum. Le comportement des animaux sera observé quotidiennement pour détecter tout signe de stress et d'agressivité. Une perte de poids importante, diarrhée, prostration, difficulté respiratoire, agressivité et isolement sont tous des critères d'arrêt avant la fin du protocole. Si nécessaire un animal agressif pourra être isolé des autres mais pour une durée maximale de 5 jours. Des souris femelles seront utilisées afin de réduire le risque d'agressivité et d'isolement. Un suivi de l'apparition d'autres signes cliniques sera effectué au cours de l'expérience. Ils seront reportés sur une fiche de suivi clinique, mise en place par la Structure du Bien-Etre Animal de l'Institut. Dans les conditions expérimentales définies, les animaux ne souffriront d'aucune

difficulté à se mouvoir et à s'alimenter. Les composés seront étudiés à des concentrations n'entraînant aucun effet secondaire et seront administrées sur des durées adaptées. Même si l'ensemble de nos procédures sur lesquelles nous avons du recul ne devrait pas le nécessiter, l'utilisation d'analgésiques ou d'anti-inflammatoires pourra être utilisée comme détaillé dans les procédures. Au cours de nos expériences antérieures, nous n'avons jamais observé de signe de prostration, de diarrhée ou de déshydratation induite par les greffes de cellules de mélanome ou de pancréas. Notre pratique vise à réduire le plus possible les contacts avec les animaux pour limiter les contentions et le stress qui y est associé.

19291 Si l'obésité est un réel problème de santé publique, générant une diminution de l'espérance de vie en raison des maladies qu'elle entraîne (hypertension, cancers, diabète ...), elle est également associée des déficits de mémoire. C'est d'autant plus problématique pendant l'enfance et l'adolescence qui représentent des périodes de maturation de certaines structures du cerveau indispensables pour la mémoire, comme l'hippocampe. Notre équipe a récemment mis en évidence chez la souris que la consommation d'une nourriture hyperlipidique (HL) pendant l'adolescence, en plus d'entraîner l'obésité, perturbe la mémoire et ceci implique certaines molécules, les endocannabinoïdes, au sein de l'hippocampe.

Nos études, tout comme la quasi-totalité des études de la littérature, ont utilisé des souris mâles comme modèle de l'obésité. Cependant chez l'humain, l'obésité affecte hommes et femmes de façon équivalente. Ainsi, pour élargir l'étendue de ces découvertes chez l'Homme, l'équipe s'est récemment intéressée aux deux sexes en incluant l'utilisation de souris femelles. Il a pu être démontré que la nourriture HL consommée à l'adolescence a bien des effets délétères sur la mémoire des souris femelles, semblable à ceux observés ultérieurement chez les mâles. Bien que le système endocannabinoïde (SEC) semble être également impliqué chez la femelle, les types cellulaires et/ou les structures cérébrales mis en jeu semblent différentes de celles des mâles.

L'objectif du présent projet est d'identifier les mécanismes neurobiologiques impliqués dans les déficits de mémoire induit par la consommation d'un régime hyperlipidique à l'adolescence chez les deux sexes, afin de mieux considérer l'effet genre. Pour cela, des souris mâles et femelles seront exposées pendant 12 semaines à un régime hyperlipidique (HL) ou standard (CT) avant de réaliser des tests comportementaux simples permettant d'évaluer la mémoire.

L'étude intégrée des effets de la nutrition sur des aspects comportementaux et de fonctionnement cérébral est permise grâce à l'utilisation du modèle de rongeur soumis à de la nourriture obésogène et il n'est pas possible de le remplacer par des approches cellulaires. Les tests comportementaux utilisés font appels à des comportements innés chez les rongeurs.

L'ensemble des procédures proposées est en conformité avec les directives européennes 2010/63/UE et françaises, dans le respect des nouveaux standards de soin et de bien-être des animaux (règle des 3Rs).

Remplacer : L'étude intégrée des effets de la nutrition sur des aspects comportementaux et du fonctionnement cérébral est permise grâce à l'utilisation du modèle de rongeur soumis à de la nourriture obésogène et il n'est pas possible de le remplacer par des approches cellulaires sur des modèles in vitro ou in silico. Les tests comportementaux utilisés font appels à des comportements innés chez les rongeurs. Les chirurgies sont nécessaires pour réaliser des manipulations pharmacogénétiques dans le cerveau et restent peu invasives dans la vie de l'animal. Les recherches seront réalisées en accord avec les recommandations institutionnelles pour le bon traitement des animaux de laboratoire.

Raffiner : Un soin particulier sera porté au bien-être de l'animal tout au long de sa vie. Elles recevront de l'eau et de la nourriture à volonté et seront surveillé régulièrement. Les chirurgies seront réalisées sous anesthésie générale avec administration d'analgésiques en pré- et post-opératoire pour limiter la douleur. Toutes les précautions d'asepsie et de confort seront prises pour limiter l'inconfort des animaux (application d'un gel ophtalmique, opération sur tapis chauffant, ré-hydratation post-chirurgie). Les jours suivant la chirurgie, les animaux sont surveillés attentivement une fois par jour pour s'assurer de leur bon rétablissement. Avec la mise en place de points limites, si un animal

présente une anomalie (perte de poids, blessures, plaies, déshydratation, prostration, perte d'interaction avec l'environnement, agressivité accrue, réduction de mobilité) il sera immédiatement isolé, surveillé et soigné par la prise d'un anti-inflammatoire (carprofène, 20 mg/kg s. c) pendant 3 jours jusqu'à amélioration. Durant les mois suivants la chirurgie, les animaux seront surveillés tous les jours de la semaine et pesés 1 fois par semaine par un personnel qualifié. S'il n'y a aucun signe de mal-être chez l'animal, il passera en phase comportementale qui sera optimisée pour durer le moins de temps possible. L'expérimentateur prendra le plus grand soin en manipulant l'animal et les tests comportementaux seront le moins stressant (lieu calme, acclimaté et inoffensif) et les souris seront remisent avec leurs congénères entre chaque phase de test. Les injections pharmacologiques seront réalisées de façon aigüe de sorte à limiter les interventions sur l'animal.

Réduire : Tous les efforts seront faits pour réduire le nombre d'animaux en effectuant plusieurs tests comportementaux chez les mêmes individus plutôt que des groupes différents, et de réduire les souffrances inutiles. De plus, le nombre d'animaux sera réduit au mieux grâce à l'utilisation de tests statistiques minimisant le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir des résultats concluants et permettre des comparaisons statistiques fiables. Cela représente un total de 832 (444 femelles et 390 mâles) sur 5 ans. Ces expériences devraient permettre une meilleure compréhension des effets d'une nourriture HL sur le cerveau et la mémoire en identifiant certains mécanismes afin d'envisager potentiellement à plus long terme des stratégies thérapeutiques.

19292 L'exercice régulier joue un rôle préventif de nombreux troubles cardiovasculaires, neuromusculaires et cognitifs. L'adolescence est une période cruciale où l'exercice est fortement recommandé, y compris pour la santé mentale. Les 2 grands types d'entraînements en endurance les plus répandus, y compris chez les adolescents, sont 1) l'exercice prolongé d'intensité modérée (MICT) où l'intensité d'exercice utilisée ne provoque pas une fatigue rapide et d'induit pas d'accumulation de métabolites musculaires et 2) les exercices fractionnés de haute intensité (High-Intensity Interval Training ; HIIT) qui consistent en une succession de séries d'effort brefs (10 sec à 5 min) et intenses, séparées par des périodes de récupération actives ou passives. Bien qu'ils semblent bénéfiques pour les fonctions cérébrales, leur impact sur les fonctions cognitives n'est pas encore clair. Combien de temps d'entraînement faut-il pour induire des répercussions cognitives à partir de chaque stratégie d'endurance ? A ce jour, il n'est pas encore possible de le déterminer. Le recours au modèle animal, en l'occurrence le rat adolescent, est indispensable pour établir un premier lien entre activité cérébrale et performance cognitive car ces mécanismes cérébraux ne peuvent pas être étudiés chez l'être humain.

Par ailleurs, plusieurs études rapportent que l'endurance devrait être combinée avec des exercices cognitifs pour améliorer les performances cognitives spécifiques de ces dernières. Ces effets sont particulièrement importants à l'adolescence où la plasticité cérébrale est très active. Nous allons tester cette hypothèse chez le rat sain en les entraînant (MICT ou HIIT) et en les combinant à un entraînement cognitif à partir de la tâche du Barnes maze pour analyser leurs effets cumulés. Ainsi, l'évolution des marqueurs de neuroplasticité et de l'amélioration des fonctions cognitives sera réalisée sur 2 semaines d'entraînement en endurance et cognitif (cinétique à 1 et 2 semaines).

La règle des 3R sera respectée dans ce projet :

Remplacement : il n'existe à l'heure actuelle aucun modèle de substitution in vitro pour étudier l'impact de ces entraînements sur la neuroplasticité. Il n'existe pas non plus de méthodes alternatives capables d'étudier leurs effets sur les fonctions sensorimotrices et cognitives. Le rat reste un modèle de choix pour étudier les mécanismes de neuroplasticité.

Réduction : Nous utiliserons le nombre minimum d'animaux pour chaque groupe, nécessaire à la réalisation d'un test statistique paramétrique, soit un total de 210 rats Wistar, mâles et femelles (même nombre dans chaque groupe).

Raffinement : Les expérimentations seront optimisées dans l'optique de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort ou l'anxiété subie par les rats. Par exemple, l'environnement des cages sera enrichi par la présence d'objets afin de réduire l'ennui des animaux. Les animaux resteront en groupe dans la cage (pas d'isolement social). La nourriture sera à disposition de l'animal

directement dans la cage. Les animaux seront également familiarisés avec les différents outils de mesure (tapis roulant, cage pour le comportement, plateforme du Barnes Maze). Concernant les points limites, si le rat est prostré ou en retrait, si ses poils sont hérissés (voir plus bas les points limites détaillés). Il n'y aura pas d'analgésie particulière pour ce protocole. Avant les prélèvements du cortex et de l'hippocampe, les rats seront anesthésiés sous isoflurane (induction uniquement 4-5 %) avant d'être anesthésié avec de la kétamine-xylazine (120mg/Kg-20mg/kg).

19293 Les cellules endocrines du pancréas et de l'intestin produisent de nombreuses hormones (dont l'insuline) qui jouent un rôle essentiel dans la régulation de la glycémie et du métabolisme énergétique, ainsi que dans le contrôle de l'appétit et de la digestion. L'altération de ces cellules peut conduire à des pathologies sévères telles que diabète, obésité et malabsorption intestinale. Notre laboratoire cherche à définir quels sont les gènes impliqués dans la formation des cellules endocrines et à comprendre comment ces cellules et les hormones qu'elles produisent, agissent sur le métabolisme énergétique et l'homéostasie intestinale. La présente demande porte sur l'étude de la fonction du facteur de transcription Pax4 dans les cellules endocrines intestinales.

Plusieurs études ont montré que des mutations du gène Pax4 sont associées à différentes formes de diabète chez l'Homme. Des modèles de perte de fonction de Pax4 chez la souris ont montré que ce facteur est crucial pour le développement des cellules beta pancréatiques, responsables de la sécrétion d'insuline. En outre, les souris constitutivement déficientes pour Pax4 présentent un diabète sévère à la naissance et meurent dans la période périnatale. Du fait de cette létalité précoce, le rôle de Pax4 dans l'intestin mature adulte n'a pas pu être analysé à ce jour. Pour étudier cette fonction, nous avons dérivé une lignée murine « conditionnelle inductible » (permettant un contrôle spatiotemporel de l'inactivation de Pax4) à partir du modèle Pax4 tm1a (EUCOMM) Hmgu établi par « l'International Mouse Phenotyping Consortium ».

Dans cette nouvelle lignée, l'expression de Pax4 peut être invalidée spécifiquement dans l'intestin uniquement après l'administration d'une drogue, le tamoxifène. Nous souhaitons administrer du tamoxifène à de jeunes adultes (à partir de 8 semaines) et analyser les répercussions à différents temps post-traitement (1, 4, et 12 semaines), en suivant notamment l'évolution de divers paramètres (poids, production de fèces). Après chaque temps, nous réaliserons des analyses histologiques, biochimiques et de biologie moléculaire sur l'intestin et d'autres tissus pouvant être affectés (pancréas, foie). Ces analyses seront menées sur des lots de 10 mâles ou de 10 femelles de chaque génotype (mutants/contrôles), à chaque temps après traitement (3x(10 contrôles + 10 mutants)) soit un total de 60 mâles et 60 femelles. Ces effectifs tiennent compte d'éventuelles différences liées au sexe ainsi que de pertes potentielles suite à l'administration de tamoxifène.

En parallèle, nous voulons établir des cultures d'organoïdes intestinaux in vitro. Ces organoïdes représentent des « mini-intestins » récapitulant assez fidèlement de nombreux aspects de l'épithélium intestinal, que l'on peut manipuler aisément in vitro. Ils seront générés à partir d'intestins d'animaux traités au tamoxifène et non traités ; dans ce dernier cas, la délétion de Pax4 pourra être induite in vitro en appliquant le tamoxifène directement dans le milieu de culture des organoïdes. Les organoïdes seront générés à partir de 8 animaux de chaque génotype (mutant/contrôle) et de chaque sexe, ayant reçu ou non un traitement au tamoxifène, soit un total de 64 animaux.

Cette étude nécessite un total de 184 animaux.

Remplacement : ce projet comporte des analyses du métabolisme et de l'homéostasie intestinale qui ne peuvent être réalisées que dans l'organisme entier, tenant compte des interactions entre les différents organes et des stimuli environnementaux (aliments, flore intestinale).

Réduction : l'établissement de culture d'organoïdes intestinaux in vitro vise à diminuer le nombre d'animaux utilisés, tout en permettant de réaliser de multiples analyses dans un environnement défini, qui ne pourraient être menées in vivo (en particulier, en cas de phénotype dommageable). Les effectifs ont été calculés pour permettre l'exploitation des données avec des tests statistiques appropriés (tels que le test non paramétrique de Mann et Whitney adaptés à de faibles effectifs).

Raffinement : les animaux seront maintenus en groupe et dans leur environnement habituel (dans une cage avec enrichissement). L'administration de tamoxifène (par gavage) sera réalisée par un

personnel compétent, ayant l'habitude de cette procédure, qui assurera une surveillance systématique après traitement. Si le tamoxifène est mal toléré (avec perte de poids importante, diarrhées, prostration, apathie) et en l'absence de récupération après l'arrêt du traitement, l'animal sera mis à mort.

19294 Les preuves scientifiques permettant de démontrer l'intérêt de l'introduction de matières grasses laitières dans l'alimentation des jeunes et des plus âgés sont peu nombreuses. Nous émettons ici l'hypothèse que la matière grasse laitière pourrait avoir un impact favorable sur les fonctions cérébrales, et en particulier sur les fonctions cognitives, à plusieurs moments de la vie. Cet impact positif pourrait être procuré notamment grâce aux acides gras oméga-3 à longue chaîne qu'elle contient, contrairement à la matière grasse végétale qui n'apporte que des acides gras oméga-3 à courte chaîne. Pour tester notre hypothèse, nous proposons une étude pour déterminer si l'introduction de matières grasses laitières dans le régime de primates omnivores, comparativement à un régime à base d'huiles végétales, a un impact sur le fonctionnement cérébral et en particulier sur les fonctions cognitives à deux âges de la vie : pendant la croissance et au cours du vieillissement.

Chez les jeunes, notre hypothèse est que la descendance de mères alimentées avec un régime supplémenté en matières grasses laitières au cours de la période périnatale (gestation jusqu'au sevrage) et maintenu jusqu'à l'adolescence présenterait des réponses comportementales et cognitives, ainsi que des profils d'expression de microARN, différents en comparaison avec le groupe recevant des matières grasses exclusivement végétales. Nous étudierons les mêmes paramètres chez des animaux recevant le régime supplémenté en matières grasses laitières exclusivement pendant la période post-sevrage (régime différent de leur mère). Cette étude permettra d'évaluer les effets bénéfiques à long terme (comprenant l'empreinte maternelle) de la matière grasse laitière en couvrant la période du développement du jeune primate. L'utilisation d'un primate omnivore, à longévité relativement longue est indispensable étant donné le caractère appliqué à la nutrition humaine de cette étude. La croissance (et en particulier l'adolescence) des rongeurs couramment utilisés en recherche pré-clinique ne permet pas une transposition des résultats aussi pertinente que chez une espèce à croissance plus longue et phylogénétiquement plus proche de l'humain.

En ce qui concerne les animaux âgés, notre hypothèse est basée sur le fait qu'une amélioration de l'apport en nutriments et notamment la qualité des acides gras pourrait retarder d'une manière significative l'installation du déclin cognitif chez le primate âgé. En effet, le déclin cognitif et l'installation de maladies neurodégénératives sont associés à une altération de l'insulino-sensibilité qui elle-même est tributaire du statut inflammatoire notamment au niveau cérébral. Par conséquent, notre projet aura pour objectif de démontrer que l'introduction de matière grasse laitière dans l'alimentation d'animaux âgés permettrait d'améliorer le statut inflammatoire au niveau central et par conséquent de maintenir une sensibilité à l'insuline, ce qui est en faveur d'une amélioration des performances cognitives et du retardement de l'apparition des signes précoces de la neurodégénérescence.

Ce projet se décline en 6 procédures, chacune appliquée aux animaux jeunes et âgés. La procédure 1 consiste à mesurer les facultés psychomotrices uniquement des animaux juvéniles. La procédure 2 consiste en la réalisation de tests cognitifs (discrimination visuelle, test de champ ouvert, alternance spontanée, rotarod,). La procédure 3 consiste en des prélèvements sanguins pour les dosages de lipides plasmatiques, et les dosages de micro-ARN. La procédure 4 consiste à évaluer les paramètres du métabolisme périphérique du glucose. La procédure 5 consiste à mesurer la composition en gras des animaux par résonance magnétique nucléaire. La procédure 6 consiste en la réalisation de mesures d'électroencéphalographie (EEG) chez une fraction (1/4) des animaux jeunes ayant déjà atteint une taille adulte et des animaux âgés. Cette fraction d'animaux sera choisie sur la base des résultats des autres procédures pour assurer une bonne homogénéité des groupes expérimentaux.

L'application du principe des 3R est prise en compte selon les critères suivants : 1) Réduire : afin de répondre à l'exigence de réduction du nombre d'animaux, ces expériences seront réalisées sur

un nombre maximal de 72 animaux (48 jeunes, 24 âgés), nombre suffisant pour évaluer les effets de régimes sur les fonctions cognitives notamment. Les effectifs, déterminés à partir d'un test de puissance, prennent en compte la variabilité interindividuelle attendue au sein des groupes expérimentaux pour les mesures de cognition (paramètres qui présentent la plus grande variabilité) et permettront de réaliser des tests statistiques avec assez de puissance (au minimum 85%). Ce principe est également appliqué via la réduction du nombre d'animaux qui seront impliqués dans la procédure la plus invasive : l'EEG. Pour cette procédure le nombre d'animaux total sera réduit à 18 (12 jeunes, 6 âgés, représentatifs de l'ensemble des animaux sur la base des résultats des autres procédures). 2) Remplacer : ces expériences ne peuvent être remplacées par des méthodes alternatives puisqu'elles nécessitent l'exposition péri-natale au régime et notamment l'allaitement des petits par les mères. Les interventions nutritionnelles ayant par définition des effets sur l'organisme entier (de la digestion à l'utilisation des micronutriments et de leurs métabolites par les différents organes), ces expériences ne sauraient être remplacées par des expériences in vitro par exemple. 3) Raffiner : Les conditions générales de l'élevage seront conservées (fréquence de nourrissage, enrichissement, maintien des groupes sociaux) et les procédures appliquées seront organisées de sorte à laisser des temps de récupération longs entre deux procédures. Toute procédure entraîne un suivi attentif de chaque individu afin de s'assurer du bien-être des animaux utilisés. Pour cela nous utiliserons des points limites adaptés et des critères d'arrêt spécifiques de l'espèce comme le poids de l'animal, la prostration, l'absence d'alimentation, des symptômes apparents de gêne ou de douleur (irritations, etc) ou enfin des troubles du comportement (agressivité, sur-léchage, etc) sont particulièrement suivis. Le raffinement sera notamment assuré grâce à une bonne maîtrise des procédures réalisées par du personnel qualifié.

19295 La reproduction saisonnée est une réponse adaptative cruciale pour faire face aux changements environnementaux annuels. Afin de permettre la naissance des petits au printemps, les espèces se reproduisent durant le printemps (gestation courte, hamster) ou durant l'automne (gestation longue, mouton). Nos travaux ont identifié un rôle important pour deux peptides hypothalamiques dans le contrôle de la saisonnalité: RFRP3 (RF-amide Related Peptide 3) et KISS1. Contrairement à KISS1, les modalités d'action du peptide RFRP3 demeurent énigmatiques. En effet, les connaissances actuelles quant au rôle de ce peptide dans la reproduction sont même parfois contradictoires, notamment car les outils pharmacologiques disponibles ne sont pas suffisants pour répondre de façon univoque à la question de son implication. Pour définir de façon claire le rôle du RFRP3 dans le circuit qui régule la reproduction saisonnière nous allons donc invalider le gène chez le mouton, en utilisant la technique CrispR-Cas9 d'édition du génome (Genome editing = GE).

Ces expérimentations s'inscrivent dans le cadre plus large d'un projet qui a pour objectifs de définir en parallèle le rôle du peptide RFRP3 dans la saisonnalité de la reproduction chez le mouton et le hamster, et de mieux caractériser les neurones qui expriment ce peptide.

Pour la partie du projet consacrée à l'étude du rôle du gène *Npvf* (qui encode le peptide RFRP3) chez le mouton, objet de la présente demande d'autorisation, le GE se fera chez des brebis de la race Romanov qui présente plusieurs avantages. C'est une race poly-ovulante, avec une prolificité d'environ 2,5 (c'est à dire en moyenne 2,5 agneaux/agnelles par mise-bas) et les brebis présentent un comportement maternel très marqué, favorable à la survie des petits. La production des animaux édités se fera sur une ou deux années, selon les résultats obtenus lors de la 1ère année. La décision de poursuivre en 2ème année dépendra du nombre, du sexe et du génotype des animaux GE. Effectivement, il est nécessaire d'obtenir des moutons édités de sexe mâle (i. e. agneaux) afin de pouvoir générer une descendance suffisante pour étudier l'impact sur le phénotype saisonnier. Les expériences se dérouleront durant la saison de reproduction afin de faciliter les procédures. Chaque année, 4 expériences seront menées et, pour chaque expérience 12 brebis seront nécessaires (6 brebis donneuses d'ovocytes fécondés et 6 brebis qui recevront ces ovocytes fécondés après GE). Pour ce projet, nous utiliserons donc un maximum de 96 brebis Romanov. A partir du moment où 4 agneaux porteurs de mutations pour les deux copies du gène *Npvf* (édition bi-allélique) seront obtenus, les essais s'arrêteront et les expériences suivantes seront annulées. Ces agneaux de F0 serviront de fondateurs. Il est donc possible que ce projet engage moins d'animaux que les 96

prévus. Néanmoins, l'obtention d'animaux bi-alléliques pour Npvf dès la F0 demeure incertaine. Dans le cas où seuls des agneaux mono-alléliques seraient obtenus, un schéma d'élevage classique avec back-cross (croisement des brebis F1 avec le fondateur F0) serait envisagé afin d'obtenir des individus homozygotes pour la mutation du gène Npvf. La saisonnalité de la fonction de reproduction est caractérisée par des fluctuations cycliques annuelles des taux sanguins de nombreuses hormones (e. g. hormone lutéinisante (LH), hormone folliculostimulante (FSH), Progesterone et estradiol) qui seront donc dosées afin d'évaluer une éventuelle perturbation de cette fonction. La fertilité des animaux GE sera également évaluée par saillie naturelle. Il s'agit exclusivement d'un projet de recherche fondamentale, aucune application agronomique n'est envisagée. Dans le cas où les brebis seraient désaisonnées, ou présenterait un avantage reproductif quelconque, il n'est pas question qu'elles puissent être utilisées à des fins d'élevage et de consommation. Selon la directive de l'UE (25 Juillet 2018) les animaux édités par CrispR-Cas9 sont considérés comme des OGM et doivent donc être traités en tant que tel. La reproduction saisonnée affecte virtuellement toutes les espèces (plantes et animaux) qui vivent à des latitudes tempérées ; la compréhension des mécanismes de la saisonnalité et du photopériodisme va donc bien au-delà des questions d'agronomie. Il s'agit notamment d'un enjeu dans le contexte du réchauffement climatique.

Nos protocoles expérimentaux se conforment à la règle des 3R :

Remplacement : L'étude du RFRP3 et des neurones exprimant ce peptide ne peut être envisagée ex vivo car elle concerne un mécanisme complexe sur organisme entier. Les outils CrispR/Cas9 seront testés sur des ovocyte fécondés (=cellules-œufs) bovins produits in vitro à partir d'ovaires collectés en abattoir afin de valider les outils les plus efficaces pour réaliser les expérimentations sur la brebis.

Réduction : Nos protocoles utilisent un nombre minimal d'animaux, défini d'après les expériences antérieures des partenaires du projet. Ces protocoles permettent de diminuer le nombre de procédures expérimentales.

Raffinement : Tous les protocoles se font dans le respect du bien-être animal. Nous limiterons au maximum la souffrance des animaux avec l'utilisation d'anesthésiques et d'analgésiques lors du transfert chirurgical des embryons (terme employé à partir du stade 2 cellules) édités chez les brebis receveuses. Les femelles receveuses seront hébergées en petits groupes (espèce grégaire) dans un bâtiment conditionné pour accueillir des animaux génétiquement modifiés (agrément OGM). Une surveillance quotidienne des animaux sera effectuée par les responsables du bien-être animal. Si un animal devait présenter des signes de douleur, de stress ou d'inconfort, comme une prostration, une absence de déplacement après une stimulation physique ou tout autre critère défini comme point limite, nous solliciterions le vétérinaire référent pour trouver une solution. Si aucune solution n'était envisageable, l'animal serait euthanasié. Finalement, en l'état actuel de nos connaissances, aucun phénotype dommageable de la mutation du gène Npvf n'est envisagé.

19296 La presbytie, qui survient systématiquement après 45 ans, concerne 1,8 milliard de personnes, dont 826 millions ne sont pas ou sont mal corrigés. Il est bien documenté qu'elle est causée par une rigidification du noyau du cristallin empêchant les muscles accrochés à la périphérie du cristallin de modifier d'épaisseur et de courbure nécessaires à l'accommodation.

Le cristallin est composé de cellules contenant des protéines appelées protéines cristallines, qui sont solubles et le rendent transparent en homogénéisant son indice de réfraction. En vieillissant, les agrégats de cristallines (protéines principales du cristallin), deviennent insolubles et rigidifient le noyau. L'hypothèse principale est qu'il est nécessaire de « ramollir » le noyau du cristallin en désagrégeant les protéines cristallines. Une des techniques les plus appropriées pourrait être le laser femtoseconde. Ce dernier permet d'envoyer de très courte impulsion d'énergie photonique avec précision dans le tissu sans dégagement d'énergie thermique.

Si ce traitement semble une alternative de choix pour traiter la presbytie, une première étude sur le lapin nous a permis de rendre compte de l'absence d'effets secondaires sur le cristallin et la rétine dans les jours-mois qui suivent ce traitement laser femtoseconde.

Lors de cette précédente étude un des 6 lapins a été traité avec une énergie de laser femtoseconde donnant les résultats très encourageants voir capital dans la suite du projet. Les impacts lasers présent en postopératoire immédiats ont disparu en moins de 2 jours. Le but de ce projet est donc de valider les résultats obtenus avec ce lapin afin de confirmer nos hypothèses quant aux énergies de lasers femtoseconde à utiliser pour le traitement. L'environnement très cloisonné du cristallin in vivo et sa complexité physiologique rendent sa conservation ex vivo impossible. Un traitement au laser des cristallins sera mis en place et effectuée par une autre structure de recherche comme l'autorise le décret no 2020-274 du 17 mars 2020 modifiant certaines dispositions relatives à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques.

Au total, maximum 3 lapins seront utilisés pour ce projet. Ces lapins seront suivis durant 1 mois. Les seront suivi avec précaution pour s'assurer qu'il n'y ait pas d'effets secondaires inattendus liés à la répétition de ces gestes.

Le nombre d'animaux est réduit au MINIMUM pour que les résultats soient représentatifs de la variation interindividuelle qui devrait être faible dans notre étude. Ce nombre doit OBLIGATOIREMENT ÊTRE MIS EN OEUVRE IN VIVO afin d'être au plus proche de la situation clinique chez l'homme. Tout est mis en œuvre pour LIMITER AU MAXIMUM LE STRESS ET LA DOULEUR DE L'ANIMAL (anesthésie générale pour les imageries). Le traitement laser, effectué d'un seul côté, est peu invasif (aucune incision débouchant vers l'extérieur) et ne devrait pas déclencher de douleur après le geste. Chaque animal bénéficiera d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les observations, mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. La douleur est rigoureusement contrôlée grâce à des points limites évalués en amont, et gérée grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (myorelaxant/anesthésie/analgésie).

Par ailleurs, les lapins seront hébergés en cage réglementaire (plateforme paroi transparente entre 2 cages), dans un environnement enrichi (jouet kong et autres jeux). Enfin, l'eau et la nourriture (granules et foin) sont mises à disposition "ad libitum" et de la musique est diffusée en salle d'hébergement pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux.

19297 Les tiques sont les premiers vecteurs d'agents pathogènes en Europe et constituent un risque majeur pour la santé humaine et animale en transmettant la plus grande variété de microorganismes (bactéries, parasites et virus). La plupart des agents pathogènes transmis par les tiques sont zoonotiques (transmissibles de l'animal à l'homme), certains ne touchent que les animaux mais avec un impact économique très important et d'autres sont découverts chaque année. Les principales maladies liées aux tiques en Europe sont la Borréliose de Lyme, l'Anaplasmose et l'Encéphalite à tiques, et leur vecteur est la tique *Ixodes ricinus*, qui présente une très large répartition géographique. Au sein de notre laboratoire et dans diverses études il a été mis en évidence que les co-infections dans les tiques (plusieurs microorganismes présents dans une même tique) pouvaient être très fréquentes. Chez l'Homme la majorité des patients présentant une maladie de Lyme chronique rapportent également des co-infections par d'autres bactéries ou d'autres parasites. Enfin en laboratoire il a été démontré que chez des souris co-infectées par deux bactéries (*Borrelia* et *Anaplasma*) on constatait une différence de réponse immunitaire de la souris suite à l'infection, une différence de pathogénicité des bactéries chez la souris ainsi qu'un impact sur l'acquisition de ces bactéries par les tiques comparativement à des infections simples. Dans notre projet nous souhaitons étudier les co-infections par deux bactéries (*Borrelia afzelii* et *Anaplasma phagocytophilum*) et un virus (le virus de l'Encéphalite à tiques TBEV) chez les tiques *Ixodes ricinus* et chez l'animal (souris). Avec dans un premier temps la mise en place de modèle de co-infections chez les tiques et l'animal, afin d'étudier comment ces co-infections modulent la réplication, la pathogénicité et la transmission de ces agents pathogènes comparativement à des modèles d'infection simple par ces mêmes agents pathogènes. Puis dans un second temps, nous nous intéresserons au microbiote des tiques qui peut aussi réguler/intéragir avec les agents pathogènes présents, ainsi qu'aux récepteurs membranaires couplés aux protéines G (G protein-coupled receptor (GPCRs)) des tiques (existe aussi chez les mammifères et les insectes) qui interagissent avec les métabolites essentiels à la survie des tiques mais également avec les

microorganismes transmis par les tiques. Nous souhaitons donc développer des vaccins anti-microbiote et anti-GPCR de tiques dont nous testerons l'efficacité sur nos modèles de co-infections de tiques et de souris en comparaison avec les modèles d'infection simple.

Les protocoles ont été conçus dans les règles des 3 R avec une réduction au maximum de la douleur et un raffinement des élevages mais ces expériences nécessitent l'utilisation de souris pour mimer ce qui se passe dans la nature. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, l'obtention de tiques coinfectées sera réalisée à l'aide de techniques artificielles mises en place au laboratoire n'utilisant pas d'animaux (gorgeur artificiel, inoculation, . . .). Les souris seront hébergées avec l'enrichissement nécessaire à leur bien-être (carré de coton, maison en plastique pour les souris). Au total 3978 souris au maximum seront utilisées à travers 5 procédures. Le nombre de souris sera potentiellement très fortement réduit si les expérimentations se déroulent correctement dès le premier essai (chez la tique et chez la souris) et si tous les modèles de co-infections ne sont pas testés. Notamment, lors de la procédure 1 nous mettrons en évidence la ou les meilleur(s) souche(s) de souris à utiliser, selon les différents modèles de co-infections, que nous utiliserons dans les procédures suivantes afin de réduire le nombre d'animaux utilisé.

19298 L'objectif de cette expérience préliminaire est d'identifier de nouveaux aliments, sources de protéines et permettant d'augmenter la biodisponibilité de certains oligoéléments. Ce projet a pour objectif d'utiliser des produits à base d'insecte pour produire des ingrédients de type super-aliments pour la nutrition humaine et animale. Si les résultats préliminaires obtenus dans cette expérience sont prometteurs, un projet de plus grande envergure sera soumis.

Ce projet cherche donc à établir la relation entre la nature d'un aliment et la biodisponibilité orale d'oligoéléments présents dans ces aliments. Compte tenu des futures applications en alimentation humaine, l'ensemble des procédures appliquées s'orientera vers l'utilisation stricte d'aliments naturellement riches en minéraux. Ainsi, les minéraux seront apportés dans des aliments de type farine d'insectes ou farine de poissons. Cette recherche s'appuie sur la problématique de biodisponibilité orale des minéraux essentiels comme le calcium ou le magnésium. Le but de ce travail est d'établir des protocoles expérimentaux afin d'étudier l'effet de différents aliments sur la biodisponibilité orale de minéraux (calcium, magnésium, phosphore, potassium).

Pour cela, une évaluation de la biodisponibilité orale sera réalisée sur des rats disposés dans des cages métaboliques. L'ingestion orale des aliments non contrainte sera facilitée par une formulation contenant en sus 1g de sucre. Après l'ingestion, chaque animal restera isolé 24h pour recueillir ses urines et ses fèces en vue du dosage de différents oligoéléments. Le sang ne sera prélevé qu'à l'issue du protocole.

Afin de limiter le nombre de rats mobilisés pour l'étude, les mêmes animaux seront utilisés pour les différents types d'aliment. Des périodes de repos de 6 jours seront respectées entre les différentes évaluations.

Le nombre d'animaux nécessaire pour répondre à cette question est de 6 rats.

L'étude sera réalisée dans le respect des 3 R.

Remplacement : L'étude de la biodisponibilité orale d'oligoéléments présents dans un aliment ne peut pas être évaluée in vitro.

Raffinement : Les rats seront nourris avec un régime standard auquel sera ajouté une boulette d'aliment à étudier formulée avec 1g de sucre. Les rats seront traités selon les règles éthiques de l'expérimentation animale. L'ensemble du projet est mené par un personnel compétent en expérimentation animale qui maîtrise parfaitement les gestes techniques nécessaires. Les animaux bénéficieront d'une surveillance quotidienne avec des critères d'observation stricts. Au-delà du non-respect d'un certain nombre de ces critères, ils seront considérés en souffrance et sortiront de l'étude. De plus, des délais d'acclimatation des animaux seront systématiquement respectés. L'isolement des individus sera limité au strict nécessaire.

Réduction : S'agissant d'une expérience préliminaire, le nombre de rats est très limité (n=2) dans chaque groupe. Les mêmes rats seront utilisés pour tester 2 aliments, ce qui permet de réduire significativement le nombre de rats nécessaires.

19299 Les solutions thérapeutiques existantes actuellement pour favoriser la réparation osseuse, présentent des limites et des risques (prélèvement site donneur, comorbidité, contamination, rejet de greffe...) qui nécessitent de nouvelles approches. C'est ainsi qu'un des challenges majeurs de l'ingénierie tissulaire osseuse est de concevoir de nouveaux substituts osseux aux propriétés optimisées. Le développement et la validation des matériaux de reconstruction osseuse doit suivre plusieurs étapes successives, incluant des tests in vitro de biocompatibilité et de performance mais également des études in vivo permettant de démontrer l'innocuité du produit ainsi que son effet sur la reconstruction osseuse. Il existe actuellement plusieurs modèles animaux validés pour l'évaluation des matériaux de substitution osseuse. Ces tests sont habituellement d'abord réalisés chez des rongeurs (souris, rats) qui présentent l'avantage d'être moins coûteux, plus simples à mettre en oeuvre et plus reproductibles que les tests sur les gros animaux. L'objectif général de ces expérimentations est d'étudier l'influence du matériau sur l'efficacité de la réparation osseuse.

Dans notre approche nous testerons différents matériaux dans lesquels ont été ajoutées des cellules humaines ("matériaux cellularisés") ; celles-ci seront isolées et amplifiées dans des conditions aussi proches que possible de celles qu'elles ont dans l'organisme, ce qui devrait permettre une meilleure prise de greffe, de survie des cellules et de leur adaptation dans l'organisme.

Les matériaux cellularisés seront injectés sous la peau pour valider la survie des cellules sur 2 mois puis, dans la deuxième partie du projet, implantés au niveau d'un site osseux endommagé (sur le crâne des souris) nécessitant une réparation osseuse. Des souris dont le système immunitaire est déficient seront nécessaires pour éviter le rejet de la greffe. Les méthodes de caractérisation des matériaux implantés comprendront des évaluations cliniques (inflammation, douleur...), radiologiques, suivi par imagerie des cellules implantées et analyse du tissu après sacrifice.

Le suivi des injections des matériaux cellularisés en site sous-cutané se fera sur 2 mois grâce à l'imagerie, grâce à l'utilisation de cellules exprimant une protéine émettant de la lumière. Pour les expériences de greffe dans les sites osseux, après 2 mois de suivi par imagerie, les animaux seront sacrifiés et les os du crâne récupérés pour études de l'os.

REMPACEMENT, REDUCTION, RAFFINEMENT. LE REMPLACEMENT n'est pas possible puisque la survie cellulaire in vivo puis la réparation osseuse ne peuvent être analysées que sur des animaux vivants. REDUCTION : le suivi par l'imagerie permettra de limiter le nombre d'animaux nécessaires. De plus, les études in vitro qui précéderont les études sur l'animal permettront de se limiter à l'implantation de matériaux où la survie cellulaire in vitro est la meilleure. Ce projet qui s'étale sur quatre ans nécessitera 93 souris. RAFFINEMENT : les actes chirurgicaux seront réalisés par des personnes habituées à ces chirurgies (en particulier des chirurgiens dentistes), sous anesthésie gazeuse avec injection d'analgésique ; l'hébergement, en adéquation avec le statut immunodéficient, bénéficiera d'un enrichissement de façon à améliorer le bien être des animaux.

19300 Le syndrome dysgénésique et respiratoire porcin (SDRP) est une affection virale caractérisée par des troubles de la reproduction chez les truies et des troubles respiratoires chez les animaux en croissance. Cette maladie est très présente dans les régions à forte densité de production porcine où elle conduit à des pertes économiques considérables. La vaccination est une des mesures de lutte contre le virus du SDRP (SDRPV) la plus souvent mises en oeuvre sur le terrain. Les vaccins les plus utilisés et les plus efficaces sont les vaccins vivants atténués (en anglais « modified live vaccine : MLV »).

Depuis plusieurs années, l'administration par voie intradermique (ID) de certains MLV contre le SDRP a été autorisée. Cette voie présente des avantages tant en termes de bien-être animal que de facilité et de sécurité d'utilisation.

Au cours d'une précédente étude, nous avons montré qu'un MLV protégeait vis-à-vis du SDRPV, aussi bien par voie ID que par voie intramusculaire (IM), les porcelets inoculés 4 semaines après la vaccination. A la suite de la vaccination, une réponse immunitaire cellulaire avait été néanmoins induite plus précocement par voie ID (dès 2 semaines après la vaccination), suggérant que la voie ID pourrait permettre une protection plus rapide des animaux que la voie IM.

L'objectif de ce projet est donc de comparer les réponses immunitaires induites chez le porcelet par une vaccination ID à celles induites après immunisation IM et d'évaluer la protection conférée par ces deux voies de vaccination vis-à-vis d'une infection précoce par le SDRPV (2 semaines après la vaccination). Pour ce faire, nous mettrons en place une étude incluant 56 porcelets répartis en 4 groupes dont 1 groupe vacciné en ID, 1 groupe vacciné en IM, 1 groupe non vacciné et 1 groupe non vacciné non éprouvé. Chacun des 3 premiers groupes comportera 16 animaux (8 éprouvés avec le virus du SDRP et 8 sentinelles) ; le 4e groupe contrôle comptera 8 animaux. L'efficacité vaccinale sera mesurée, d'une part, par les quantités de virus du SDRP d'épreuve présentes chez les animaux inoculés et, d'autre part, par le nombre de porcs sentinelles qui se seront infectés au contact des animaux inoculés.

Dans la mesure où l'infection par le virus du SDRP est spécifique aux suidés et qu'il n'y a pas possibilité d'évaluer ces paramètres in vitro, il n'y a aucune possibilité de remplacement du modèle porc pour cette étude. Le nombre d'animaux a été réduit autant que possible tout en permettant l'obtention de données fiables et exploitables. Les porcs seront élevés en groupe, bénéficieront d'un enrichissement social et auront à leur disposition des objets manipulables. Ils seront nourris et abreuvés à volonté. En cas d'atteinte de points limites préalablement définis, les porcs seront euthanasiés afin qu'ils ne souffrent pas. Les connaissances générées dans le cadre de ce projet pourraient permettre de montrer une supériorité de la vaccination ID et donc de promouvoir cette voie d'immunisation pour augmenter la protection précoce des porcelets tout en améliorant le bien-être des animaux et les conditions de travail des utilisateurs.

19301 La maladie de Stargardt est une dégénérescence rétinienne avec une prévalence de 1 pour 8000/10000 personnes. La perte de cônes, cellules de la macula nécessaires à la vision diurne, entraîne la cécité. Il n'existe pas de traitement pour cette cécité impactant hommes et femmes entre 15 et 40 ans. La physiopathologie de la maladie se traduit par l'augmentation de déchets de vitamine A, les rétinoïdes, augmentation attribuée aux mutations affectant le gène *Abca4*. Ce gène est trop grand pour être intégré dans un vecteur adéno-associé recombinant (rAAV) aussi une approche alternative est nécessaire.

La stratégie consiste à délivrer deux rAAVs, chacun étant porteur d'une moitié du gène *Abca4*. Les deux moitiés de la protéine avec des structures spécifiques appelées 'intéines' sur chaque extrémité sont produites. C'est grâce aux intéines qu'une ligation se fait dans la cellule pour reconstruire la protéine entière. In vitro, il a été démontré l'efficacité de cette stratégie avec un potentiel effet thérapeutique.

Ce projet est une étude de preuve de concept pour comparer l'efficacité des intéines dans le modèle de la maladie de Stargardt avec pour objectif de réduire le taux de bisrétinoïdes chez les souris *Abca4* KO (Knock-Out) par expression de la protéine complète d'*ABCA4* en maintenant la structure de la rétine.

Ce projet comporte 3 phases

Phase 1 : comparaison de constructions d'AAV avec intéine afin de comparer 2 concentrations d'AAV et 2 promoteurs différents.

Ces 52 souris WT recevront les vecteurs par voie sous rétinienne dans un seul oeil, l'oeil controlatéral étant injecté avec une solution saline.

Deux examens ophtalmiques seront réalisés à 4-6 semaines post-injection ; un Fond d'Oeil (FO) afin de monitorer l'expression de l'EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) et une Tomographie à Cohérence Optique (OCT) pour évaluer la structure des rétines.

Phase 2 : Étude d'efficacité de la thérapie par injection d'AAV avec intéines chez la souris Abca4 KO pour la maladie de Stargardt.

16 souris Abca4 KO seront injectées par voie sous-rétinienne dans les 2 yeux avec des vecteurs AAV tandis que 8 autres souris Abca4 KO et 8 souris WT recevront une solution saline. Les animaux seront suivis pendant 3 mois.

Un FO et un OCT seront réalisés à 1 semaine pré-injection et 3 mois post-injection.

Après sacrifice de tous les animaux, les globes oculaires seront prélevés pour différentes analyses. Ce projet nécessite 24 souris Abca4 KO et 60 souris WT. Nous incluons un maximum de 80 souris WT et 32 souris Abca4 KO avec un maximum de 10 animaux/groupe selon le groupe expérimental. S'agissant d'une étude de preuve de concept, selon les premiers résultats, des groupes supplémentaires pourraient être nécessaires comme dupliquer un groupe de souris WT et/ou KO pour confirmation des résultats ; ou modifier des paramètres tels que les concentrations des vecteurs injectés pour compléments d'information. Il faut également tenir compte des animaux qui pourraient être exclus de l'étude (raison éthique ou injection non exploitable) et donc remplacés (maximum 2 souris /groupe) afin d'obtenir le nombre suffisant de souris pour les tests statistiques.

Amendement _ Phase 3 :

Au regard des résultats prometteurs sur les phases 1 et 2, nous souhaitons évaluer 2 nouvelles constructions de vecteurs AAV. L'objectif de l'amendement est d'ajouter 70 souris réparties en 6 groupes de 10 souris KO + 1 groupe de 10 souris WT.

Le design de la phase 3 est identique à celui de la phase 2. Les 70 souris intègrent les procédures décrites dans le projet : Fond d'oeil, OCT, injection sous-rétinienne et Euthanasie de fin de protocole.

Application des 3R :

1) Réduction :

Utiliser l'oeil controlatéral comme contrôle permet de réduire le nombre d'animaux pour la phase 1 et annule toute variabilité inter-individus. Par contre pour une des analyses post-mortem de la phase 2 (spectrométrie de masse) nous ne pouvons pas garantir que le cycle visuel soit complètement indépendant entre les deux yeux, aussi l'œil controlatéral ne peut pas servir de contrôle. Pour choisir le nombre minimal de souris/groupe nous avons fait une analyse de puissance (puissance de 80% et significativité de 5%). Les données précédentes générées donnent l'écart-type attendu et la différence nécessaire pour avoir une mesure significative. Cela semble être un nombre minimal permettant d'assurer la robustesse des résultats sans qu'il soit excessif en termes d'animaux. Un t-test non-apparié bilatéral pour comparer les résultats des groupes sera réalisé.

2) Raffinement :

- des conditions d'hébergement selon la réglementation en vigueur avec enrichissement du milieu : dômes en cellulose, frisottis de papier (sizzle dry), bûchettes de bois et hébergement à 3 animaux dès que possible

- contrôle des conditions de luminosité dans les cages (entre 10 et 30 lux), en nous assurant qu'elles soient toujours au même niveau sur les portoirs et en gardant la salle en basse lumière.

- un suivi régulier des animaux : observations biquotidiennes, pesées régulières, analyse du comportement

- Les injections sous-rétiniennes seront réalisées sous anesthésie gazeuse puis relais par anesthésie fixe par injection intramusculaire d'un mélange de xylazine (10 mg/kg)/kétamine (100 mg/kg).

- Une anesthésie locale des 2 yeux par instillation d'une goutte d'Oxybuprocaine®

- Les OCT et FO : anesthésie gazeuse ((mélange Isoflurane 5% / oxygène, 1L/min)) ou anesthésie fixe par injection intramusculaire d'un mélange de xylazine (10 mg/kg) / kétamine (100 mg/kg).

L' humidification de la cornée est réalisée avec un gel ophtalmique.

Un traitement post-opératoire est mis en place afin d'éviter l'inflammation et le dessèchement de la cornée.

- une réactivité accrue du personnel animalier avec l'aide d'une grille de scoring de la douleur (Cf. annexe I) afin de détecter précocement tout point limite et mettre en place les actions adéquates. 2

3) Remplacement :

La rétine, structure complexe composée de multiples couches de neurones et cellules nourricières, ne peut être reconstituée parfaitement in vitro. Il existe aujourd'hui des protocoles modélisant la rétine à partir de cellules souches différenciées, mais l'interaction complexe du cycle visuel ne peut pas être testée in vitro. Le modèle animal est donc indispensable pour étudier la pathophysiologie et le transfert de gènes dans la rétine.

19302 De récentes études utilisant des techniques comportementales, neurobiologiques et d'imagerie confirment une forte association entre l'impulsivité et les comportements dits «addictifs». Cependant, nous commençons seulement à identifier les mécanismes cellulaires, moléculaires et génétiques qui participent à changer l'activité neuronale des centres décisionnelle et motivationnelle, et leur compréhension pourra suggérer de nouvelles pistes thérapeutiques dans le développement de la dépendance et la prévention de la rechute. Dans ce cadre, nous proposons (I) d'étudier le rôle Du récepteur couplés aux protéines G, Gpr88 dans les comportements d'impulsivité chez des souris transgéniques (II) Tester l'effet des agonistes Gpr88 sur les comportements d'impulsivité. Cette étude, qui poursuit des travaux déjà commencés dans notre laboratoire, sera réalisée chez le souris mâle jeune adulte. Le nombre initial d'animaux par lot sera de 20 en tenant compte des pertes éventuelles liées à la non-conformité de certains animaux vis-à-vis des critères comportementaux, et en considérant la variabilité interindividuelle (un nombre minimal de 20 individus par condition est statistiquement suffisant). Un nombre maximum de 800 souris sera utilisé pour l'ensemble du projet.

Ce projet sera conduit en respectant la règle des 3R (remplacer –réduire –raffiner) visant à remplacer ou réduire chaque fois que possible le nombre d'animaux, ainsi qu'à optimiser les procédures pour minimiser l'inconfort des animaux tout en permettant d'étudier l'effet de l'expérimentation sur les mécanismes de prise de décision utilisés par des animaux.

REMPACEMENT : Dans le domaine de la dépendance aux drogues, pathologie éminemment complexe nécessitant l'intégrité du cerveau en fonctionnement normal, il est impossible de s'affranchir de l'utilisation d'animaux vivants. **RAFFINEMENT** : Les animaux sont hébergés dans une animalerie agréée par groupe de 4, sous température et hygrométrie contrôlées et relevées quotidiennement. Un suivi méticuleux, veillant au bien-être de l'animal, est assuré, grâce une grille de notation précise permettant l'évaluation de la souffrance éventuelle du sujet. Si un point critique de la santé de l'animal est atteint, la procédure est interrompue le concernant. Ainsi, la souffrance de l'animal est limitée. **REDUCTION**. Nous avons réduit au maximum le nombre de souris nécessaires aux analyses statistiques en tenant compte (notamment) de la variabilité interindividuelle dans le comportement (20 souris/condition).

19303 L'objectif de ce projet consiste à évaluer les performances d'une nouvelle gaine orientable à ultrasons destinée à un usage médical. L'étude portera sur des porcs en raison de la similarité de l'anatomie de leur système cardiovasculaire ainsi que de la morphologie de leur cœur avec l'Homme. En effet, ce dispositif sera utilisé à terme dans le domaine de la cardiologie humaine à des fins d'interventions cardiaques.

L'avantage d'un tel dispositif innovant est de pouvoir allier deux fonctionnalités en un seul cathéter : la présence de la gaine à ultrasons permettant une exploration par imagerie ultrasons, ainsi que le deuxième cathéter pour appliquer une thérapie. L'objectif de cette nouvelle gaine est d'augmenter la précision et la sécurité des gestes et de limiter le recours à l'utilisation des rayons X chez l'humain.

La gaine a été testée ex vivo, et la tester maintenant dans un modèle animal est une étape indispensable. Notre projet prévoit d'utiliser au maximum 6 porcs. Le plan général du projet est

d'anesthésier les animaux, d'introduire la gaine par l'artère (puis la veine) fémorale pour atteindre le cœur, afin de pratiquer des mesures ultrasonores et de tester le cathéter.

Seule l'utilisation d'animaux permet d'atteindre l'objectif du projet, qui doit rester proche de la réalité clinique humaine pour rester scientifiquement valable. Il est prévu d'utiliser un minimum d'animaux pour ce projet qui est une recherche de preuve de concept. L'anesthésie et l'analgésie seront adaptées afin de n'induire aucune souffrance inutile, et des vétérinaires contrôleront régulièrement l'état de santé des animaux. Ils seront hébergés sur litière végétale, et il sera veillé à la bonne qualité des soins et à leur bien-être pendant toute l'expérimentation. Ils seront hébergés en groupe et disposeront aussi d'objets "manipulables".

19304 L'objectif de cette étude est d'observer les effets de l'exposition chronique à un ingrédient alimentaire fonctionnel chez le modèle porcin (porcs conventionnels en croissance) sur les réponses comportementales et cérébrales en conditions de stress aigu.

Deux groupes expérimentaux de 12 animaux seront constitués, menant à un total de 24 animaux (mâles et femelles). L'un des groupes recevra un aliment granulé standard depuis le sevrage (contrôle, CTL, N=12) tandis que l'autre recevra le même aliment supplémenté d'un ingrédient alimentaire fonctionnel. Un ingrédient alimentaire fonctionnel apporte des propriétés spécifiques à l'aliment, par exemple sensorielles, qui peuvent se traduire par des effets comportementaux ou physiologiques chez l'individu qui le consomme. Les hypothèses testées sont que l'ingrédient 1) accroît l'attractivité de l'aliment et/ou 2) réduit la réponse au stress aigu (ingrédient, ING, N=12). Dix jours après le sevrage, les animaux seront soumis à une transition alimentaire (classique en élevage) vers un nouvel aliment granulé de composition nutritionnelle, granulométrie et texture différentes, supplémenté ou non en ingrédient fonctionnel en fonction du groupe d'appartenance. Des tests de choix alimentaire entre l'aliment supplémenté ou non seront réalisés pour explorer les préférences et la motivation alimentaire (attractivité). La semaine suivante, des tests de réactivité comportementale et émotionnelle seront réalisés chez tous les animaux (test de l'openfield, test de réaction à la soudaineté/nouveauté, test de contention-stress).

Tous les animaux seront ensuite soumis à une session d'imagerie cérébrale par IRMf (Imagerie par Résonance Magnétique fonctionnelle). Dans une première phase d'imagerie, il s'agira de cartographier les zones cérébrales modulées par la perception olfactive de l'ingrédient fonctionnel seul (attractivité de l'odeur de l'ingrédient), de l'ingrédient mélangé à l'aliment (attractivité de l'aliment supplémenté), et de l'aliment seul (témoin). Dans une seconde phase, il s'agira d'induire un stress pharmacologique pour en explorer les effets sur les réponses cérébrales basales et à l'ingrédient. Durant l'imagerie, les animaux seront maintenus à un niveau léger d'anesthésie générale sous isoflurane de façon à prévenir tout mouvement, et placés sous respirateur mécanique et monitoring permanent.

Cette étude a été conçue de manière à respecter la législation française et européenne en vigueur pour l'expérimentation animale et répond aux impératifs des 3R. REMPLACER : cette étude portant sur les effets d'un stress aigu et d'une stratégie anxiolytique (ingrédient alimentaire), il est impératif d'utiliser des animaux vivants et vigiles pour explorer leur comportement, ou anesthésiés pour explorer leurs réponses cérébrales. REDUIRE : 12 animaux par groupe pour les données comportementales et d'imagerie cérébrale représentent un effectif minimum raisonnable pour obtenir des différences significatives entre les groupes expérimentaux. Cela permettra une analyse par ANOVA multifactorielle. RAFFINER : Des points limites sont fixés au préalable, et un suivi des animaux est effectué de façon très régulière. Les procédures d'anesthésie et de stress pharmacologique lors de l'imagerie cérébrale ont été conçues et validées par un vétérinaire.

19305 La découverte récente de l'implication d'espèces de chiropètes dans des épisodes d'émergence de maladies infectieuses chez l'Homme (Nipah, Ebola, coronavirus SARS-Cov, pour les plus emblématiques) suggère que les chauves-souris peuvent être des réservoirs potentiels pour des virus émergents pouvant représenter une menace pour l'Homme, la faune sauvage et/ou les animaux domestiques. Curieusement, les chauves-souris ne développent pas de symptômes cliniques, quand ces virus sont pathogènes voire mortels chez d'autres espèces. L'une des

hypothèses avancées implique des propriétés immunitaires uniques permettant aux chiroptères de tolérer et/ou contrôler les infections virales. Toutefois, nul ne sait si l'absence de symptômes est synonyme d'absence de pathogénicité des virus (c'est-à-dire d'effets sur la survie et/ou la reproduction des chauves-souris). Pour ces raisons, il est important de rechercher et de caractériser les virus hébergés par les chauves-souris, et d'étudier leur épidémiologie afin de comprendre (i) comment ces virus circulent et persistent dans les populations et communautés de chauves-souris, (ii) ce qui différencie les chauves-souris des autres espèces de mammifères sur le plan immunitaire, et enfin (iii) comment et dans quels contextes les virus peuvent affecter la survie des individus et la dynamique des populations. Comprendre le fonctionnement des populations de chauves-souris et l'impact potentiel des infections sur celles-ci représente un enjeu pour la préservation des espèces dans un contexte de changement global (modifications de leur habitat, changements climatiques, etc.).

Ce projet s'appuie sur une approche basée sur la capture d'individus de différentes espèces vivant en communauté en France métropolitaine et en Guyane. Pour chaque individu capturé, nous prélevons du sang, un morceau de patagium et quelques poils, puis nous effectuons quelques mesures biométriques (poids, avant-bras, doigts, etc.) avant de le relâcher. Cela permet de réaliser (i) des analyses de fonctionnement de population, (ii) des analyses d'éco-épidémiologie, (iii) des analyses évolutives au niveau génétique et génomique.

-Le nombre total d'individus capturés puis relâchés sur la période de 5 ans sera approximativement de 15 000 individus en métropole, et de 5000 individus en Guyane (toutes espèces et tous sites confondus), en partenariat avec les associations de protection de la nature.

-Remplacement : un nombre important d'individus doit être échantillonné par espèce et par année afin d'augmenter la probabilité d'identifier les virus en circulation, et de comprendre les modalités de leur circulation au sein des populations et entre espèces. Etant donné que nous recherchons la prévalence de virus dans des populations naturelles et les modalités de leur circulation, il n'est pas possible d'utiliser des méthodes alternatives à l'utilisation d'animaux.

-Réduction : la stratégie d'échantillonnage a été réfléchi de façon à utiliser le juste nombre d'animaux et à effectuer les prélèvements utiles pour notre étude.

-Raffinement : la capture des individus est réalisée à l'aide d'un « harp-trap », placé en sortie de gîte, afin de minimiser le stress par rapport à la capture au filet, les individus se regroupant par espèce dans la gouttière du harp-trap. Cette méthode de capture et nos protocoles d'échantillonnage (environ 6 minutes par individu capturé avant d'être relâché) ont été évalués et affinés dans le but de réduire le mal-être des animaux capturés.

19306 Dans le processus de développement d'un candidat médicament humain (et éventuellement vétérinaire), les études de Pharmacologie de Sécurité ont pour objectif d'examiner de potentiels effets pharmacodynamiques d'une substance sur les fonctions physiologiques en relation avec une exposition à des doses thérapeutiques ou supérieures. Ces études sont réalisées avant les études cliniques afin de s'assurer que l'administration chez l'homme n'aura aucun impact majeur sur les fonctions vitales.

Ainsi, on distingue plusieurs types d'investigations de Pharmacologie de Sécurité :

- les études principales ou fondamentales qui vont évaluer de potentiels effets d'une substance sur les fonctions vitales (fonction cardiovasculaire, fonction respiratoire et système nerveux central).

- les études de suivi (follow-up) qui ont pour objectif d'approfondir la compréhension des effets observés lors des études fondamentales sur les fonctions vitales,

- les études supplémentaires qui ont pour but d'évaluer les potentiels effets d'une substance sur des organes ou fonctions non couverts par les études fondamentales (fonction rénale, fonction gastro-intestinale...)

- les études d'efficacité qui vont évaluer l'efficacité d'une substance sur un modèle pathologique expérimental (glycémie, diurèse, ototoxicité...)

Le choix de l'espèce pour les études de pharmacologie de sécurité est basé sur plusieurs critères notamment la réponse pharmacodynamique du modèle animal, le profil pharmacocinétique, la susceptibilité et/ou la sensibilité du modèle pour la fonction physiologique évaluée et les données préalablement obtenues chez l'espèce considérée (obtenues notamment lors d'études préalables de Toxicologie). Le présent projet a pour objectif de décrire les différentes études de Pharmacologie de Sécurité chez les rongeurs et le lapin.

Les voies d'administration peuvent être diverses et dépendent le plus souvent de la voie d'administration envisagée chez l'homme. Elles peuvent être, entre autre, orale (gavage), intramusculaire, sous-cutanée, intrapéritonéale ou intraveineuse.

Du fait de leurs objectifs liés aux différentes fonctions vitales d'un organisme et aux aspects de pharmacodynamique, il n'existe pas de méthodes in vitro alternative pour la réalisation des procédures décrites dans le présent projet. L'organisme dans son entier doit être pris en compte dans les évaluations de Pharmacologie de Sécurité.

Le nombre total d'animaux utilisés dans le cadre de ce projet est de 3860 individus pour 5 ans réparti entre les différentes espèces comme suit :

- . Souris : environ 1200 individus pour 5 ans
- . Rats : environ 2230 individus pour 5 ans
- . Hamster : environ 50 individus pour 5 ans
- . Cobaye : environ 330 individus pour 5 ans
- . Lapin : environ 50 individus pour 5 ans

Les dommages escomptés sont limités du fait du principe même des études de pharmacologie de sécurité pour lesquelles les doses administrées aux animaux sont choisies sur la base d'étude de toxicologie afin que les doses administrées ne provoquent pas d'effets toxicologiques pouvant masquer les effets pharmacologiques recherchés sur les fonctions vitales.

Le projet est mis en œuvre dans un cadre réglementaire et permet l'évaluation de potentiels effets pharmacodynamiques d'une substance sur les fonctions physiologiques en relation avec une exposition à des doses thérapeutiques ou inférieure. La réalisation de ce projet permet de réaliser les études précliniques de Pharmacologie de Sécurité chez le rongeur ou le lapin qui sont une étape préliminaires aux investigations cliniques chez l'homme.

Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés, un design en cross-over est utilisé aussi souvent que possible. Ceci consiste à traiter tous les animaux à toutes les doses dans un ordre préalablement défini avec une période de récupération entre chaque administration de la substance. Ce design permet de n'avoir qu'un seul groupe d'animaux plutôt qu'un groupe par dose à tester. Il n'est possible que si la toxico-cinétique de la substance à tester est connue.

Le nombre d'animaux est déterminé a minima afin d'obtenir des résultats statistiques robustes et d'atteindre les objectifs des études.

L'état de santé des animaux est vérifié à intervalle régulier tout au long des études et via un monitoring en continu pour certains types d'études impliquant l'enregistrement de données physiologiques (signaux respiratoires, cardiaques, nerveux).

D'autre part, le principe même des études de pharmacologie de sécurité implique l'utilisation de doses thérapeutiques aux effets toxicologiques très limités voire absents.

Enfin, dans la mesure du possible (dose thérapeutique connue, données préliminaires suffisantes. . .), les évaluations de pharmacologie de sécurité sur le rongeur ou le lapin sont intégrées dans les études de toxicologie afin de limiter le nombre d'animaux utilisés. Ceci permet d'une part de faire les investigations de Pharmacologie de Sécurité chez les mêmes animaux que ceux impliqués dans les études de toxicologie et d'autre part d'avoir des informations précoces sur l'impact d'un candidat médicament sur les fonctions vitales.

19307 La thrombose peut être définie comme l'obstruction partielle ou totale d'un vaisseau sanguin par un caillot (thrombus). La maladie veineuse thromboembolique (MVTE) est la conséquence de la

formation de ce caillot dans une veine. Les deux principales présentations cliniques de la MVTE sont l'embolie pulmonaire et la thrombose veineuse profonde ou phlébite. La MVTE constitue un problème de santé publique majeur en raison de sa fréquence et de sa gravité. Son traitement repose sur un traitement anticoagulant instauré en urgence et poursuivi pendant un minimum de 3 mois afin de permettre une résorption du thrombus et de réduire le risque de récurrence. Cependant, au-delà de 3 mois, le risque thromboembolique est élevé et la physiopathologie de la récurrence n'est malheureusement pas bien connue à ce jour. Des travaux de recherche récents ont montré que l'inflammation favorise la survenue d'un second événement thrombotique. Ces études n'ont cependant pas étudié le rôle des lymphocytes B qui sont des acteurs majeurs du système immunitaire via la production d'anticorps et la sécrétion de cytokines. Nos données préliminaires suggèrent qu'ils modifieraient la réponse immuno-inflammatoire conduisant à la récurrence de la thrombose. Nous nous proposons d'étudier leur rôle dans le phénomène de récurrence de la thrombose veineuse.

Ce projet de recherche aura une durée de 5 ans et nous utiliserons un modèle murin d'étude de la thrombose veineuse nécessitant 469 souris. Trois souches de souris seront utilisées : 364 souris sauvages C57Bl6, 45 souris μ MT déficientes en lymphocytes B et 60 souris Aicda dont le répertoire de lymphocytes B est très affecté. Les souris ne faisant pas spontanément de thrombus, la thrombose veineuse devra être induite de manière chirurgicale. Nous serons amenés à induire la formation de caillot sanguin veineux de deux façons : par application d'un courant électrique au niveau de la veine jugulaire et par ligature totale de la veine cave inférieure (procédures de classe modérée). Le modèle de récurrence de la thrombose que nous souhaitons développer est novateur, en effet, afin d'étudier les phénomènes systémiques qui interviennent dans ce modèle, nous induirons la thrombose sur des vaisseaux sanguins différents. Les dommages induits par les procédures peuvent être une gêne ou une douleur liée à la chirurgie et à la cicatrisation. Pour limiter les contraintes induites par ces actes, nous avons pensé ce projet de recherche en suivant la règle des 3 R « Remplacer, Réduire, Raffiner ». La MVTE est une maladie multifactorielle impliquant le système vasculaire mais également les cellules sanguines. L'étude de cette pathologie complexe nécessite la mise en place de modèles animaux. Toutefois, afin de décrypter les mécanismes cellulaires et moléculaires qui entrent en jeu lors de la récurrence de la thrombose, nous remplacerons les animaux par des cultures de cellules in vitro. Pour la réduction du nombre d'animaux, nos études précédentes ainsi que la littérature montrent que des groupes de 12 animaux sont nécessaires en vue d'obtenir des données statistiquement exploitables. Nous avons également mis au point une technique non-invasive de mesure du thrombus chez la souris basée sur l'échographie-doppler réduisant ainsi le nombre d'animaux que nous serons amenés à utiliser. Enfin, les procédures ont été pensées afin que les prélèvements issus d'un seul animal puissent servir à différentes analyses. Concernant le raffinement des expériences, nous avons tenu compte du bien-être des animaux tout au long du protocole expérimental. En dehors des actes techniques que nous serons amenés à réaliser, les animaux sont hébergés selon les standards prévus par la réglementation, en groupes sociaux, dans un environnement adapté et enrichi. Dès lors qu'une souris entrera dans une procédure expérimentale, nous évaluerons son bien-être à l'aide d'une grille d'évaluation conçue pour ce projet. Elle nous permettra d'identifier les points limites et d'apporter dans les plus brefs délais la mesure adaptée à l'animal (administration d'un antalgique, recoudre une suture,...). Les animaux seront systématiquement anesthésiés lors des chirurgies, des administrations intraveineuses, des immunisations et des prélèvements sanguins. Lors des actes chirurgicaux, nous utiliserons des analgésiques afin de limiter la douleur.

19308 Le cancer du foie (CHC) représente un problème de santé majeur en France et se situe 4ème en terme de mortalité par cancer dans le monde. Dans les pays développés, il se développe principalement sur un foie "gras" (NASH) préexistant induit à cause de pathologies incluant l'obésité et le diabète. Son traitement repose sur la transplantation de foie ou sa chirurgie pour les cas précoces. Cependant, la majorité des CHC sont diagnostiqués à des formes avancées. L'arrivée sur le marché de l'immunothérapie (ICI), qui permet au système immunitaire de s'activer plus efficacement pour qu'il s'attaque aux cellules tumorales, a révolutionné la prise en charge de nombreux cancers dont le CHC. Cependant, un nombre limité de patients y répond et les

mécanismes de résistances impliquant par exemple l'environnement immunitaire, sont peu documentés. Par exemple, la présence d'un foie de type NASH semble influencer la réponse à un nouveau traitement contre le CHC (anti-ICI).

Ainsi, l'objectif principal de ce projet sera d'identifier les acteurs du microenvironnement hépatique impliqués dans la résistance aux ICI.

La réponse aux ICI sera évaluée après greffes de lignées tumorales (CHC) sous la peau ou dans le foie sain ou NASH de souris ayant un système immunitaire efficace. L'effet du traitement anti-ICI reçu par voie intra-péritonéale sera suivi longitudinalement et l'implication des cellules immunitaires sera déterminée après leur blocage à l'aide d'anticorps neutralisants (voie intra-veineuse) et en utilisant un modèle murin génétique déficient en un récepteur potentiellement impliqué dans cette résistance.

Ainsi, afin de réaliser l'ensemble de ces expériences, 1640 souris sont demandées sur une période de 5 ans.

Dans le respect des règles des 3R, à savoir:

-REEMPLACER: des expériences réalisées en prospectif chez l'homme ont été mises en place afin de remplacer au possible l'utilisation d'animaux. Elles nous ont permises d'orienter de ce projet à l'étude de certaines populations de cellules immunitaires d'intérêt (cellules particulières du système immunitaire et un cible d'intérêt identifiée). Cependant, seul un modèle murin qui modélise la physiopathologie du CHC et qui réunit tous les acteurs de l'immunité permettra d'explorer notre hypothèse d'étude.

-REDUIRE: les expériences seront combinées dans la mesure du possible tout en gardant un nombre nécessaire et suffisant d'animaux pour obtenir une puissance statistique raisonnable dans l'analyse des résultats, et en travaillant à partir d'un nombre technicable d'animaux en même temps.

-RAFFINER: Les animaux seront suivis quotidiennement par le personnel zootechnique expérimenté et des mesures visant à stopper toute souffrance ou inconfort seront prises, allant de la prise d'analgésique au sacrifice de l'animal. Les points limites basés notamment sur la perte du poids des animaux et des modifications de leur état global (prostration, isolement, pelage hirsute, etc.) seront fixés afin de stopper l'expérimentation avant induction de douleur ou souffrance des animaux. Enfin, les souris seront hébergées dans un milieu enrichi leur permettant de retrouver leur comportement primaire de nidification.

19309 Dans le cadre de l'évaluation des dangers et des risques des composés perturbateurs endocriniens (PE), les voies de toxicité reliant les effets aux différentes échelles d'organisation biologique (des effets moléculaires aux effets néfastes sur les individus et les populations) sont des outils pertinents. Le présent projet s'inscrit dans une optique de développement/d'amélioration de voies de toxicité permettant de prédire de façon quantitative les effets néfastes des composés PE sur la reproduction des poissons à partir des effets observés au niveau moléculaire sur la synthèse hormonale (assemblage de modèles mathématiques).

Ce projet se déroulera en deux phases :

1) Une première phase de « développement et calibration » de modèles mathématiques basés sur la physiologie. Dans cette phase, deux pesticides modèles (prochloraz et imazalil) seront utilisés pour évaluer d'une part leur distribution au sein de l'organisme et d'autre part leurs effets au court du temps sur la synthèse hormonale et la synthèse de vitellogénine (protéine constituant les réserves nutritives des œufs de poissons).

Dans cette phase, des poissons zèbres sauvages seront exposés en continu par voie aqueuse durant 22 jours (15 jours d'exposition puis 7 jours de récupération en eau non contaminée). Pour chaque substance, 3 concentrations seront testées en plus du témoin. De plus, 5 temps de prélèvement seront réalisés afin de suivre l'apparition des effets au cours du temps. Les volumes de sang chez le poisson zèbre ne nous permettant pas de réaliser l'ensemble des analyses (concentrations en hormones et en vitellogénine) sur un même poisson, il sera nécessaire de doubler le nombre de poissons pour cette partie du travail. Au final, cette phase des

expérimentations utilisera : 10 poissons (5 mâles + 5 femelles) /aquarium x 4 conditions d'exposition (témoin + 3 concentrations de substance) x 5 temps de prélèvement x 2 substances x 2 (analyses des concentrations en hormones et en vitellogénine) = 800 poissons.

2) Une seconde phase de développement/d'amélioration de modèles mathématiques simulant la fécondité et la dynamique des populations de poissons ; l'évaluation des effets des substances sur ces paramètres étant une étape clef pour une évaluation pertinente des dangers et des risques des PE. Pour cela, nous acquerrons des données sur les effets sur la reproduction, de substances peu étudiées mais connues pour être des contaminants de l'environnement aquatique. Les effets de 8 substances différentes seront étudiés selon un protocole adapté de la ligne directrice 229 de l'OCDE (test réglementaire utilisé pour évaluer les effets des PE sur la reproduction des poissons).

Ces expérimentations utiliseront des poissons zèbres transgéniques : 10 poissons (5 mâles + 5 femelles) /aquarium x 5 conditions d'exposition (témoin eau + témoin solvant+ 3 concentrations de substance) x 3 réplicas par condition x 8 substances = 1200 poissons. Au cours des expositions aux substances, les femelles (soit 600 poissons) seront soumises à de l'imagerie en fluorescence après anesthésie afin de suivre l'expression du transgène in vivo. A l'issue de ces expérimentations, les animaux seront euthanasiés.

Au final, la totalité des expérimentations du projet utilisera 2000 poissons zèbres (800 poissons sauvages et 1200 poissons transgéniques) sur 5 ans qui seront tous euthanasiés en fin d'expérimentation.

Le REMPLACEMENT par des méthodes in vitro est impossible à ce stade des connaissances pour étudier les impacts des substances sur la physiologie de la reproduction. Les effectifs ont donc été calculés au plus juste afin d'obtenir des quantités de matériel biologique suffisantes et des résultats exploitables statistiquement (REDUCTION). Le RAFFINEMENT concerne d'une part l'utilisation de la lignée transgénique qui apportera des informations complémentaires sur les mécanismes d'action des substances sans augmenter le nombre de poissons nécessaires à la réalisation des essais pour l'identification des PE. D'autre part, le RAFFINEMENT concerne les conditions de réalisation des expérimentations. Au cours de l'ensemble des expositions aux substances une grille de score permettra d'évaluer la souffrance des animaux s'il devait y en avoir. Il existe très peu d'informations sur l'analgésie chez les poissons de même que sur son effet sur la reproduction, ce qui ne nous permet pas à l'heure actuelle de prendre en charge la douleur au cours des expérimentations s'il devait y en avoir. De ce fait, en cas de souffrance importante les expérimentations seraient stoppées et les animaux euthanasiés. De plus, lors des expositions, les animaux seront gardés dans un environnement le moins stressant possible (ex : affiches de végétation aquatique autour des aquariums permettant de les isoler de l'environnement extérieur). Lors des prises d'images, les animaux seront anesthésiés afin de leur éviter un stress non nécessaire. De plus, tout au long de leur vie, les poissons zèbres du laboratoire sont gardés dans des environnements connus pour engendrer un minimum de stress. Le poisson zèbre étant une espèce grégaire, ils sont hébergés en groupes afin d'éviter les comportements d'anxiété engendrés par l'isolement, tout en conservant des densités de population faibles évitant ainsi les comportements agressifs. Les poissons sont également nourris pour partie avec des artémies vivantes, leur permettant ainsi d'enrichir l'éventail de leurs comportements sociaux par le comportement de chasse.

Les données générées au cours de ce projet permettront le développement/l'amélioration de voies de toxicité impactant la reproduction du poisson qui pourront être utilisées pour une meilleure évaluation des dangers et des risques des PE au niveau réglementaire, et le développement de cet outil « in silico » permettra à plus long terme une réduction de l'utilisation de méthodes in vivo.

19310 Le carcinome rhinopharyngé (NPC pour Nasopharyngeal Carcinoma) est un cancer de la cavité rétronasale qui s'observe principalement dans deux groupes de population: 1) les grands enfants et les adolescents entre 10 et 20 ans et 2) les adultes de la cinquantaine. Il s'agit d'une tumeur agressive susceptible d'envahir la boîte crânienne à travers les os de la base du crâne ou encore de donner des métastases à distance dans les os, le poumon et le foie. Le développement des NPC est en partie liée à un virus appelé virus d'Epstein-Barr présent chez la plupart des individus de l'espèce humaine heureusement presque toujours sans aucune conséquence pour la santé.

Malheureusement il arrive que ce virus participe au développement des NPC; les cellules malignes contiennent l'ADN viral et certains gènes du virus codent des produits qui induisent un comportement aberrant de la cellule, en termes scientifiques, on parle d'un phénotype tumoral. La plupart des NPC sont radiosensibles et chimiosensibles et la guérison est obtenue dans environ 80 % des cas. Toutefois cette guérison a souvent un prix élevé pour le patient avec des séquelles non négligeables, en particulier une insuffisance des glandes salivaires (entraînant une bouche sèche en permanence) et, chez l'enfant et l'adolescent, des anomalies de croissance osseuse en zone irradiée aboutissant à des distorsions du massif facial. D'où l'intérêt de thérapies complémentaires visant non pas à détruire directement les cellules malignes de façon peu sélective mais à les reprogrammer pour les rendre plus vulnérables. Ces thérapies font appel à des agents pharmacologiques qui modifient les régulations épigénétiques, c'est-à-dire que, sans modifier le patrimoine génétique inscrit dans l'ADN des cellules tumorales, ils modifient l'assortiment des gènes actifs dans ces cellules. Pour abrégé, nous appellerons ces agents, « agents épigénétiques » ou « AEG ». On attend de ces AEG qu'ils activent certains gènes de l'ADN viral dont le potentiel thérapeutique est important. En effet, ces gènes absents des cellules saines mais contenus dans toutes les cellules malignes ne contribuent pas au phénotype tumoral. En revanche, ils codent des enzymes viraux capables de modifier chimiquement des médicaments et de les rendre toxiques sélectivement dans les cellules tumorales. Pour tirer parti de ce mécanisme, il faut administrer de façon combinée l'AEG et le médicament. Cette stratégie thérapeutique a été expérimentée avec succès sur de petits groupes de patients.

Toutefois, pour l'utiliser à grande échelle, il faut un degré de certitude supplémentaire qui ne peut être obtenu par les seules expériences in vitro. En effet, des études antérieures ont montré que les cellules de NPC les plus représentatives, celles qui sont les plus sensibles aux AEG sont celles pour lesquelles nous ne disposons d'aucun moyen de culture in vitro. Ces lignées de NPC sont celles dont la propagation est possible uniquement sur des souris immunodéprimées malgré tous les efforts tentés jusqu'ici pour les propager in vitro. On parle de lignées xenogreffées ou PDX (« patient-derived xenografts »). Les expériences que nous projetons sur les PDX de NPC sont une étape indispensable avant de pouvoir proposer des traitements combinant AEG et médicaments. Ceci afin d'avoir le maximum d'assurance d'atteindre une efficacité anti-tumorale au moins équivalente à celle des traitements actuels avec des séquelles en moins. Heureusement pour éviter des mises au point longues et laborieuses et réduire le nombre d'animaux utilisés nous pouvons nous appuyer sur une expérience de plus de dix ans acquises avec plusieurs équipes françaises et étrangères (hollandaises, américaines et chinoises). Cela nous permet d'avoir d'emblée des idées très précises sur les doses et les modes d'administration à utiliser, sans tâtonnements inutiles. Ainsi, nous prévoyons la nécessité de 300 souris au maximum pour ce projet.

La procédure expérimentale comporte quatre étapes douloureuses ou potentiellement douloureuses. Deux d'entre elles seront réalisées sous anesthésie générale (greffe tumorale et prélèvement sanguin). Pour l'administration orale, nous utiliserons des sondes à bulbe pour diminuer le risque de traumatisme. Elles seront baignées dans une solution de glucose avant introduction pour favoriser la coopération de l'animal, avec conditionnement positif. Pour les injections intra-péritonéales, nous utiliserons des aiguilles de très petit calibre et une anesthésie locale (lidocaïne). En dehors de ces étapes, l'inconfort des animaux sera atténué grâce à des dispositifs d'enrichissement placés dans les cages, à une surveillance rapprochée, et à l'application stricte de points d'arrêt expérimentaux (points limite), selon des critères précis et objectifs. A noter que les greffes tumorales seront réalisées de manière à réduire l'inconfort et la douleur suivant un protocole qui permet le maintien de la lésion dans les plans sous-cutanés sans infiltration des organes sous-jacents.

19311 L'immunothérapie a bouleversé les traitements anticancéreux à travers le ciblage du système immunitaire pour détruire les cellules tumorales. Ceci est possible grâce au blocage des points de contrôle inhibiteurs, devenue un axe thérapeutique majeur d'intervention pour plusieurs types de cancers. Malgré les immenses bénéfices cliniques des immunothérapies, seule une minorité de patients répondent à ces traitements

Jusqu'à présent les immunothérapies anti-tumorales ont principalement visé une population de nos globules blancs, appelée les lymphocytes T. Mais il existe de nombreux autres types cellulaires dans le système immunitaire qui peuvent aussi contribuer à une réponse immunitaire efficace telles que les cellules Natural killer (NK) qui sont des cellules cytotoxiques dites « tueuses », capables donc d'éliminer des cellules infectées ou cancéreuses. L'identification récente des cellules lymphoïdes innées de type 1 (ILC1), très semblables aux cellules NK, questionne sur leur contribution dans les différents rôles attribués aux cellules NK conventionnelles. La compréhension du rôle des ILC1 dans la réponse immunitaire tumorale est d'une importance majeure afin de moduler l'activité de ces cellules en fonction du besoin et donc adapter des stratégies thérapeutiques adaptées. Nous déterminerons le rôle des ILC1 dans différents modèles de cancer : 1- un modèle de tumeur « solide » : les souris seront injectées avec un modèle de lignée tumorale du cancer du sein, 2- un modèle de métastase grâce à l'injection de lignée tumorale créant des métastases dans différents tissus et 3- l'induction de fibrosarcomes par l'injection d'un composant chimique.

Notre équipe est à l'avant-garde de la recherche sur les ILCs et l'immunothérapie des cancers. En effet, l'identification de marqueurs hautement spécifiques de ces cellules par notre laboratoire nous a récemment permis de développer des modèles de souris transgéniques dépourvus spécifiquement de cellules NK ou à la fois de cellules NK et d'ILC1 pour déterminer leur rôle dans la réponse immunitaire anti-tumorale et les mécanismes moléculaires sous-jacents.

Ce projet a également pour objectif d'analyser le profil métabolique des cellules NK vs ILC1 dans le microenvironnement tumoral. Contrairement aux cellules ILC1, de nombreuses études ont montré le rôle crucial du métabolisme dans le développement et la fonction des cellules NK. De plus, nous savons désormais que les cellules tumorales modifient le métabolisme dans leur microenvironnement, affectant grandement la fonction et donc la réponse des cellules immunitaires infiltrantes la tumeur. Connaître le profil métabolique utilisé par les NK et ILC1s dans la tumeur et l'impact de la manipulation de ces voies métaboliques sur la fonction de ces cellules est primordial et reste à ce jour totalement inconnu.

Enfin, nous souhaitons étudier la contribution des cellules ILC1s vs NKs dans la réponse infectieuse au cytomégalo virus murin (MCMV). L'utilisation de modèles murins a montré que les cellules NK jouaient un rôle bénéfique dans le contrôle du virus. Cependant, l'implication des ILC1 dans la réponse infectieuse au MCMV reste flou. Nos différentes souris transgéniques seront infectées ou pas par ce virus et leur survie sera analysée.

Ainsi, ce projet a été conçu pour apporter des connaissances fondamentales sur la biologie des cellules NK et ILC1 ainsi que dans la réponse immunitaire anti-tumorale et infectieuse afin d'explorer de nouvelles stratégies de manipulations du système immunitaire pour le développement des futures thérapies. Nous projetons d'utiliser des souris commerciales ainsi que des souris transgéniques déficientes pour certaines populations du système immunitaire.

Tout au long de ce projet, nous travaillerons par ailleurs en étroite collaboration avec un Bioinformaticien / statisticien, dans le but d'optimiser le rapport entre le nombre d'animaux utilisé et la robustesse des tests statistiques qui seront appliqués à l'analyse des données collectées. Ainsi, pour les 5 ans de ce projet, nous utiliserons 1104 souris. Les animaux seront hébergés avec un environnement enrichi. Les effectifs d'animaux nécessaires ont été calculés au plus juste pour les besoins du projet selon la règle des 3R, sur la base de tests statistiques de rang non paramétrique et en tenant compte de notre expérience.

Au cours des expériences concernant les injections de cellules cancéreuses, nous établirons régulièrement une grille d'évaluation de la douleur comportant 1- le changement de poids corporel, 2- l'apparence physique (manque de soins, état des poils, écoulement nasal/oculaire, posture anormale, pupilles dilatées), 3- Signes cliniques objectifs (changement de température, augmentation des rythmes respiratoires et cardiaques), 4- comportement non provoqué (changements mineurs, anormal : motilité et/ou vivacité réduite, inactif ; vocalisations non sollicités, automutilation, très agité ou immobile), 5- réponses comportementales aux stimuli (dépression mineure, réponses anormales ou réactions violentes) et 6- diamètre et apparence de la tumeur. Ces critères seront donc évalués et l'analyse comportera un score. En fonction de la douleur et de la

fréquence de celle-ci, l'animal sera soumis à une analgésie (buprénorphine) ou l'expérimentation sera arrêtée et l'animal euthanasié.

19312 Chez un individu sain, les cellules effectrices du système immunitaire reconnaissent différents types d'antigènes (du soi et du non soi). Ces cellules sont sous le contrôle permanent des cellules régulatrices qui limitent leur activation. Dans le cas des maladies autoimmunes, les cellules régulatrices ne sont pas capables de contrôler la sur-activation des cellules effectrices qui reconnaissent et détruisent les cellules et organes du patient.

Le marqueur CD45RC permet de distinguer les cellules effectrices des cellules régulatrices. En effet les lymphocytes T exprimant faiblement le marqueur CD45RC ont des propriétés immunosuppressives (cellules régulatrices) alors que les cellules exprimant fortement ce marqueur sont des cellules effectrices. Ainsi, l'élimination des cellules effectrices par le ciblage du marqueur CD45RC à l'aide d'un anticorps permettrait, en agissant sur la balance du système immunitaire, de maîtriser les réponses auto-immunes.

L'objet de cette saisine est d'évaluer le potentiel thérapeutique d'un anticorps anti-CD45RC dans un modèle de souris développant spontanément un lupus.

Dans cette saisine, la règle des 3R est suivie de la façon suivante:

Remplacer: Des études fonctionnelles ont été réalisées in vitro. Les résultats sont prometteurs, mais limités par l'absence de contexte physiologique et de la complexité du système immunitaire. Il est donc maintenant nécessaire d'évaluer le potentiel de notre traitement dans un modèle d'auto-immunité in vivo.

Réduire: le nombre d'animaux utilisé dans cette étude doit être suffisant afin que les résultats obtenus soient statistiquement interprétables (log Rank test pour les courbes de survie, description des tests statistiques utilisés détaillée ci-après). Le nombre de groupe a été réfléchi de sorte à avoir les contrôles suffisants pour pouvoir conclure quant aux résultats obtenus. Il n'y a pas à prévoir d'animaux pour la mise au point du modèle puisque les souris développent spontanément le lupus. Le nombre maximal de souris utilisé est de 30.

Raffiner: Les animaux atteignant une perte de poids de 20% par rapport à leur poids au début de la maladie seront euthanasiés, ainsi que les animaux montrant des signes physiques caractéristiques d'un mal être tel qu'un changement de comportement. Durant le protocole, la protéinurie des souris sera évaluée par prélèvement des urines chaque semaine. Le traitement sera initié dès que les souris verront leur protéinurie augmentée. Des prélèvements sanguins seront effectués toutes les 2 semaines au niveau de la veine faciale afin de faire un suivi des anticorps auto-immuns dans le sérum. Tous les animaux traités avec l'anticorps d'intérêt ou avec l'isotype contrôle seront analysés afin d'en obtenir un maximum d'information post mortem (anatomopathologie pour voir les lésions et la présence d'auto anticorps dans différents organes cibles, immun histologie, cytométrie pour étudier l'évolution de différentes populations lymphocytaires au cours de la maladie.

Les résultats obtenus permettront d'établir une preuve de concept quant à l'utilisation d'un anticorps ciblant la molécule CD45RC dans les réponses auto-immunes. Ces résultats permettront également d'évaluer la durée de traitement nécessaire et suffisant à envisager pour un traitement chez l'homme, ainsi que les mécanismes d'action de l'anticorps sur les cellules. L'anticorps anti-CD45RC fait l'objet d'un brevet quant à son potentiel thérapeutique prometteur dans le domaine de la transplantation d'organe solide et de cellules, mais aussi pour le traitement de maladies autoimmunes.

19313 Le foyer de la pandémie de Covid-19 est né il y a un an, à Wuhan, en Chine. Aujourd'hui le SARS-CoV-2 (coronavirus responsable de la maladie) continue de se répandre à travers le monde: il est responsable à ce jour de plus de 68 millions cas d'infection et près de 1.6 millions de décès. Pour contenir cette avancée du virus, de nombreux pays ont adopté des mesures sanitaires parmi lesquelles on peut citer la distanciation physique, le lavage des mains, l'identification de chaque cas et de chaque contact par des tests de dépistage. Certains pays, les plus touchés, ont toujours recours à des mesures de confinement plus ou moins strictes, afin de contenir/ralentir la propagation

du virus et soulager la pression énorme subit par les hôpitaux, les unités de soins intensifs et les agents de santé. Les espoirs de vaincre la maladie se tournent désormais vers les vaccins dont les récents progrès sont prometteurs. Il y a maintenant un réel espoir que les vaccins - en combinaison avec d'autres mesures de santé publique éprouvées et testées - aideront à lutter contre cette pandémie.

Une part importante des vaccins récemment développés contre le SARS-CoV-2 est destinée à générer une réponse anticorps vis-à-vis de protéines virales de surface du virus. Ces protéines sont variables au cours du temps pour un coronavirus donné et varient en fonction des espèces de coronavirus. Les vaccins développés actuellement contre le SARS-CoV-2 ne seront donc peut-être pas tout aussi efficaces dans quelques mois si la circulation des souches de SARS-CoV-2 perdurait. De même, ils pourraient ne pas être efficaces sur le prochain coronavirus émergent.

Le présent projet fait suite à une précédente demande déposée au début de 2021 se proposant d'évaluer l'efficacité d'un vaccin (en association ou non avec différents adjuvants) produit à partir d'une protéine conservée au sein de la famille des coronavirus, qui oriente la réponse immunitaire vers une réponse cellulaire (en plus de la production d'anticorps) en stimulant certaines catégories de cellules (les lymphocytes T) responsables de la destruction des cellules infectées. Les premiers résultats obtenus sont très prometteurs: réduction de la perte de poids des hamsters vaccinés, détection d'anticorps dirigés contre le coronavirus. Ce projet permettra de continuer l'évaluation de l'efficacité de ces vaccins candidats et nous aurons toujours recours à des hamsters dorés qui présentent une forte sensibilité au SARS-CoV-2 (atteintes respiratoires, perte de poids) ainsi qu'une forte réceptivité (multiplication du virus dans les poumons) et qui sont des modèles de choix pour l'évaluation de l'efficacité de nouvelles molécules thérapeutiques, de vaccins. Pour les contrôles d'efficacité, des groupes de 14 hamsters seront donc vaccinés à deux reprises à 1 mois d'intervalle, puis seront infectés par voie intra-nasale avec une souche de SARS-CoV-2. Les vaccins seront testés seuls ou en association avec des adjuvants (substances permettant d'augmenter la réponse immunitaire). A l'issue de l'expérimentation, nous confirmerons la capacité du vaccin à modifier les effets de la maladie (réduction de la perte de poids, réduction des signes cliniques et de la charge virale dans une sélection d'organes d'intérêt) et la capacité des animaux vaccinés à produire des anticorps vis-à-vis du SARS-CoV2. Le nombre de hamsters engagés dans ce nouveau projet est de 56 individus pour l'évaluation de l'efficacité vis-à-vis du SARS-CoV-2 (le choix final des associations vaccin + adjuvant sera affiné en fonction des derniers résultats de virologie du premier projet déposé).

Les hamsters seront hébergés en cage de 3 à 5 individus avec un enrichissement composé de nombreux tunnels, abris (afin de satisfaire leur besoin de cachette), cellulose, et de bâtonnets de bois à ronger. Un contrôle de leur état de santé sera assuré tous les jours. Des points limites précis et suffisamment précoces pour leur éviter toute souffrance prolongée et inutile ont par ailleurs été définis.

19314 Les objectifs du projet sont de découvrir et d'étudier des molécules originales, issues de banques de criblage notamment de banques de venins d'animaux et de végétaux, qui pourront être prometteuses pour une large série d'applications médicales en raison de leurs propriétés physico-chimiques, de leur grande affinité et de leur haute sélectivité pour leurs cibles physiologiques entraînant ainsi moins d'effets indésirables.

Les bénéfices susceptibles de découler de ce projet sont, d'un point de vue médical, une connaissance des paramètres pharmacocinétique, de toxicité et de biodistribution de ces molécules chez la souris et le rat permettant une translation clinique de ces paramètres chez l'Homme et, d'un point de vue scientifique, une compréhension des effets cardio-métaboliques induits par plusieurs de ces molécules dont les cibles sont impliquées dans les fonctions cardiovasculaires et métaboliques.

Nous étudierons :

- 1) La pharmacocinétique, la toxicité et la biodistribution des molécules au cours du temps, qui nécessiteront un prélèvement de sang et des organes à un temps précis chez chaque souris ou rat (procédure de classe modérée).
- 2) Le passage éventuel de la barrière materno-foetale des molécules, qui nécessitera un prélèvement du placenta et des embryons 24h après l'administration (procédure de classe légère).
- 3) La localisation cérébrale des molécules ayant des cibles présentes dans le cerveau, qui nécessitera un prélèvement du cerveau 45min après l'administration (procédure, de classe modérée).
- 4) Les effets des molécules sur les fonctions cardio-vasculaires qui impliquera une mesure non-invasive de la pression artérielle, puis un acte chirurgical léger correspondant à la pose d'un cathéter permettant la mesure plus fiable de la pression artérielle sur 24h (procédure de classe modérée).
- 5) Les effets des molécules sur la fonction rénale qui impliquera un relevé quotidien des urines produites pendant 5 jours et potentiellement un acte chirurgical léger correspondant à la pose d'une pompe osmotique sous-cutanée en cas d'administration par cette voie (procédure de classe modérée).

Après les procédures 1, 3, 4 et 5, les souris et rats seront exsanguinés (procédure de classe sans réveil) car il est nécessaire d'éliminer le sang circulant des organes pour que seule la molécule contenue dans l'organe soit quantifiée/visualisée lors des analyses et donc que cette quantification/visualisation ne soit pas faussée par la molécule circulant dans le sang.

Pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse éventuellement induites par nos procédures expérimentales, nous mettrons en place des point limites basés sur l'observation et le report du poids des souris et rats, de leur activité, leurs comportements sociaux, et la présence potentielle de plaies ou d'écoulements nasaux et oculaires.

Au vue du grand nombre de molécules testées (20) et des différentes procédures expérimentales qui seront réalisées, le projet prévoit d'utiliser au maximum 1050 souris mâles, 1080 souris femelles, 1050 rats mâles et 1080 rats femelles. Ces chiffres sont issus d'un calcul théorique qui représente le nombre maximum d'animaux. Ces chiffres seront réduits car 1) seules les molécules ayant prouvées leur intérêt dans la première procédure expérimentale passeront à la procédure suivante, et ainsi de suite jusqu'à la cinquième procédure et 2) seules les molécules ayant prouvées leur efficacité sur l'un des deux sexes seront testées sur l'autre sexe.

Les souris et rats seront tous euthanasiés à la fin du projet afin de récupérer les organes pour les analyser.

Application de la règle des 3R :

Remplacement : bien que nous réalisons des études in vitro de nos molécules en amont ou en parallèle, il est indispensable de mener cette étude in vivo au niveau d'un organisme entier car elle s'inscrit dans le cadre d'une application future en santé humaine.

Réduction : afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, nous sélectionnerons in vitro les molécules d'intérêts à étudier in vivo. Nous choisirons seulement 2 doses de chaque molécule à tester in vivo qui seront déterminées en fonction, premièrement, des paramètres pharmacologiques mesurés in vitro (concentration efficace, ...) et, deuxièmement, des données préliminaires in vivo obtenues au laboratoire concernant ces molécules. Nous sélectionnerons aussi seulement 2 méthodes d'administration chez l'animal pour chaque molécule qui seront déterminées en fonction des visées scientifiques et thérapeutiques relatives à ces molécules. Seules les molécules ayant prouvées leur efficacité sur l'un des deux sexes seront testées sur l'autre sexe, permettant de réduire le nombre d'animaux calculé. Ce nombre initial sera aussi réduit par une méthodologie où seules les molécules ayant prouvées leur intérêt dans la première procédure expérimentale passeront à la procédure suivante, et ainsi de suite jusqu'à la cinquième procédure (la procédure 6 étant nécessaire aux procédures 1, 3, 4 et 5). Il y aura donc une nette réduction du nombre d'animaux énoncé au début de ce projet. Enfin, nous utiliserons des tests statistiques adaptés permettant de diminuer le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir un résultat statistiquement pertinent.

Raffinement : dès leur arrivée, les animaux seront hébergés en groupe dans un milieu enrichi pendant 8 jours minimum. Une surveillance quotidienne des animaux par des personnes habilitées et formées sera effectuée. Pour réduire ou supprimer la douleur relative aux administrations, des canules souples de gavage et d'instillation seront utilisées. Pour raffiner davantage l'administration orale, une formulation sous forme de pâte, que les souris et rats prendront eux-mêmes, sera utilisée à chaque fois que la composition de la molécule le permettra. Afin de diminuer la douleur occasionnée par les chirurgies, une analgésie locale (Lidocaïne/Laocaïne) sera utilisée accompagnée, selon le palier de douleur engendré par la chirurgie, un traitement par Metacam/Méloxicam ou Buprénorphine. Pendant toute chirurgie, les animaux seront placés sur une plaque chauffante à 37°C, leur rythme respiratoire sera observé avec attention, et ils seront réhydratés avec du sérum physiologique. À leur réveil, les animaux seront remis dans une cage propre en groupe dans un milieu enrichi et étroitement surveillés pendant au moins 72h.

La souris et le rat sont des modèles mammifères reconnus pour l'étude de la pharmacocinétique et de la pharmacodynamique de l'être humain.

Nous utiliserons des souris et rats adultes car la pharmacocinétique et la biodistribution des molécules sont susceptibles d'être fortement modifiées durant la phase de croissance. De plus, les fonctions cardio-métaboliques, que nous prévoyons d'étudier, sont connues pour être plus variables entre les individus en phase de croissance plutôt qu'à l'âge adulte.

Ce projet n'est pas retenu pour une appréciation rétrospective puisqu'il n'inclut ni de procédure sévère, ni l'utilisation de primates non humains.

La durée du projet est de 5 ans.

19315 La polyarthrite rhumatoïde est une maladie articulaire destructrice. Les cellules du système immunitaire s'attaquent aux articulations en produisant des autoanticorps appelés ACPAs. Nous avons montré que les protéines PAD sont responsables de la production des autoanticorps ACPAs (2 demandes APAFIS dont le protocole d'injection des protéines PAD et le suivi des souris ont été approuvées en 2017 et 2018).

Nous voudrions tester une nouvelle thérapie pour bloquer la réponse immunitaire contre les protéines PAD et la production des autoanticorps ACPAs. Cette thérapie est un vecteur qui contient à la fois l'antigène cible (la protéine PAD) et des cytokines connues pour diminuer la réponse immunitaire contre l'antigène. Ce projet suivra la règle des 3R.

Remplacer: il est impossible d'évaluer l'efficacité de cette thérapie pour bloquer la production d'autoanticorps dans un modèle alternatif in vitro. Afin de développer cette thérapie en prévention ou en traitement chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, nous avons besoin de la tester dans des modèles in vivo.

Réduire: nous allons suivre pendant 50 jours l'effet de l'injection du vecteur qui contient à la fois la protéine PAD et des cytokines avant ou après injections des protéines PAD sur des souris de fonds génétiques différents. Nous utiliserons 30 souris par groupe pour pouvoir faire une analyse statistique par test de Student (Formation Outils statistiques appliqués à l'expérimentation animale, 2019). Le nombre total de souris sera de 1080 souris.

Raffiner: Une anesthésie gazeuse à l'isoflurane sera réalisée pour chaque prélèvement de sang dans la veine mandibulaire (soit 4 prélèvements de sang par souris) pour analyser leur sérologie. Les souris seront mises à mort par dioxyde de carbone dans une chambre CO₂ (débit de 20 à 30 % du volume de la chambre par minute) pour analyser leur réponse lymphocytaire.

Les souris seront hébergées dans une plateforme qui assure la gestion et l'acquisition du matériel d'animalerie pour les équipes de recherche. Elle met aussi à disposition le savoir-faire de zootechniciens dans la gestion des souris. Le bien être des souris sera évalué par le responsable du projet et les zootechniciens deux fois par semaine. Une grille d'évaluation de la souffrance de l'animal sera faite 2 fois par semaine par le responsable du projet (Annexe 1). Si une souffrance est observée, elle sera chiffrée par une grille de score (Annexe 2). L'injection d'analgésiques

(buprénorphine ou du kétoprofen) sera faite si besoin. Chaque cage contenant au maximum 4 souris sera pourvue d'un enrichissement pour améliorer l'habitat des souris pendant le protocole.

19316 La spiruline est un complément alimentaire consommé depuis des siècles par des habitants d'Afrique et d'Amérique du sud. Depuis plusieurs décennies les scientifiques se s'intéressent à leur richesse nutritionnelle (protéines, glucides, lipides, vitamines et minéraux). Cette richesse associée à un rendement exceptionnel fait qu'elle est déjà utilisée (ou en cours d'étude) par des ONG pour combattre la malnutrition. Outre ses propriétés nutritionnelles les scientifiques s'intéressent depuis plusieurs années à ses vertus thérapeutiques. En effet, de nombreuses études scientifiques ont mis en lumière de nombreuses activités anti-inflammatoire, hépato-protectrices mais également des effets sur le cancer, le système immunitaire ou encore le vieillissement cellulaire et l'exercice physique.

Ces deux derniers points sont au cœur de notre approche « du mieux vieillir » et la stratégie d'optimisation du vieillissement porté par notre laboratoire. Cette étude préliminaire va nous permettre d'acquérir des données afin d'évaluer l'impact de la spiruline sur les capacités musculaires. Plusieurs études ont montré des effets bénéfiques sur la performance musculaire mais aucune ne s'est penché sur l'impact au niveau de la fibre musculaire.

Notre étude préliminaire, va porter sur un effectif total de 48 rats Wistar divisé en deux groupes d'âge (3 et 18 mois) subdivisé en 4 sous-groupes :

1) Témoin (n=6) : 3 mâles et 3 femelles recevant un gavage de 2 mL d'eau à raison de 5 prises par semaine (du lundi au vendredi).

2) Témoin + activité physique (n=6) : 3 mâles et 3 femelles recevant un gavage de 2 mL d'eau à raison de 5 prises par semaine (du lundi au vendredi). Cette prise sera associée à un exercice physique de 30 min (procédure 02, légère) au rythme de 5 jours par semaine (du lundi au vendredi) durant 3 semaines et consistera à un déplacement sur tapis roulant réglé à 16m/min avec une inclinaison de 0°.

3) Supplémenté en spiruline (n=6) : 3 mâles et 3 femelles recevant un gavage à la spiruline (procédure 01, modérée) pendant 3 semaines à raison de 5 prises par semaine (du lundi au vendredi) d'un volume 2 mL d'eau à 500mg/Kg poids corporel.

4) Supplémenté en spiruline + activité physique (n=6) 3 mâles et 3 femelles recevant un gavage à la spiruline (procédure 01, modérée) pendant 3 semaines à raison de 5 prises par semaine (du lundi au vendredi) d'un volume 2 mL d'eau à 500mg/Kg poids corporel. Cette prise sera associée à un exercice physique de 30 min (procédure 02, légère) au rythme de 5 jours par semaine (du lundi au vendredi) durant 3 semaines et consistera à un déplacement sur tapis roulant réglé à 16m/min avec une inclinaison de 0°.

A l'issue des 3 semaines, pour chaque animal 4 muscles seront prélevés sous anesthésie générale (procédure 03, sans réveil 3,5 % isoflurane dans l'air (Vetflurane, 1000mg/g, Virbac)) associée prémédication antalgique par injection intrapéritonéale de buprénorphine (Buprécare multi dose 0,3mg/mL pour une dose de (0. 05mg/kg poids corporel) : 2 muscles rapides et 2 muscles lents. La moitié des échantillons sera consacré à une approche histologique et l'autre à une étude des propriétés mécaniques du muscle isolé. Cette procédure sous anesthésie générale est rendue nécessaire par la dégradation rapide des propriétés mécaniques des muscles après arrêt de la perfusion sanguine. Afin de pouvoir tester successivement plusieurs muscles du même animal il est donc nécessaire de maintenir l'animal vivant. A la fin de la procédure 03 tous les animaux seront euthanasiés par injection intrapéritonéale de pentobarbital (Exagon 400mg/mL) 1mL/kg soit 400 mg/kg.

Cette étude s'inscrit dans le respect des 3Rs.

[Remplacement :] Un modèle animal est nécessaire pour cette étape de notre étude. En effet, les approches alternatives in vitro du muscle ne permettent pas une évaluation globale des effets. Nous avons opté pour le modèle bien décrit rat Wistar.

[Réduction :] cette étude préliminaire a été rédigée de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisée et de servir de base pour une étude de plus grande ampleur

[Raffinement :] A leur réception, les rats seront stabulés et identifiés (marquage à la queue) deux par deux du même sexe. Les rats seront acclimatés à l'animalerie une semaine avant le début des expérimentations. Ils seront soumis à un cycle jour-nuit de 2x12h et auront un accès libre à de la nourriture standard et de l'eau. Leurs cages ventilées seront enrichies par l'ajout de papier cardé. Toutes les procédures seront effectuées avec l'objectif de maximiser le bien-être des animaux et de limiter la souffrance et la détresse. En outre l'exposition à la spiruline (bien documentée) ne montre aucune toxicité, ni douleur pour les valeurs employées dans l'étude. Néanmoins, nous prévoyons un suivi de la douleur associé en cas de besoin à un traitement analgésique (d'acétaminophène PRACETAM 40 % SOLUTION BUvable ajoutée à l'eau de boisson durant 72h (1,3 mg/mL) ou traitement équivalent recommandé par le vétérinaire référent).

19317 Ces dernières années, les recherches sur les déplacements collectifs de groupes d'animaux (essaims d'insectes, nuées d'oiseaux, bancs de poissons) ont suscité beaucoup d'attention. L'objectif de ces recherches est la compréhension du lien existant entre les interactions à l'échelle individuelle et les propriétés observées à l'échelle du groupe. Une difficulté majeure pour comprendre ces phénomènes vient de l'enchevêtrement des interactions entre un individu et son environnement physique (les obstacles, les conditions de température, la présence de sources de nourriture) et social (les autres individus du groupe auquel cet individu appartient). Le développement de nouvelles méthodes basées sur des algorithmes d'apprentissage automatique (deep-learning) pour suivre et analyser automatiquement le comportement des animaux a permis d'obtenir des données sur les interactions sociales avec un niveau de précision sans précédent. D'autre part, l'analyse fine des interactions individuelles a ouvert de nouvelles perspectives pour développer des modèles quantitatifs et prédictifs de comportements collectifs. Cependant peu d'études ont exploré dans des contextes écologiques pertinents, la fonction des comportements collectifs et les interactions impliquées à l'échelle individuelle dans l'émergence de ces propriétés fonctionnelles à l'échelle d'un groupe. Une fonction majeure des comportements collectifs observés dans les bancs de poissons est la détection et l'évitement de menaces. Les mouvements collectifs observés lors d'attaque de prédateurs ont déjà été étudiés dans des bancs de poissons. Mais les interactions interindividuelles impliquées dans le transfert d'informations lors de ces mouvements collectifs sont encore peu connues, et aucune étude n'a tenté d'intégrer des résultats empiriques et théoriques dans le contexte de l'évitement collectif de prédateurs. Dans cette perspective, les bancs de poissons sont bien adaptés à des expériences réalisées en milieu contrôlé qui peuvent également être utilisés pour tester des prédictions théoriques. Pour cela, nous allons, au moyen de méthodes essentiellement comportementales analyser les stratégies d'évitement et des réponses collectives de groupes de poissons lors d'une perturbation simulant une attaque de prédateur et d'identifier les interactions contrôlant la coordination des déplacements et la transmission d'informations dans ces situations. Sur l'ensemble de ce projet, nous utiliserons en totalité 60 poissons adultes (sans distinction de sexe) pour chacune des deux espèces (*Hemigramus rhodostomus* et *Oryzias latipes*). Les conditions d'hébergement dans un établissement utilisateur doté d'une structure du bien-être animal et les méthodes utilisées seront appropriées pour réduire le plus possible tout stress ou dommage durables que pourraient subir les animaux. Le suivi journalier des animaux sera clairement défini avec interruption de l'expérimentation si l'un des critères d'arrêt est atteint. En ce qui concerne le remplacement, étant donné que le projet concerne l'analyse du comportement animal, et plus particulièrement des comportements collectifs de groupes de poissons, il n'est pas possible d'utiliser des substituts. Cependant, le nombre de poissons utilisés sera minimisé et les protocoles d'échantillonnage ajustés afin de réduire le nombre d'animaux utilisés.

19318 Le cerveau est l'organe le plus complexe, formé de centaines de milliards de cellules telles que des neurones, des astrocytes et des cellules de la microglie, qui, collectivement, coordonnent le

maintien des activités corporelles. Le réseau vasculaire cérébrale est un réseau très élaboré, construit d'artères, de capillaires et de veines.

Ces structures vasculaires alimentent le tissu cérébral avec du sang oxygéné et des nutriments qui sont essentiels au bon fonctionnement du cerveau. Les dommages causés au réseau vasculaire entraînent un mauvais transport du sang vers le tissu cérébral, et peuvent conduire à de graves conséquences à court et à long terme, voire à la mort. La capacité de régénération d'une partie d'un organe ou d'un tissu après une lésion est appelée régénération, et la régénération du réseau vasculaire dans le cerveau après une lésion est fondamentale pour le rétablissement des fonctions cérébrales et corporelles. Actuellement, en raison de l'accès limité au cerveau, les processus de régénération cérébrale après une lésion sont peu connus.

Le poisson zèbre possède d'importantes capacités de régénération à l'âge adulte. Contrairement aux mammifères, il peut régénérer des organes tels que le cœur ou la moelle épinière. Il constitue donc un bon modèle de choix pour étudier les signaux qui sont générés pendant ce procès et qui peuvent jouer un rôle important.

L'objectif de cette étude est d'explorer la réponse régénératrice du réseau vasculaire dans le cerveau après une lésion. Nous utiliserons un modèle établi de blessure par piqure du tissu cérébral chez le poisson-zèbre adulte. Ce modèle, décrit dans la littérature, est utilisé pour étudier le processus de régénération neuronale dans le cerveau adulte, sans entraîner de difficultés comportementales cliniques. Nous proposons ici d'utiliser ce modèle établi pour connaître le rôle du réseau vasculaire au cours de ce processus. Cela pourrait permettre de mieux comprendre comment le cerveau se répare après une lésion, et de proposer de nouvelles méthodes de traitement de ces lésions. Il s'agit d'une étude préliminaire qui servira de base à de futures études qui examineront plus en détail ce processus.

Pour ce projet, nous avons besoin de 800 poissons zèbre adultes.

Concernant la règle des 3R, cette étude ne peut se faire avec des cellules en culture puisque nous nous intéressons à la régénération dans le cerveau, et cette régénération se produit chez l'animal vivant. Le poisson-zèbre est un excellent modèle de vertébré qui partage de nombreuses similitudes génétiques et structurelles avec le modèle mammifère et représente donc un bon compromis en termes de choix du modèle animal. Nous avons calculé les effectifs de manière à garantir une fiabilité et puissance statistique suffisante tout en réduisant au mieux le nombre d'animaux. Les animaux seront observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être.

Pour limiter la douleur et le stress des animaux, le dommage sera induit sous anesthésie. Cette procédure n'induit pas de changement de comportement chez le poisson. Néanmoins, le comportement spontané (position dans le bac, activité), le comportement provoqué (appétit) et l'aspect extérieur des animaux en procédure seront suivis afin d'assurer le bien-être de l'animal. Nous effectuerons un suivi journalier. Cette procédure est très courte et n'affecte pas le pronostic vital des animaux. La mise en place d'un suivi journalier et des points limites permettra d'éviter au maximum le stress et/ou la douleur au cours de l'expérimentation. De plus, les personnels impliqués dans ce projet sont qualifiés sur le plan technique et formés en continu sur les pratiques d'expérimentation animale.

19319 Cryptosporidium est un parasite protozoaire qui provoque des diarrhées chez l'homme et les animaux. Le parasite affecte principalement les individus nouveau-nés et les adultes dont le système immunitaire est compromis. La prévalence de Cryptosporidium parvum est élevée chez les ruminants nouveau-nés (veaux, agneaux, chevreaux) provoquant des pertes économiques importantes pour les éleveurs.

La cryptosporidiose reste mal contrôlée, il n'existe pas de vaccin et la chimiothérapie est très limitée. Chez les animaux d'élevage, les ruminants sont particulièrement touchés et seule une molécule possède une AMM (Halocur™) pour les veaux. Toutefois, pour présenter une efficacité, celle-ci doit être administrée préventivement tous les jours pendant 7 jours à tous les animaux. Ceci représente une contrainte élevée et un coût pour l'éleveur. Il y a aussi un risque qu'une résistance à ce produit unique apparaisse, rendant inefficace son utilisation.

De nombreux laboratoires et équipes de recherche à travers le monde sont à la recherche de molécules beaucoup plus efficaces pour faire diminuer l'incidence de cette maladie. Toutefois peu d'équipes possèdent à la fois l'expertise des tests *in vitro* et *in vivo* nécessaire pour valider leur efficacité.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'efficacité de molécules pour contrôler la cryptosporidiose (traitements préventifs et curatifs) sur une des espèces cibles, l'espèce ovine.

Les essais seront réalisés sur des agneaux infectés expérimentalement seulement si une efficacité de la molécule *in vitro* et sur modèle expérimental murin a été obtenu au préalable. Le nombre maximum d'animaux qui sera utilisé est de 144 (6 expérimentations de 24 animaux) pour les 5 ans.

Les expérimentations seront menées à bien selon le principe des 3R.

Raffiner : Les jeunes agneaux seront maintenus en groupe pour laisser libre court à leurs interactions sociales dans un parc avec des copeaux sous contrôle de la température adapté à ces jeunes animaux (20 ± 2 °C). Une surveillance quotidienne des animaux sera mise en œuvre afin de veiller à leur bien-être. Certaines procédures seront réalisées avec une récompense alimentaire (lait/colostrum). Les animaux seront équipés d'un capteur de télémétrie afin de suivre en continue les variations de température au cours de l'infection expérimentale et pouvoir réagir au plus vite.

Réduire : L'utilisation d'animaux est conditionnée par l'efficacité des composés contre le développement du parasite *in vitro*. Les essais réalisés sur des agneaux ne seront engagés qu'avec des produits ayant un index de sélectivité supérieur à la molécule de référence *in vitro* et après confirmation de l'effet protecteur et de leur innocuité sur le modèle murin. Les essais de traitements curatifs sont conditionnés par le succès des traitements préventifs. Le nombre d'animaux par groupe est calculé au plus juste selon l'expérience de la littérature sur des expériences similaires.

Remplacer : Ce projet vise à évaluer l'efficacité de nouvelles molécules anti-cryptosporidiennes que lorsque celles-ci se sont déjà montrées très efficaces lors de tests *in vitro*. L'efficacité *in vivo* ainsi que l'absence de toxicité ne peuvent être évaluées qu'à l'aide de modèles animaux.

19320 Les troubles de la fertilité sont en constante augmentation. L'infertilité représente un défi humain que la médecine s'applique à relever en allant toujours plus loin dans la performance et la sophistication des techniques d'assistance médicale à la procréation. La plus utilisée consiste à injecter un spermatozoïde directement dans l'ovule de façon à y introduire directement le spermatozoïde. En s'affranchissant de l'étape clef de fusion des gamètes, cette technique limite les échecs de fécondation. Néanmoins, elle n'est pas sans traumatisme pour l'ovule dont la membrane se voit transpercée et le contenu cytoplasmique modifié lors de l'injection du spermatozoïde. De façon générale, les traitements AMP sont lourds, coûteux et les résultats incertains puisque 40 % des couples concernés ne parviennent pas à avoir d'enfant malgré deux ans de prise en charge médicale. Dans ce contexte, la recherche fondamentale a un rôle prépondérant à jouer. En apportant la connaissance des mécanismes en jeu lors de la fécondation, elle ouvre la possibilité d'un diagnostic plus précis de la cause d'infertilité, donc d'une prise en charge plus ciblée et moins traumatisante. Toutefois, les mécanismes régissant la fusion des gamètes restent à ce jour peu connus. Les scientifiques travaillant sur cette thématique sont peu nombreux car ils sont confrontés au nombre très restreint d'ovocytes disponibles par mammifère et la forte mobilité des spermatozoïdes constitue un frein à l'utilisation d'une imagerie performante pour étudier la zone d'interaction des gamètes au moment de la fécondation. Progresser dans la caractérisation de la machinerie de fusion des gamètes en mettant en œuvre des approches permettant de lever ces verrous est l'objectif des recherches pluridisciplinaires que notre équipe mène sur la fécondation.

L'objectif de ce projet sera de déterminer le rôle d'éléments protéiques et lipidiques ciblés des membranes ovocytaires et spermatiques ainsi que le rôle des contraintes mécaniques exercées par le spermatozoïde en interaction avec l'ovocyte dans les 3 étapes de l'interaction gamétique : l'adhésion des gamètes, la réorganisation des membranes, leur fusion. Pour cela nous combinerons deux approches complémentaires :

La première, dite «physiologique», permettra d'étudier l'interaction entre les différents acteurs protéiques de la fécondation et leur rôle à travers l'imagerie en temps réel et haute résolution spatio-

temporelle du remodelage membranaire à l'interface spermatozoïde / ovocyte au cours de la fécondation.

La deuxième approche dite «biomimétique» consistera en la reconstitution étape par étape d'une membrane de composition contrôlée mimant celle d'un spermatozoïde et l'étude à chaque étape de son interaction avec l'ovocyte dans le but d'élucider les composants minimaux de la machinerie de fusion des spermatozoïdes.

Ce projet sera réalisé chez la souris, modèle animal dans lequel la majorité des gènes, notamment ceux impliqués dans la fertilité, sont similaires à ceux de l'Homme.

Au total, un maximum de 1850 souris issues de 7 modèles de souris transgéniques et WT seront utilisées pour ce projet. Ce nombre est calculé sur la base de l'expérience acquise par nos travaux passés faisant appel au mêmes types de protocoles expérimentaux et pour lesquels nous avons maintenant une bonne idée des taux de succès, et du nombre d'expériences à réaliser pour atteindre une statistique suffisante permettant de caractériser les paramètres étudiés.

Les deux approches de ce projet requièrent la récupération des gamètes de souris pour une utilisation expérimentale de ces gamètes in vitro. Les deux seules procédures auxquelles seront soumises les souris dans cette étude auront pour but de maximiser le nombre de gamètes par souris de façon à pouvoir minimiser le nombre de souris de l'étude. Chez la souris comme dans l'espèce humaine, les femelles ne produisent à chaque cycle que quelques ovules. L'injection d'hormones permet une super ovulation assurant la maturation de 3 à 4 fois plus d'ovules qu'en cycle spontané. Toutes les femelles de l'étude seront donc soumises à deux injections d'hormones afin de stimuler une super ovulation, 60h puis 12h avant le prélèvement des ampoules contenant les ovocytes. Ce prélèvement d'organe sera fait immédiatement après euthanasie des souris par élévation cervicale. Quant aux mâles, leur production de spermatozoïdes sera stimulée en isolant le mâle de sa fratrie pour 48h durant lesquelles sa cage sera mise à proximité de cages de femelles. Après ce délai, le mâle sera euthanasié par élévation cervicale et ses épидидymes contenant les spermatozoïdes seront prélevés.

Dans ce projet, la règle des 3R sera suivie de la manière suivante : (a) Remplacement - A chaque fois que cela sera possible, des modèles cellulaires in vitro seront développés afin de remplacer les gamètes. Ce sera notamment le cas de certaines études visant à caractériser l'interaction entre protéines gamétiques ciblées. Par ailleurs une partie du projet est basé sur le développement de membranes biomimétiques (systèmes synthétiques) visant à « remplacer » le spermatozoïde. Toutefois les gamètes étant à la base de la fécondation, leur utilisation reste au centre de l'étude et il n'est pas possible de contourner totalement le recours au modèle animal car la production de spermatozoïdes et d'ovules ne peut pas être réalisée in vitro. (b) Réduction – Comme nous l'avons vu précédemment, la super ovulation des femelles, l'isolement du mâle à proximité de femelles et l'utilisation de modèles biomimétiques permettent d'augmenter le nombre de gamètes par animal ou de remplacer les spermatozoïdes donc de réduire le nombre d'animaux utilisés. (c) Raffinement - Nous réduisons au maximum l'inconfort des souris car les procédures que nous mettons en œuvre sont de classe légère. Elles n'induisent a priori pas de douleur et le stress dû aux deux injections d'hormones, à l'isolement pendant 48 h d'un mâle suivi de leur euthanasie par élévation est à chaque fois de courte durée. Par ailleurs, jusqu'à leur euthanasie, les souris sont maintenues en présence de leurs congénères, y compris pour les mâles isolés dans une cage 48h pour les besoins de l'expérience, puisque cette cage est mise à proximité d'autres cages hébergeant des souris femelles. Pour chacune des procédures des points limites sont définis. Au sein de l'animalerie, température et humidité sont contrôlées. Les zootechniciens et personnels d'équipe de recherche veillent quotidiennement au bien-être des animaux et contrôlent leur état de santé. Les animaux disposent de papier Kraft et d'abris adaptés, pour enrichir leur environnement.

19321 Le traitement de la douleur pose un défi majeur, en raison d'un soulagement inadéquat de la douleur et des effets secondaires liés au traitement (par exemple AINS et opioïdes). Afin de comprendre la physiopathologie des états douloureux, un certain nombre de modèles animaux expérimentaux ont été développés. Ces modèles adaptent les principales caractéristiques comportementales de la douleur et constituent des avancées essentielles dans la recherche sur la douleur. Cependant, la

plupart des composés qui démontrent une efficacité dans des modèles rongeurs n'ont pas réussi à montrer une efficacité ou une sécurité suffisante chez l'homme, principalement en raison de la pharmacologie différentielle et de la distribution des récepteurs entre les humains et les rongeurs. Il est donc crucial de développer des tests comportementaux chez les PNH, qui sont plus étroitement homologues à l'homme et de valider les résultats pharmacologiques de plusieurs espèces.

Chez les singes rhésus, le test de retrait de la queue en eau chaude a été largement utilisé pour évaluer la nociception aiguë. Afin d'augmenter la sensibilité aux stimuli thermiques des animaux et ainsi diminuer les températures utilisées (afin notamment d'éviter de tester les animaux avec des températures pouvant entraîner des lésions cutanées), il est possible d'utiliser des substances qui ont un effet algogène. Cette sensibilité aux stimuli thermiques non nocifs se manifeste par une latence du retrait de la queue diminuée (l'animal retire sa queue plus rapidement alors qu'il a été entraîné à la garder une certaine durée dans de l'eau à température tolérable).

Parmi ces substances, la capsaïcine peut produire une allodynie thermique, en agissant comme un agoniste des récepteurs TRPV1. Ces récepteurs sont sensibilisés ou sur-régulés lors de conditions associées à des lésions tissulaires. Ainsi, l'allodynie induite par la capsaïcine et sa modulation sont des modèles de premier plan dans l'étude des mécanismes de la douleur in vivo et de leur blocage pharmacologique.

L'objectif de ce projet est de tester l'efficacité d'anticorps antagonistes sélectifs contre le TRPV1 afin de maximiser le soulagement de la douleur et d'éviter les effets secondaires dans un modèle d'allodynie thermique induit par la capsaïcine chez le macaque cynomolgus.

Ce projet sera divisé en deux procédures : la première permettra de mettre au point le modèle d'allodynie thermique. Après une période d'acclimatation suffisante, des macaques cynomolgus naïfs seront progressivement entraînés à rester calme en siège, puis à accepter que leur queue soit trempée dans de l'eau à température modérée pendant une certaine durée (20 secondes). La température utilisée sera progressivement augmentée afin de permettre l'observation du retrait spontané de la queue de l'animal à la chaleur. Ensuite, un premier test avec application d'un patch de capsaïcine et test du retrait de la queue à différent temps sera réalisé. La mesure de l'allodynie sera la vitesse de retrait de la queue, théoriquement inférieure à la durée de référence (20 secondes). Les animaux seront retestés avec le même protocole une semaine plus tard avec en plus l'administration d'un placebo dans la queue. Les animaux seront retestés le lendemain pour vérifier que le patch de capsaïcine n'a plus d'effet et s'assurer du bien-être des animaux. 4 animaux seront inclus dans cette procédure et suivront le programme d'entraînement, et 3 de ces 4 animaux (les plus coopératifs) seront inclus dans la phase de test.

La seconde procédure permettra de tester l'efficacité d'anticorps antagonistes sélectifs contre le TRPV1 dans ce modèle d'allodynie thermique. Les animaux subiront 4 phases : pour chacune, l'allodynie thermique sera induite par application du patch de capsaïcine et les animaux évalués avec le test de retrait de la queue (les températures d'essai dépendront des résultats de la première procédure). Lors de la phase 1, ils recevront un placebo et seront testés selon les mêmes modalités que dans la procédure 1. Lors de la phase 2, ils recevront un anticorps à une certaine concentration et seront testés. Après une période de repos suffisante, les animaux recevront à nouveau un placebo lors de la phase 3. Lors de la phase 4, ils recevront le même anticorps à une autre concentration et seront testés. Leurs résultats seront comparés à ceux de la phase 1 et 3 (afin de déterminer si l'anticorps a eu un effet analgésique), mais aussi à ceux de la phase 2 (afin de savoir si une dose plus faible présente un effet suffisant). Dans cette procédure, 8 animaux seront inclus et suivront le programme d'entraînement, et 6 de ces 8 animaux (les plus coopératifs) seront inclus dans la phase de test.

Réduction :

Ce projet prévoit l'utilisation de 12 macaques cynomolgus naïfs issus d'un élevage agréé. Le nombre d'animaux utilisés a été réduit au minimum nécessaire à l'obtention de résultats interprétables et transposables à l'homme. La méthode de phases successives pour la procédure 2 permet de diminuer le nombre d'animaux, chaque animal étant son propre contrôle.

Une évaluation scientifique des résultats de la procédure 1 mènera ensuite à la décision d'engager ou non la procédure 2, si les expérimentateurs sont confiants dans l'utilité du modèle.

Remplacement :

Afin de valider l'efficacité d'un nouveau traitement antidouleur et avant de le tester chez l'Homme, il est nécessaire de l'évaluer avec un modèle animal pertinent. La réaction des primates à la douleur en termes de mécanismes comportementaux et biologiques est beaucoup plus proche de celle de l'homme que celle d'autres espèces animales, et cette espèce est donc nécessaire pour la mise en place d'un tel modèle. De plus, la spécificité du récepteur TRPV1 du macaque est théoriquement proche de celle de l'homme, et permettra peut-être d'éviter les écueils que les précédents programmes de développement ont rencontré en passant du rongeur aux patients humains.

Raffinement :

Ce modèle d'allodynie thermique a été choisi parmi plusieurs modèles de douleurs sur le PNH, qui ont l'inconvénient d'induire soit des douleurs constantes et exquises (douleur neuropathique par ligature de nerfs), soit des lésions physiologiques irréparables (lésion neuropathique induite par chimiothérapie). Par comparaison, la littérature a montré que l'allodynie thermique induite par la capsaïcine n'est spécifique qu'aux stimuli chauds et n'induit pas de douleur per se, et que la pharmacocinétique rapide de la capsaïcine assure que les effets ne seront pas prolongés dans le temps. De plus, le biomarqueur principal de l'allodynie est le retrait de la queue, c'est-à-dire un évitement du stimulus douloureux : l'animal est donc capable d'interrompre lui-même la sensation douloureuse.

19322 La mucoviscidose est une des maladies génétiques les plus fréquentes en France et dans les pays occidentaux. Cette pathologie touche principalement les poumons mais aussi les systèmes digestif et reproducteur. En effet, ces patients montrent une diminution de la fonction respiratoire ainsi qu'une sensibilité aux infections bactériennes de type *S. Aureus*, *P. aeruginosa* et *H. influenzae*. Ils souffrent aussi d'une malabsorption des graisses, des nutriments et vitamines avec des alternances diarrhées/constipation et des douleurs abdominales. En parallèle, des atteintes pancréatiques importantes sont observées chez ces patients conduisant à terme au développement d'un diabète. La mucoviscidose est liée à une anomalie du gène codant pour la protéine CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) porté par le chromosome 7. Cette maladie est dite autosomique et récessive puisqu'elle ne s'exprime que chez les personnes portant 2 copies du gène CFTR muté. La France compte aujourd'hui 6000 patients atteints de mucoviscidose avec, grâce au progrès de la recherche, une espérance de vie moyenne entre 40 et 50 ans. En outre, la thérapie génique a notamment apporté des solutions avec l'lvacaftor (utilisable chez 4-5% des patients) et récemment une trithérapie (Trikafta) actuellement en phase 3 et qui serait utilisable chez 80% des patients. Ces différentes thérapies permettent de résoudre les problèmes de transport de la protéine à la membrane conduisant à l'amélioration de leur capacité respiratoire (augmentation en moyenne de 10%) et diminuant significativement les infections bactériennes chez ces patients. Cependant, près de 2000 mutations de ce gène sont aujourd'hui connues, classées de I à IV selon l'anomalie, et de nouvelles stratégies thérapeutiques doivent être mise en place puisque cette pathologie reste incurable. Ces dernières années, de gros progrès ont été faits dans la compréhension de la réponse immunitaire et il est évident que le système immunitaire, qui est le principal acteur dans les maladies inflammatoires, est une cible prometteuse. Aujourd'hui, très peu d'essais clinique modulant le système immunitaire dans la mucoviscidose ont été menés alors que de nombreuses études montrent une forte infiltration en neutrophiles ainsi qu'en macrophages dans les poumons de ces patients, associé à la chronicité de la pathologie. De plus, de nouveaux récepteurs à la surface de ces cellules ont été identifiés comme ayant un rôle dans la modulation de leur fonction inflammatoire. Nous aimerions donc étudier à l'aide de nouvelles molécules l'effet de la modulation du système immunitaire contre la mucoviscidose et notamment contre les infections pulmonaires et les atteintes digestives. Ce type d'étude nécessite une preuve d'efficacité in vivo dans des modèles précliniques, c'est pourquoi nous voulons tester ces thérapies chez la souris. Nous souhaitons d'abord étudier l'efficacité préclinique de notre molécule pour éliminer les infections pulmonaires par différentes souches dans des souris WT. Puis, une fois cette preuve d'efficacité mise en

évidence, nous étudierons son efficacité dans un modèle de souris CFTR KO mimant les symptômes de la mucoviscidose. Le nombre d'animaux utilisés sera de 2930 souris au maximum (réparties sur 4 modèles différents, selon 4 axes par modèle, et 4 groupes par axe) pour combiner un nombre réduit d'animaux avec une pertinence statistique. Le suivi des animaux sera quotidien et la gestion de la douleur maîtrisée le plus adéquatement possible afin d'apporter les soins nécessaires le plus rapidement possible aux animaux. Pour limiter le stress et l'inconfort, les animaux sont maintenus dans des cages ventilées dans un cycle jour/nuit de 12h/12h avec un accès à l'eau et à la nourriture à volonté ainsi qu'un nombre maximum de 5 animaux par cage et des brindilles de papier pour s'enfourer et se cacher.

19323 Contexte scientifique :

Le psoriasis est une pathologie inflammatoire cutanée affectant 2 à 3 % de la population. Elle est caractérisée par une hyperplasie des kératinocytes (cellules de la peau), ce qui conduit à la formation de plaques érythémateuses et d'exfoliation. L'étiologie du psoriasis est imparfaitement connue. Elle résulte d'interactions complexes entre des facteurs génétiques, environnementaux, des atteintes de la barrière cutanée et un dysfonctionnement immunitaire. Outre la gêne physique, le psoriasis exerce un fort impact psychosocial. De nombreuses études cliniques ont fait état d'une forte association du psoriasis avec l'athérosclérose, le diabète de type 2 et le syndrome métabolique (obésité...). Dans leur ensemble, ces maladies représentent la première cause de mortalité dans les pays industrialisés et près d'un tiers de la population mondiale est en surpoids.

L'inflammation associée à l'obésité est apparue comme un facteur aggravant dans le développement du psoriasis. Cette inflammation est médiée par les cellules immunitaires (dites « globules blancs »). Parmi ces cellules, les cellules dendritiques sont connues pour jouer un rôle important dans le psoriasis. Le métabolisme impacte fortement l'activation de ces cellules qui peuvent à leur tour activer d'autres cellules immunitaires, les lymphocytes T. La production de molécules inflammatoires telles que l'interleukine 23 (IL-23) par les cellules dendritique ou l'interleukine 17 (IL-17) par les lymphocytes T activés favorise le développement du psoriasis, et ce de manière accrue dans un contexte d'inflammation liée à l'obésité.

Problématique :

Le lien entre les maladies métaboliques et le développement du psoriasis reste inconnu. Le dérèglement des cellules immunitaires est associé à la progression des maladies métaboliques. En effet, la nutrition joue un rôle clé dans la production des globules blancs, ainsi que dans leurs fonctions. En particulier, nous avons déterminé que le glucose est important dans l'activation des cellules dendritiques. Une fois capté par la cellule, le glucose peut être utilisé via la glycolyse (voie métabolique permettant la production d'énergie) ou la voie des pentoses phosphates (voie métabolique régulant la synthèse de nucléotides et le stress oxydatif). Le lien entre la façon dont le glucose est utilisé par les cellules dendritiques et l'état d'activation de ces cellules reste mal compris.

Hypothèse de travail :

Nous émettons l'hypothèse que diriger l'utilisation du glucose vers la glycolyse ou vers la voie des pentoses phosphates va impacter le développement de la maladie. Ainsi, nous étudierons le développement du psoriasis sur des souris génétiquement modifiées dont les cellules dendritiques présentent un défaut d'utilisation du glucose via la glycolyse (souris dont les cellules dendritiques sont invalidées pour l'enzyme Pfkfb3 qui est essentielle à la glycolyse) ou via la voie des pentoses phosphates (PP) (souris transplantées avec de la moelle osseuse déficiente pour l'enzyme G6PDx qui régule la voie des PP). Ces souris seront comparées à des souris normales (dites « sauvages »). Nous placerons les souris en conditions de développement d'un stress métabolique par un court régime riche en graisses ("high fat diet", HFD) induisant une accumulation d'acides gras plasmatiques, puis le développement du psoriasis sera induit. En utilisant des modèles murins, nous chercherons donc à déterminer le rôle du métabolisme glucidique des cellules dendritiques dans le développement du psoriasis.

Justification du modèle et raffinement :

Nous avons pu générer des résultats préliminaires in vitro à partir de cellules primaires et de lignées cellulaires. Ces résultats indiquent que le métabolisme glucidique des cellules dendritiques affecte leur activation. Une approche in vitro de culture cellulaire n'est pas appropriée afin de comprendre entièrement le développement du psoriasis. Nos résultats préliminaires devront être validés à l'aide de modèles murins développés par la communauté scientifique comme outils d'études intégrant la complexité des problématiques de santé actuelles.

Le développement du psoriasis sera induit par application cutanée de crème contenant de l'imiquimod, une molécule agoniste du récepteur TLR7 exprimé par les cellules dendritiques. La liaison de l'imiquimod au TLR7 induit l'activation de ces cellules. L'effet de l'imiquimod sur les cellules dendritiques est potentialisé par un acide gras, le palmitate. Un court régime riche en graisses augmente les taux d'acides gras plasmatiques et aggrave le développement du psoriasis induit par imiquimod, et ce de manière dépendante de l'activation des cellules dendritiques. Ce court protocole a l'avantage d'induire de façon dynamique une augmentation des acides gras circulants, avant que d'autres complications liées à l'obésité ne se mettent en place. Les procédures proposées nécessiteront 640 animaux et tiennent compte du bien-être animal et la règle des « 3R » :

- Réduction : afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, nous estimerons le nombre d'animaux nécessaires pour répondre à notre question scientifique. Nous incluons dans notre étude les facteurs « sexe » et « âge » en utilisant les souris mâles et femelles, et ce peu importe leur âge. L'élevage de nos souris se fait de manière à générer des souris correspondant à nos besoins expérimentaux et peu d'animaux surnuméraire.

- Remplacement : aucune méthode alternative in vitro n'est adaptée afin de remplacer totalement le modèle murin. Toutefois, nous avons mis en place une approche utilisant la technologie d'édition génétique CRISPR-Cas9 permettant de remplacer partiellement ces modèles murins. Nous utiliserons cette technologie afin de modifier le génome de cellules de moelle osseuse provenant de souris « sauvages ». Ces cellules seront modifiées in vitro puis réimplantées dans des souris receveuses irradiées lors d'une procédure de greffe de moelle osseuse. Cette technique couramment utilisée permet de remplacer les cellules immunitaires de la souris receveuse par celles de la souris donneuse. Auparavant, nous aurions dû maintenir une colonie de souris supplémentaires et donc générer plusieurs centaines d'animaux au cours du projet. Cette méthode permettra donc de remplacer les souris déficientes pour G6PDx et de grandement réduire le nombre d'animaux générés et utilisés.

-Raffinement : Les expérimentateurs disposent de l'expérience et du savoir-faire adéquat afin de réaliser ces procédures tout en privilégiant le bien-être animal. Nous n'avons précédemment observé aucune incidence de ces procédures sur le bien-être des souris en termes de poids, prise alimentaire, ou quelque forme de détresse. Pour chaque procédure, nous avons prévu des mesures adaptées permettant la gestion de la souffrance, l'anxiété et la douleur pour nos animaux. Les cages contiennent de la litière permettant d'éviter le contact avec le plastique et sont enrichies avec un abri en plastique et du matériel de nidification. Les animaux auront libre accès à de l'eau et de la nourriture.

Perspectives :

Cette étude pourrait ouvrir de nouvelles perspectives de traitement visant à moduler le développement du psoriasis via une approche métabolique.

19324 Les pathologies broncho-pulmonaires représentent une cause majeure d'invalidité et de décès dans la population humaine. De nombreuses études génétiques montrent une association génétique significative entre certaines mutations présentes dans les gènes codant pour les sous-unités des récepteurs nicotiques $\alpha 3$, $\alpha 5$ et $\beta 4$ et l'apparition de la bronchopneumopathie obstructive chronique (BPCO) et les cancers broncho-pulmonaires, à la fois chez les fumeurs et chez les non-fumeurs.

A l'aide d'un modèle animal de souris transgénique exprimant dans son épithélium respiratoire une version mutée du gène de la sous-unité $\alpha 5$ ($\alpha 5$ SNP) du récepteur nicotinique, il a été démontré que ces souris développaient spontanément au cours du vieillissement les symptômes caractéristiques

de la BPCO. Parallèlement, il a été démontré que 30% des tumeurs cancéreuses chez l'homme expriment des mutations dans la famille des oncogènes ras (gènes dont l'expression favorise l'apparition de tumeurs). La souris transgénique exprimant le gène muté K-ras, est fortement prédisposée à développer des tumeurs pulmonaires spontanées, caractéristiques du stade précoce du cancer du poumon.

En tirant avantage de ces 2 modèles préexistants, notre projet a pour but d'approfondir l'étude de l'implication du polymorphisme humain de la sous-unité a5 du récepteur nicotinique dans le développement de processus inflammatoires conduisant à l'apparition de la BPCO mais aussi d'étudier son possible rôle comme facteur aggravant pour le développement du cancer du poumon.

Nous utiliserons des animaux issus du croisement de ces 2 lignées, exprimant à la fois le variant génétique de la sous-unité a5 et le gène muté K-ras. Dans un premier temps, nous ne ferons subir aucune procédure invasive aux animaux, seule l'apparition spontanée de tumeurs pulmonaires sera étudiée en fonction de l'âge des animaux.

Dans un second temps, en lien avec les résultats obtenus dans cette première partie de l'étude, nous étudierons et évaluerons le rôle de molécules pharmacologiques administrées dans des dispositifs sous-cutanés sur les symptômes observés.

Notre étude, qui implique de suivre le développement des tumeurs au cours du temps, n'est pas réalisable à l'aide de méthodes alternatives telles que des cultures cellulaires mais afin de respecter la règle des 3R, notre plan d'expérience a été conçu avec l'aide de biostatisticiens pour réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés.

De plus, tout au long des 2 procédures, les animaux seront hébergés dans un environnement enrichi et feront l'objet d'un suivi régulier afin de stopper l'étude dès que les points limites définis et validés par la structure du bien-être animal sont atteints.

Dans cette étude nous utiliserons, pour l'ensemble des 2 procédures de classe modérée, 372 animaux, à la fois des souris mâles et femelles adultes, âgées de 12 à 40 semaines.

19325 Pour le traitement de la Sclérose en plaque (SEP), plusieurs molécules sont disponibles.

Ces molécules sont capables d'agir sur la réponse immunitaire cellulaire qui est dérégulée dans la SEP. L'objectif est de comparer l'activité biologique de deux substances sur la modulation de la réponse immunitaire. Cette étude sera réalisée chez la souris. Il est prévu d'utiliser 264 souris. Nous veillons à appliquer la règle des 3R : (i) la souris est le modèle in vivo pertinent pour valider la réponse immunitaire (Remplacer), (ii) nous utilisons le nombre pertinent minimal d'animaux. Nos groupes expérimentaux sont de 6 animaux de même âge et même sexe (Réduire) et (iii) nous réduisons, et limitons au maximum l'inconfort, la douleur induite par une immunisation unique. Le contact social entre les animaux est maintenu, un enrichissement du milieu (carré de cellulose, lamelle de carton) est effectué enfin la plus grande partie de l'étude s'effectue ex vivo (Raffiner).

19326 Les eczémas allergiques tels que l'eczéma de contact (colorants, produits chimiques, nickel...) ou l'eczéma atopique (acariens, moisissures, poils de chien/chat...) se caractérisent par des lésions cutanées et sont dues à une réaction allergique. Ces eczémas touchent plus de 15% de la population.

La cause des eczémas est complexe et reste mal comprise à ce jour. Ces dernières années, une population de cellules, les lymphocytes T mémoires résidants dans les tissus a été mise en évidence. Ces lymphocytes ne recirculent pas dans l'organisme et patrouillent dans la peau à l'interface entre l'organisme et l'environnement. Ils sont notamment impliqués dans la récurrence et la sévérité de l'eczéma.

Les traitements actuels de ces eczémas consistent notamment en l'application de corticoïdes. Or, l'impact des corticoïdes sur les populations de lymphocytes T mémoires résidants dans la peau n'a à ce jour pas encore été documenté. Ce projet a donc pour but une meilleure compréhension de l'efficacité de ces traitements sur cette population cellulaire récemment décrite. Pour ce faire, nous utiliserons un modèle bien connu d'eczéma allergique induit par l'application d'un chimique sur le

ventre rasé de souris, puis 5 jours plus tard ce même chimique est réappliqué sur les oreilles. La mesure de l'inflammation se fait par mesure de l'épaisseurs des oreilles des souris.

Les expériences ont été conçues en accord avec la règle des 3R (réduction, raffinement et remplacement). En effet, nous projetons de réduire le nombre de souris utilisé tout en préservant la robustesse des analyses statistiques, nous envisageons donc d'utiliser 288 souris, âgées de 8 à 10 semaines au début des protocoles. Aucun test in vitro (remplacement) ne permet d'intégrer la réaction immunitaire de la peau et des organes immunitaires associés dans leur ensemble dans le cadre de l'allergie.

Le bien-être des animaux (raffinement) est également pris en compte, les animaux seront hébergés par groupes d'individus compatibles, dans des conditions contrôlées avec la mise en place d'une diversification du milieu (ajout de papier, d'une maisonnette et de tubes en plastique). Dans le cadre de ce projet, les animaux seront anesthésiés pour chaque geste entraînant ou pouvant entraîner un stress ou une douleur pour l'animal. Des points limites bien définis et suffisamment précoces et prédictifs pour prévenir tout stress et toute douleur de l'animal ont été mis en place. Les soins et les procédures seront réalisées par du personnel qualifié.

19327 Ce projet est destiné au personnel de l'animalerie de l'établissement utilisateur qui possède toutes les autorisations pour réaliser des expérimentations et des chirurgies sur l'animal et qui souhaite acquérir des compétences sur certaines chirurgies et/ou maintenir ses compétences.

Ce projet concerne les gestes chirurgicaux et procédures couramment pratiqués au sein de l'établissement utilisateur, tel que la pose de cathéter, l'implantation de cellules et la trachéotomie, et inclue la préparation de l'animal, l'anesthésie, l'analgésie, l'asepsie, et la maîtrise et le contrôle des paramètres péri-opératoires. Ces chirurgies seront encadrées par du personnel maîtrisant ces techniques.

L'objectif est d'assurer la réalisation d'expérimentations de qualité tout en garantissant le bien-être des animaux et le respect de la règle des 3R.

Remplacement : Le rat a été choisi car cette espèce est la plus couramment utilisée dans les différentes procédures pratiquées au sein de l'établissement utilisateur.

Réduction : Le nombre d'animaux maximum prévu pour toute la durée du projet est le nombre minimum nécessaire permettant l'entraînement de 3 personnes sur 3 techniques chirurgicales : nous prévoyons au maximum 68 rats sur les 5 ans du projet.

Raffinement : Le personnel concerné s'entraîne dans un premier temps sur des animaux euthanasiés. Lorsque la technique est acquise sur animal euthanasié, il est nécessaire de travailler sur des animaux anesthésiés afin d'appréhender à maîtriser les difficultés liées au vivant. Les procédures sont réalisées sous analgésie et sous anesthésie générale profonde sans réveil. Tout au long de l'expérimentation, les rats seront observés et les paramètres physiologiques contrôlés (température, respiration). Des points limites sont définis afin de préserver le bien-être des animaux.

Une phase d'acclimatation de 5 jours minimum est appliquée après réception et les rats sont hébergés en groupes sociaux harmonieux, dans un environnement enrichi afin de limiter les angoisses qui pourraient être induites par l'environnement : tunnels en carton, sizzle pads et bûchettes de peuplier.

Le choix des instruments est adapté aux techniques de chirurgie pratiquées lors de ces procédures afin d'éviter toute lésion ou délabrement source de douleur.

19328 La polyradiculoneuropathie inflammatoire démyélinisante chronique est une pathologie neuromusculaire hétérogène qui affecte les nerfs périphériques et entraîne des faiblesses musculaires voire des paralysies, mais n'est pas associée à des douleurs neuropathiques. Jusqu'à présent aucun biomarqueur ne permet de diagnostiquer ces pathologies. Nous avons récemment découvert que des anticorps ciblent des molécules d'adhérences impliquées dans la formation des noeuds de Ranvier qui permettent la propagation rapide des influx nerveux le long des nerfs. Notre but est de déterminer l'implication de ces anticorps dans la genèse de cette maladie inflammatoire, cela afin de démontrer que ces anticorps sont de nouveaux biomarqueurs et afin de trouver de

nouvelles thérapies pour cette pathologie. Le développement de modèles animaux est donc crucial pour mettre en évidence la pathogénicité des anticorps et découvrir les mécanismes neuro-immuns complexes responsables de ces pathologies. Il n'existe pas d'alternative à l'utilisation des modèles animaux. Les biopsies de peau ou de nerf sural ne permettent pas de rendre compte des atteintes chez ces patients. Nous proposons ici de réaliser plusieurs procédures chez le rat Lewis qui peuvent entraîner des faiblesses musculaires, mais n'attendrons pas le stade de la paralysie et ne seront pas associées à de la douleur neuropathique. Nous proposons d'utiliser 480 animaux. Etant donné que les résultats sont peu prévisibles pour certaines procédures, nous avons estimé le nombre d'animaux nécessaires.

Reduire: Le nombre que nous avons estimé sera revu à la baisse en fonction des résultats. Notamment, nous réaliserons les études électrophysiologiques et morphologiques sur les mêmes animaux afin de diminuer leur nombre.

Raffiner: Le modèle néonatal est déjà un raffinement de la procédure qui nous avons mis en place afin de diminuer le nombre d'animaux, la durée de la procédure et la souffrance animale.

Remplacer: Afin de raffiner encore plus la procédure, nous développons des tests sur co-cultures de neurones avec des cellules de Schwann afin de créer un modèle in vitro qui pourrait remplacer le modèle animal.

Pour les animaux adultes, les animaux seront isolés par groupe de 2 animaux par cages dans un environnement enrichi. Il n'y aura pas lieu de traiter les animaux pour réduire la douleur, angoisse ou souffrance. Afin d'éviter toute détresse, les animaux bénéficieront d'une surveillance et d'un examen clinique quotidiens. Les animaux seront sacrifiés dès qu'ils présentent des signes de paraparésie, une perte de poids importante, ou des signes de nécrose de la peau au niveau du site d'immunisation.

Pour le modèle néonatal, les animaux seront sacrifiés deux jours après la naissance. Il n'y aura pas lieu de traiter les animaux pour réduire la douleur, angoisse ou souffrance.

19329 Plus de 5% de la population française est atteinte d'un diabète, et parmi ces patients, 90% sont atteints d'un diabète de type 2, qui se caractérise par le développement d'une résistance à l'insuline. L'augmentation de la prévalence du diabète est due, au moins en partie, à un déséquilibre nutritionnel associé à une augmentation de la sédentarité. Le diabète entraîne des complications graves à long terme, comme des complications cardiovasculaires et des maladies du foie. Le principal facteur de risque de développer un diabète de type 2 est l'apparition d'une obésité due à une alimentation trop riche associée à une dépense physique diminuée. Un des enjeux de la recherche sur le diabète de type 2 est de découvrir les mécanismes impliqués dans l'apparition de la maladie, et notamment d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de la résistance à l'insuline et du diabète en réponse à l'obésité. L'obésité se caractérise par une expansion du tissu adipeux (tissu qui est composé des cellules remplies de gras) et un dysfonctionnement des capacités métaboliques de ce tissu. En particulier, le tissu adipeux subit un remodelage métabolique induisant une diminution de l'oxygénation de ce tissu et une inflammation accompagnée de l'augmentation de la production de molécules proinflammatoires.

Cet environnement pro-inflammatoire au niveau du tissu adipeux altère la voie de signalisation de l'insuline aussi bien au niveau du tissu adipeux mais également dans l'organisme entier, en induisant une résistance à l'insuline dans les tissus comme les muscles. Notre équipe a démontré l'implication d'une protéine dans le développement de la résistance à l'insuline et de certaines complications métaboliques liées à l'obésité comme le développement d'un foie gras.

La poursuite de notre étude nécessite d'invalider l'expression de cette protéine spécifiquement dans certains tissus, ce qui permettra d'identifier le rôle de cette protéine dans le développement des complications métaboliques de l'obésité. Pour cela, nous utiliserons des souris dont le gène d'intérêt est entouré de séquences spécifiques appelées loxP. La présence de ces séquences permet d'enlever ce gène d'intérêt spécifiquement dans certains tissus. Ces souris n'ont pas été caractérisées et le but de ce projet est de déterminer si le phénotype de ces souris est un phénotype dommageable ou non dommageable.

Conformément aux exigences de remplacement, réduction et raffinement, les expériences in vivo ont été précédées de multiples expériences in vitro sur des cellules adipocytaires ce qui a démontré l'implication centrale de notre protéine d'intérêt.

Remplacement : malheureusement, il n'existe pas à ce jour d'alternative à l'expérimentation animale pour étudier in vivo la mise en place de la résistance à l'insuline : aucun système in vitro actuel ne récapitule toute la complexité et de toutes les interactions existantes entre cellules et organes dans un organisme entier.

Réduction : conformément aux recommandations de la directive 2010/63/EU sur la protection des animaux à utilité scientifique (corrigendum du 24/01/2013), nous produirons strictement 78 animaux afin de caractériser le phénotype de cette lignée murine : 3 croisements hétérozygotes en F0, 3 croisements en F1 et 9 en F2 (pour analyser tous les phénotypes produits sur 2 générations).

Raffinement : l'hébergement sera réalisé dans des locaux à l'environnement contrôlé, avec enrichissement systématique de toutes les cages et nourriture adaptée à l'état physiologique (enrichie lors de la gestation et de l'allaitement). En plus du suivi quotidien réglementaire, un suivi spécifique sera également effectué pendant la gestation, à la mise bas, entre J0 et J56 et au-delà. Cela permettra de détecter précocement toute souffrance ou détresse et de mettre immédiatement en œuvre les moyens adéquats.

Ce projet nécessite l'utilisation de 78 souris.

19330 La thrombose veineuse (TV) représente la troisième cause de mortalité cardiovasculaire dans les pays industrialisés. C'est une pathologie fréquente (incidence annuelle 1/1000) avec une mortalité de 20% après un an. Un gène n'ayant jamais été associé à la coagulation a récemment été identifié comme associé à un risque accru de TV de 30%. Ce gène appelé SLC44A2 code pour une protéine appelée Slc44a2 donc les fonctions sont encore mal connues à ce jour. Elle est présente à la surface des neutrophiles, qui sont des cellules très importantes dans le développement de la TV. Il a été précédemment montré que Slc44a2 peut lier le facteur von Willebrand (FVW), une molécule clé de la TV. Le FVW est présent au niveau des cellules endothéliales composant la paroi vasculaire, et est relargué dans la lumière du vaisseau après stimulation inflammatoire. Il est connu que le neutrophile et le FVW sont cruciaux dans la TV et vu qu'un terrain inflammatoire est propice au déclenchement de la thrombose, nous pensons que Slc44a2 pourrait jouer un rôle important dans le recrutement du neutrophile à la paroi vasculaire dans un contexte inflammatoire, favorisant ainsi le risque thrombotique.

Afin de déterminer les mécanismes liant Slc44a2 à la TV, nous proposons donc d'étudier le recrutement des neutrophiles par le FVW de la paroi vasculaire veineuse dans un contexte inflammatoire.

Nous utiliserons des souris sauvages ou déficientes en Slc44a2 pour déterminer l'implication de Slc44a2 porté par le neutrophile dans ce recrutement.

Pour ce projet nous prévoyons d'utiliser un maximum de 6 souris C57BL/6J comprenant souris sauvages et déficientes pour la protéine Slc44a2.

Ces souris seront réparties en 2 groupes en fonction de leur génotype. Tous les actes seront réalisés sous anesthésie générale par mélange kétamine/xylazine.

Les animaux auront un accès ad libitum à la nourriture et à l'eau tout le temps. Un délai minimum de 72 heures entre la réception des souris et la date de la première intervention sera respecté.

Nous appliquerons la règle des 3R.

-Aucune autre méthode alternative in vitro ou in silico ne permet de satisfaire l'objectif de remplacement à notre connaissance.

-Concernant l'objectif de réduction nous avons limité nos travaux aux expériences indispensables pour répondre à notre question scientifique.

-L'objectif de raffinement a été pris en compte : nous ferons notre possible afin de diminuer les contraintes imposées aux animaux en renforçant leur confort: hébergement avec milieu enrichi (igloo de cages, enrichissement foisonnant à base de frisure de papier, nid végétal à base de fibres

courtes de coton), anesthésie et analgésie pour supprimer la douleur et le stress, diminution du stress en séparant animaux lors de l'hébergement et l'expérimentation.

19331 Dans la recherche sur la douleur, 80% des sujets étudiés sont des mâles, alors qu'hommes et femmes ne sont pas égaux face à la douleur. De nombreuses études démontrent que les femmes sont plus sensibles à la douleur et que l'efficacité des antidouleurs diffère en fonction du sexe, suggérant des mécanismes sexuellement différents dans la modulation de la douleur. Ce projet mené au sein de notre équipe vise ainsi à comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires qui sous-tendent ces différences sexuelles dans la modulation de la douleur.

Au cours des six dernières années, nous avons pu identifier des différences sexuelles dans la récupération post-lésionnelle de plusieurs modèles de douleur. Notre but étant de comprendre la physiologie de la douleur, notre projet nécessite l'utilisation d'animaux et ne peut recourir à des stratégies de remplacement par des méthodes in-vitro. Notre étude nécessite donc l'utilisation de souris adultes « sauvages » et génétiquement modifiées que nous analyserons par des tests comportementaux de sensibilité mécanique, en conditions normales et pathologiques (inflammatoire et post-opératoire). Les résultats de cette étude pourraient permettre de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques adaptées aux hommes et aux femmes.

Les objectifs proposés sont parfaitement réalisables sur 3 ans au vu des différentes ressources disponibles, financières (2 financements ANR et un financement équipe FRM) et humaines (5 chercheurs statutaires, 1 assistante-ingénieure, 1 chercheur post-doctoral, 3 étudiants en thèse et 1 étudiant en Master).

Les personnes affectées au projet sont formées et qualifiées à l'expérimentation animale : 5 personnes ont suivi la formation B, dont une a suivi la formation chirurgie, et tous les étudiants en thèse suivent la formation B. Par ailleurs nous utilisons du matériel de dernière génération et notre établissement possède un agrément propice à l'expérimentation animale.

Réduction : les procédures décrites sont appliquées depuis plusieurs années au sein de notre équipe et sont maîtrisées par les expérimentateurs. Nous avons donc l'expérience nécessaire concernant la réalisation des procédures et l'évaluation de l'impact sanitaire sur les animaux. La qualité de notre plan expérimental ainsi que l'étude détaillée du nombre d'animaux nécessaires à l'obtention d'un résultat scientifique statistiquement valable nous permettent d'optimiser le nombre d'animaux utilisés.

Ce projet nécessitera au maximum 270 souris.

Raffinement : les souris utilisées dans ce projet seront élevées en groupes sociaux, dans un environnement enrichi, pour optimiser les conditions d'hébergement et favoriser un comportement normal de l'animal. Les élevages sont effectués au sein de notre établissement agréé et 5 personnes sont dédiées à l'organisation et l'entretien des élevages. De ce fait, l'état sanitaire et environnemental des animaux sont contrôlés tous les jours.

Nous avons recours à l'anesthésie/analgésie lors du procédé chirurgical et des soins pré-, per- et post-opératoires adéquats sont administrés.

19332 Les études expérimentales menées jusqu'à présent concernant les faibles gammes de doses de rayonnements ionisants sur le système vasculaire montrent une variabilité des réponses dues notamment à la pathologie vasculaire étudiée. De plus, les études épidémiologiques mettent en évidence un lien entre l'exposition aux rayonnements ionisants à des doses modérées (> 500 mGy) et le développement de pathologies cardiovasculaires notamment les pathologies cérébrovasculaires, circulatoires et ischémiques.

Les principales pathologies cardiovasculaires (infarctus du myocarde et accident vasculaire cérébral) sont liées aux complications de l'athérosclérose et sont suivies, en termes de fréquence, par l'anévrisme aortique. La majorité des études expérimentales sur les effets de faibles doses ont été menées dans le cadre de l'athérosclérose et ne montrent aucun effet délétère sur cette pathologie. Aucune étude n'a, jusqu'à présent, mis en évidence l'impact des doses faibles à modérées de rayonnements ionisants sur la pathologie anévrismale aortique.

L'anévrisme de l'aorte abdominale est une pathologie du sujet âgé accumulant les facteurs de risque cardiovasculaires (tabac, obésité, athérosclérose, hypertension, etc.) ce qui en fait une maladie à la physiopathologie complexe.

Ce projet prévoit l'utilisation de 48 souris ApoE^{-/-} (qui développent spontanément des plaques d'athérosclérose, ce qui n'est pas le cas des souris sauvages) sur lesquelles des mini-pompes seront implantées et diffuseront en continu de l'angiotensine II afin d'induire une hypertension conduisant à l'anévrisme. Ce projet intervient en complément de projets déjà menés dans le laboratoire sur ce même modèle.

L'objectif de notre étude est d'évaluer par des approches in vivo la réponse des doses faibles à modérées sur pathologies anévrismales dégénératif : est-ce que l'exposition externe aux rayonnements ionisants potentialise ou non une pathologie anévrismale ?

Afin de faire ce travail, l'utilisation d'animaux est nécessaire car nous voulons connaître l'effet de rayonnements ionisants sur une pathologie à l'échelle de l'organisme entier. Dans ce cas, l'étude sur les cellules n'est pas suffisamment représentative d'un organisme intégré et ne peut mimer une pathologie globale.

Cette étude vient en complément d'un précédent projet pour consolider la puissance statistique du fait de l'hétérogénéité de ce modèle animal.

Les procédures utilisées suivent la réglementation afin de limiter l'impact sur le bien-être des animaux : suivi des animaux avec établissement de points-limites précoces, chirurgie sous anesthésie générale avec prise en charge de la douleur.

Le respect des règles de remplacement, réduction et de raffinement seront appliquées. En effet, d'une part, l'utilisation d'animaux est nécessaire pour connaître l'effet de rayonnements ionisants sur cette pathologie à l'échelle d'un organisme entier. D'autre part, un nombre suffisant d'animaux est utilisé afin d'avoir une puissance statistique suffisante et des résultats exploitables.

19333 Pour le traitement de la maladie hémorroïdaire, il existe plusieurs techniques chirurgicales.

L'une d'elles est la ligature hémorroïdaire avec guidage Doppler. Elle consiste à repérer les branches artérielles qui cheminent dans la paroi rectale en direction du réseau hémorroïdaire interne à l'aide d'une sonde Doppler puis, à les ligaturer pour réduire fortement l'alimentation en sang des hémorroïdes en procidence (c'est-à-dire : « gonflées »). Ces ligatures réalisées avec du fil résorbable se situent au niveau de la zone de jonction entre le bas rectum et le haut du canal anal.

Créée en 1995, cette technique est déjà largement utilisée chez l'humain et reconnue comme « mini-invasive » puisqu'elle préserve l'architecture du canal anal, ne génère pas de plaies et occasionne des douleurs modérées.

Le test que nous souhaitons conduire n'a donc pas pour vocation à prouver les avantages de cette technique ni à démontrer la capacité de la sonde Doppler à évaluer le débit sanguin.

Avec le recul de toutes ces années, ces éléments sont amplement validés et des dispositifs existent déjà sur le marché pour permettre la réalisation de cette technique.

Mais justement, par rapport au matériel existant, nous entendons apporter des améliorations significatives. Il s'agit ainsi d'évaluer les qualités ergonomiques du nouveau dispositif que nous avons développé précisément pour cette technique chirurgicale avant utilisation chez l'homme

Par rapport à l'offre actuelle d'instruments dédiés à cette technique, le nouveau système breveté se distingue surtout par une modification ergonomique majeure avec la création d'une pièce mobile, laquelle doit apporter 2 bénéfices :

- Réaliser une procédure avec une réelle approche scientifique en repérant très précisément la position des ligatures réalisées.
- Faire les ligatures à 2 niveaux différents de profondeur (distants de 10 mm comme le veut la technique) en ne retirant pas le dispositif du canal anal. Cela permettra non seulement une plus

grande précision des ligatures, une plus grande rapidité dans l'exécution de la procédure et une réduction du risque de faute d'asepsie toujours possible.

Ce sont autant d'éléments qui vont aider le chirurgien dans l'exécution de son geste.

C'est la raison pour laquelle les tests seront réalisés par un chirurgien très expérimenté dans cette technique de ligature hémorroïdaire avec guidage Doppler.

Sa pratique lui permettra de valider de façon sûre la réalité de l'amélioration apportée par le nouveau dispositif sur les critères suivants :

- La facilité de mise en œuvre par rapport aux produits existants qui comportent un système composé de plusieurs bagues imbriquées qui nécessitent de tenir, orienter, maintenir ces différents éléments avec la sollicitation continue d'une aide opératoire.
- Le repérage précis des différents niveaux de profondeur de l'intervention simplement en manoeuvrant la partie mobile du dispositif évoquée plus haut.
- La possibilité effective de pouvoir réaliser des ligatures à 2 niveaux de profondeur différents, sans avoir à retirer le dispositif du canal anal.
- La supériorité apportée par le dispositif dans les fondamentaux liés à cette technique, à savoir : l'éclairage de la zone d'intervention, la performance de détection de la sonde Doppler, la qualité de restitution du signal et la place offerte au chirurgien à l'intérieur du dispositif pour effectuer son geste sans gêne.

Ce genre de test de dispositifs médicaux ne peut pas être évalué avec d'autres modèles que des modèles mammifères avant leur essai chez l'Homme (remplacement et protection des patients).

L'intervention, pratiquée sous anesthésie générale est considérée chez l'homme comme peu douloureuse et devrait donc être peu impactante pour le porc, en termes de douleur directe comme de reprise du transit. Les animaux bénéficieront de toutes les procédures d'anesthésie et d'analgésie propre à leur espèce avec comme seule particularité en amont, une préparation par voie orale visant à vider les voies digestives basses, comme pour une coloscopie. Ils seront, dans la mesure du possible durant la phase de reprise du transit hébergés en groupes sociaux (raffinement).

A noter que l'hébergement individuel avec changement de litière personnalisé, permettra de bien suivre la reprise normale du transit par l'examen des selles. Celles-ci seront par ailleurs facilitées par l'intégration dans le régime alimentaire de composants riches en fibres comme des pommes ou des carottes crues.

A priori, un dispositif sera considéré comme satisfaisant s'il est utilisé avec succès sur trois animaux (réduction du nombre d'animaux). Nous envisageons de répéter cette phase expérimentale jusqu'à 5 fois de manière à pouvoir valider des évolutions possibles du dispositif. Le nombre maximum d'animaux impliqués serait donc de 15.

19334 Les mammites sont parmi les maladies les plus fréquentes en élevage bovin laitier. Elles affectent les performances zootechniques et économiques et sont source de mal-être des animaux. La capacité des bovins laitiers à résister à l'établissement de mammites est liée, en partie, à l'efficacité de leur système immunitaire mais également au fonctionnement de l'épithélium mammaire. Par ailleurs, les vaches laitières sont sujettes à un stress oxydatif intense au démarrage de la lactation. Le stress oxydatif interfère avec le système de défense immunitaire et peut également entraîner des dommages tissulaires au niveau mammaire. Alimenter les vaches laitières avec des extraits de plantes riches en antioxydant associés à d'autres extraits agissant sur le système immunitaire permettrait d'optimiser le statut immunitaire et antioxydant des vaches laitières et ainsi prévenir les mammites, cliniques ou sub-cliniques. Cependant, les effets de ces extraits de plantes sur les mécanismes impliqués dans la réponse du système immunitaire et le fonctionnement mammaire méritent d'être objectivés pour permettre le développement de ces solutions sur le terrain.

L'objectif de l'essai sera de tester la capacité de 2 solutions nutritionnelles destinées à prévenir les mammites. L'hypothèse de ce travail est qu'une solution à base d'extrait de plantes peut, au même titre que la vitamine E, réduire le stress oxydatif à l'échelle de l'organisme, réduire les dommages

tissulaires au sein de la glande mammaire et/ou favoriser les capacités fonctionnelles des neutrophiles et macrophages.

Les dommages tissulaires au sein de la glande mammaire, et les capacités immunitaires des vaches laitières seront évalués lors de la mise en place d'un essai expérimental réalisé sur vaches laitières in vivo. Cet essai sera accompagné par des challenges et mesures ex-vivo sur cellules prélevées de manière peu invasive à partir du sang et du lait. Ce projet respecte la règle des 3R.

Remplacer : même si des premières études sur cellules en culture ont permis de screener les extraits de plantes utilisés et ont montré des effets bénéfiques, il n'est pas possible de remplacer entièrement l'utilisation d'animaux pour définir les modes d'actions des extraits de plantes. Par contre, nous utiliserons des méthodes raffinées pour éviter de réaliser des procédures invasives.

Réduire : Le nombre d'animaux impliqués est de 45 car dépendant de la variabilité des mesures expérimentales réalisées. Pendant les 3 premières semaines de l'essai, 12 vaches de réserve seront également impliquées pour des prises de sang, ce qui représentera une sécurité pour mener à bien l'essai en cas de décalage des dates prévues de vêlage. L'étude se déroulant en début de lactation, cela nous contraint à un schéma expérimental en continu sans possibilité d'avoir l'animal comme son propre témoin ne permettant pas de réduire le nombre d'animaux (contrairement au schéma de type carré latin ou inversion).

Raffiner : La conduite d'élevage sera respectueuse du bien-être des animaux. Un suivi régulier du comportement des animaux sera mis en place pour détecter le plus rapidement possible tout signe de perturbations et de traiter les animaux malades. Nous utiliserons des méthodes alternatives à certaines méthodes invasives : plutôt que de réaliser des biopsies mammaires nous récolterons les cellules épithéliales mammaires à partir du lait et plutôt que de réaliser une infection expérimentale nous réaliserons un challenge ex vivo sur cellules du plasma.

19335 En filière porcine, la castration est réalisée sur des porcelets d'une semaine d'âge ou moins, pour assurer la production de viande exempte de mauvaises odeurs à la cuisson.

Cet acte chirurgical est douloureux pour les animaux. Pour alléger leur souffrance, l'administration d'analgésique est actuellement pratiquée dans les élevages en France. Cependant, cela permet uniquement d'alléger la douleur post-opératoire. La douleur chirurgicale doit être allégée également par anesthésie. L'anesthésie locale par injection ou contact, qui permet d'insensibiliser les tissus innervés qui sont sectionnés au cours de la castration, ne peut être pratiquée que par des vétérinaires à l'heure actuelle, mais sera utilisable par les éleveurs pour la castration de leurs porcelets à partir du 1er janvier 2022. Pour optimiser la prise en charge de la douleur, les manipulations des animaux doivent se faire dans le calme, en essayant de réduire au maximum leur stress. Une phase de pré anesthésie pourrait aider à réduire le stress de la manipulation. Par ailleurs, l'opération entraîne des saignements qui pourraient être réduits en améliorant la voie d'abord.

Ce projet étudie la mise au point de protocoles de prise en charge de la douleur lors de la castration, en s'intéressant à trois possibilités d'action : la phase de pré-anesthésie, les modalités d'application de l'anesthésique local, la voie d'abord.

Le suivi des animaux sera réalisé au moment de leur prise en charge puis de l'application du protocole d'anesthésie, de l'acte chirurgical et dans les heures et quelques jours suivants. Le suivi portera sur l'observation du comportement et des vocalisations. Des mesures du cortisol sérique seront effectuées suite à l'acte chirurgical. Dans les jours suivants, la sensibilité et l'état de cicatrisation de la plaie, les comportements spécifiques de la douleur seront relevés. Enfin, les performances de croissance seront relevées jusqu'au sevrage des animaux.

Remplacement : Sachant que le projet porte sur l'évaluation de la douleur ressentie par les animaux, il n'est pas possible de mettre en place de méthode de substitution qui évite l'emploi d'animaux vivants.

Réduction : Un maximum de 420 porcelets seront intégrés à ce projet. Cet effectif permet la réalisation de deux expérimentations avec chacune 210 porcelets. La première expérimentation est à pour objectif de préciser les protocoles qui pourront être utilisés par les éleveurs de porcs en 2022.

La seconde n'est pas envisagée à ce jour mais pourrait être nécessaire en fonction des demandes des parties concernées par cette réglementation. L'effectif par traitement a été calculé sur la base d'études similaires, pour réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en conservant un effectif suffisant d'animaux pour pouvoir tirer des conclusions sur l'efficacité des anesthésiques utilisés.

Raffinement : Les animaux sont logés conformément aux réglementations définissant les conditions de vie des porcs d'élevage. Lors des interventions, les animaux ne sont jamais isolés de leurs congénères : les animaux de la portée auxquels sont administrés les traitements sont placés ensemble dans une caisse puis remis directement dans la loge avec leur mère une fois l'intervention réalisée. Les procédures utilisées sont des pratiques habituelles d'élevage (castration). Les castrations et les prises de sang seront réalisées par du personnel qualifié en respectant les règles d'hygiène et de sécurité

19336 Au laboratoire ont été produits des anticorps de lamas, aussi appelés nanobodies, spécifiques aux récepteurs du glutamate, possédant des effets pharmacologiques. Ces récepteurs sont dérégulés et impliqués dans la maladie d'Alzheimer et constituent des cibles thérapeutiques potentielles pouvant diminuer la toxicité liée aux peptides amyloïdes. Les molécules / drogues disponibles sur le marché ne sont pas spécifiques à un seul récepteur et peuvent induire des effets secondaires notoires. Des données préliminaires, obtenues au laboratoire, montrent que les nanobodies sont spécifiques de leurs cibles et possèdent des effets pharmacologiques pouvant moduler l'activité des récepteurs, de manière positive ou négative. L'objectif de ce projet est d'évaluer le potentiel thérapeutique de ces anticorps de lama dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer et de déterminer l'implication de ces récepteurs dans l'aggravation ou l'atténuation de la production de plaques amyloïdes.

Les nanobodies sont 10 fois plus petits que des anticorps classiques tels que les Immunoglobulines G, augmentant leur probabilité d'atteindre le cerveau et d'exercer leur effet thérapeutique. Les nanobodies ont aussi été démontrés comme n'ayant pas ou très peu d'effets inflammatoires après leur injection, contrairement aux anticorps classiques.

Ce projet respectera la règle des 3R :

1. Remplacement : les données in vitro obtenues par le laboratoire sur la sélectivité des nanobodies envers ces récepteurs et leurs effets pharmacologiques, suggèrent qu'un traitement avec les nanobodies pourrait modifier différents marqueurs de la maladie d'Alzheimer in vivo.

2. Réduction : l'étude sera réalisée en 2 étapes sur un total de 440 souris (sauvages et transgéniques) pour étudier l'impact d'un traitement avec des nanobodies. L'étape 1 (étude pilote, 110 souris) sera déterminante pour réajuster les doses de nanobody à injecter et le nombre d'animaux à utiliser pour l'étape 2 (traitement des souris transgéniques 5xFAD et APP NLF, 330 souris), afin que les données soient statistiquement valides.

3. Raffinement : les données préliminaires obtenues au laboratoire et présentes dans la littérature scientifique n'indiquent aucune toxicité possible liée à l'injection des nanobodies. Il n'est donc pas attendu de souffrance chez les animaux qui seront injectés en intrapéritonéal. Les animaux utilisés seront sous surveillance régulière. Si les points limites sont atteints lors de l'expérimentation (perte de poids de plus de 20%, blessures, prostration, léthargie, décubitus latéral, ou autres signes), les souris seront sacrifiées. Pour évaluer l'effet de l'injection des anticorps en intrapéritonéal, différents paramètres seront observés: les processus neuro-inflammatoires, suivi de paramètres comportementaux généraux (prostration, léthargie, activité,...) et cognitifs (tests comportementaux) et le suivi de l'amélioration ou l'aggravation de la pathologie (histologie et biochimie).

Au vu des données disponibles dans la littérature scientifique, aucun symptôme de douleur n'est attendu pour ces modèles. Les souris seront hébergés dans un milieu enrichi, avec un accès à l'eau et à la nourriture ad libitum.

19337 Chez l'homme, certaines maladies génétiques graves peuvent être traitées par thérapie génique en utilisant des vecteurs viraux de transfert de gène. Or, ces vecteurs ou les gènes qu'ils transportent

peuvent déclencher des réponses immunitaires indésirables compromettant les bénéfices de ces traitements et empêchant de re-doser les patients avec le même vecteur. Ce problème a été rencontré dans plusieurs essais cliniques de thérapie génique chez l'homme, mais reste à ce jour difficile à comprendre et à surmonter.

Dans ce contexte, notre laboratoire s'intéresse aux développements technologiques sur les vecteurs qui permettraient de réduire les réponses immunitaires. Notre laboratoire travaille sur plusieurs types de vecteurs, modifie leur système d'adressage et essaye de comprendre l'impact sur les interactions avec le système immunitaire.

Nous proposons d'utiliser un modèle de souris « humanisées » pour étudier la réponse d'un système immunitaire humain à l'administration de vecteurs de thérapie génique. Il s'agit d'utiliser des souris dépourvues de système immunitaire pour greffer des cellules souches sanguines humaines qui vont former un système immunitaire humain qui pourra fonctionner pendant plusieurs mois et répondre à des stimulations antigéniques. Nous pourrions ainsi reproduire in vivo les mécanismes complexes qui ont lieu chez l'homme avec l'induction d'anticorps, la prolifération des cellules et la mémoire immunitaire en cas de ré-administration de vecteur. Ce modèle de souris n'a pas encore été utilisé en thérapie génique.

Pour l'ensemble de notre projet, qui durera 5 ans et compte tenu des paramètres qui seront analysés, nous estimons à 270 le nombre de souris nécessaires à l'étude.

Ce projet s'inscrit dans le respect de la règle des « 3R » (Remplacement, Raffinement et Réduction) et du bien-être animal.

Respect de la règle du Remplacement : L'étude des réponses immunitaires humaines à l'échelle de l'organisme entier (rate, ganglions lymphatiques et sang) ne peut pas être réalisée in vitro. Des tests en cultures cellulaires donnent des indications sur l'efficacité de transfert de gène, sur la sélectivité cellulaire et sur la toxicité éventuelle des vecteurs mais ne peuvent pas modéliser les interactions complexes et dynamiques qui sont mises en jeu lors des réponses immunitaires adaptatives (production d'anticorps, mémoire immunitaire). La souris humanisée représente une alternative aux études chez l'homme ou aux études chez le primate.

Respect de la règle du Raffinement : Les vecteurs de thérapie génique injectés auront été contrôlés au préalable pour confirmer la dose à utiliser et leur stérilité microbienne. Des méthodes de pointe et multiparamétriques permettront d'optimiser l'obtention de données à partir des échantillons obtenus chez les animaux.

Respect de la règle de la Réduction : le nombre d'animaux utilisés, d'un total de 270, a été calculé statistiquement. Le protocole est conçu de manière à obtenir le plus d'information possible lors d'un suivi longitudinal des souris.

Pour le bien-être des souris, les animaux seront manipulés le moins possible et l'utilisation d'anesthésie permettra les injections ou les manipulations les plus stressantes.

19338 L'accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique est provoqué par un défaut d'oxygénation d'une zone cérébrale, dû à l'obstruction d'une artère amenant le sang au cerveau. L'AVC induit fréquemment des déficits moteurs et cognitifs sévères. La majorité des patients AVC présentant des troubles moteurs et cognitifs modérés (bien qu'handicapants) ne sont pas pris en charge en centre de rééducation et sont donc exposés à des complications motrices, cardiovasculaires et métaboliques, affectant leur indépendance sur le long terme.

Un hydrogel thermosensible (liquide à température ambiante qui se solidifie pour former un gel à température corporelle) non toxique, biodégradable, a été mis au point et après injection sur le site de l'AVC, est capable de libérer des molécules protectrices de manière prolongée, et ce, directement sur le site de la lésion : il est attendu plus d'efficacité, et moins de toxicité.

L'objectif de ce projet est d'évaluer, dans un modèle d'ischémie cérébrale focale transitoire par occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne (MCAO) chez le rat femelle d'âge médian, une stratégie innovante consistant à injecter par stéréotaxie dans le cerveau un hydrogel capable de

libérer localement et de manière prolongée un agent neuroprotecteur (apeline) dont il a été préalablement chargé.

L'imagerie isotopique consiste à injecter à l'animal une molécule radiomarquée (radiotracteur) capable de se fixer spécifiquement sur une ou plusieurs régions de l'organisme (des cellules tumorales, des zones de nécroses ou encore des zones d'inflammation). L'animal est ensuite placé sous une caméra capable de détecter la radioactivité qui crée une image 3D de la localisation du radiotracteur dans l'organisme.

Il existe 2 types de caméras pour détecter les radiotraceurs, adaptées aux petits animaux : la microTEP (Tomographie par Emission de Positons) et la microTEMP (Tomographie par Emission Monophotonique) ou scintigraphie. L'imagerie isotopique est généralement associée à un scanner (TDM) qui permet d'avoir une image anatomique. La TEP et la TEMP sont les modalités d'imagerie corps entier les plus sensibles à ce jour et donc les plus appropriées quand il s'agit de détecter et localiser un phénomène moléculaire ou métabolique dont elles permettent une quantification absolue.

La règle des 3R sera respectée dans ce projet :

REMPLACEMENT : il n'existe à l'heure actuelle aucun modèle de substitution in vitro ou in silico pour étudier l'impact à l'échelle systémique de thérapies régénératives. Le rat est un modèle de choix car les adaptations physiologiques au niveau musculaire et cérébral post-AVC sont proches de celles qui sont observées chez l'être humain et parce que le modèle d'ischémie cérébrale est bien documenté et maîtrisé par notre équipe.

REDUCTION : Sur l'ensemble de ce projet, nous utiliserons au maximum 144 rates Sprague Dawley âgées de 6-8 mois (adulte mature). Ce nombre d'animaux a été déterminé par méthodes statistiques afin de réduire au maximum l'effectif nécessaire sans compromettre la validité des expériences qui seront menées. Il tient compte du suivi des 3 groupes et 6 sous-groupes avec 4 radiotraceurs différents et d'une étude immunohistochimique et d'analyse par biologie moléculaire. L'imagerie microTEP et microTEMP permet de suivre un même animal de manière longitudinale, contribuant à hautement réduire le nombre d'animaux nécessaires.

RAFFINEMENT : Au cours de l'étude, les rats seront hébergés par 2 dans des cages enrichies de dômes et copeaux, sur portoir ventilé, dans une pièce avec des cycles de lumière-obscurité de 12h, dont la température et l'hygrométrie sont contrôlées en permanence et avec un accès libre illimité à la nourriture et à l'eau. Le bien-être des animaux sera surveillé quotidiennement par du personnel qualifié ce qui nous permettra d'intervenir immédiatement dès le moindre signe de souffrance pour la prendre en charge. Pour limiter au maximum la souffrance et le stress des animaux, la chirurgie pour l'ischémie cérébrale se fera sous anesthésie et analgésie selon des protocoles internes validés avec notre vétérinaire référent avec une surveillance accrue des animaux jusqu'à leur réveil. La nourriture (humidifiée) sera à disposition de l'animal directement dans la cage après l'ischémie cérébrale. Toutes les imageries seront faites sous anesthésie gazeuse. Le protocole sera arrêté si l'animal présente des difficultés à respirer (visualisées par une augmentation du rythme respiratoire au niveau des flancs de l'animal), si le rat est prostré ou en retrait, si ses poils sont hérissés. Afin d'éviter la souffrance, tout signe et comportement anormal et /ou perte de poids supérieure à 20% du poids initial des animaux, entraîneront l'exclusion de ces derniers, et leur mise à mort sans délai.

19339 Le pancréas est composé d'une part exocrine (cellules produisant les enzymes de la digestion) et d'une part endocrine (les îlots de Langerhans), produisant les hormones de régulation du taux de sucre. Le diabète de type 1 est dû à la destruction des cellules bêta pancréatiques qui produisent l'insuline et qui sont incluses dans les îlots de Langerhans. Son traitement reste l'injection d'insuline, méthode efficace mais imparfaite. De nouvelles stratégies sont nécessaires pour réduire les complications de la maladie. Parmi celles-ci, des stratégies de thérapie cellulaire ont été développées au fil du temps. En 1977, JS Najarian rapporta la première greffe d'îlots. Cette technique est maintenant utilisée de manière reproductible mais comporte des contraintes : le traitement antirejet, la durée de vie limitée des îlots et le faible nombre de donneurs. Une autre approche serait de produire des cellules bêta à partir de cellules souches humaines. Des progrès

ont été accomplis vers la production de telles cellules, mais celles-ci ont un profil immature par rapport à de « vraies » cellules bêta. Un des objectifs du laboratoire est de comprendre les différences entre cellules pancréatiques à différents stades de développement ou les différences entre cellules pancréatiques normales et pathologiques. Des prélèvements de tissus pancréatiques humains ou murins seront ainsi greffés dans le muscle de la cuisse ou sous la capsule rénale d'une souche de souris tolérante pour ce type de greffe. En effet, ces souris ont un système immunitaire déficient ce qui permet à un greffon de se développer sans mécanisme de rejet. L'étude du développement des greffons se fera par analyse clinique, analyse sanguine (test de tolérance au glucose et test de sécrétion d'insuline) et analyse radiologique (échographie, IRM, tomographie par fluorescence). A partir de ce modèle expérimental initial, différentes contraintes de développement sont appliquées à la souris greffée (infusion sous cutanée continue par pompe induisant une insulino-résistance) et le pancréas greffé sera récupéré après mise à mort de la souris.

La méthode de greffe décrite ci-dessus est le seul modèle, à ce jour, qui permet de récapituler les différentes étapes longues du développement pancréatique endocrine in vivo et donc de répondre à des questions comparatives aux modèles murins. Ce modèle permet aussi de maintenir des tissus pancréatiques in vivo et notamment pour réaliser des études dynamiques de pathologie pancréatique. Le préalable reste systématiquement le travail in vitro réalisé dans le laboratoire afin de limiter au maximum les questions posées sur le modèle in vivo et ainsi réduire le nombre d'animaux utilisés. Le projet sera mené en appliquant la règle des 3R :

1/ Remplacement : La culture cellulaire β (cellules produisant l'insuline) permet de tester nos hypothèses mécanistiques mais la complexité du pancréas et des maladies pancréatiques endocrines nécessite l'utilisation d'un modèle animal pour confirmer ou infirmer les hypothèses issues du travail in vitro.

2/ Réduction : Nous utiliserons le nombre optimal d'animaux requis pour obtenir des résultats statistiquement interprétables. 3/ Raffinement : Afin de prévenir au maximum la souffrance et l'angoisse des animaux, les procédures chirurgicales longues sont maîtrisées et se dérouleront sous anesthésie générale avec une surveillance régulière et des antalgiques sont prévus à toutes les étapes pré et post-opératoires. Enfin, des points limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire. Les souris sont ensuite élevées dans un environnement stérile, sans besoin d'isolement et avec des soins quotidiens attentifs et adéquats pour vérifier la bonne cicatrisation et le bon développement, dans une cage enrichie selon les recommandations (coton, modules de jeu, congénères).

Ce projet s'inscrit sur une durée de 5ans. Le nombre de souris utilisées sera de 405 souris. A terme, les résultats de ce projet permettront de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le développement et la pathologie du pancréas endocrine humain et aider au développement de cellules productrices d'insuline humaine en laboratoire. Ils pourraient également permettre l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et ainsi aboutir à une meilleure prise en charge des pathologies du pancréas endocrine.

19340 La douleur est un sujet majeur de société nécessitant le développement permanent de nouveaux antalgiques. Cependant, l'utilisation de ces antalgiques est souvent associée à de nombreux effets secondaires. De plus, une utilisation abusive s'est développée ces dernières années dans l'utilisation des opiacés mettant à jour une crise appelée « crise des opioïdes ». Sur les plus de 60 000 décès par overdose d'opioïdes survenus aux États-Unis en 2017, près de 30 000 étaient liés au fentanyl. Les opioïdes sont largement utilisés comme médicaments thérapeutiques pour soulager des douleurs d'origines diverses. L'utilisation thérapeutique à court terme des opioïdes n'entraîne généralement pas de complications graves pour la santé, mais les opioïdes utilisés à des doses plus élevées ont un certain nombre d'effets secondaires, notamment la sédation, l'inhibition de l'activité gastro-intestinale et la dépression respiratoire.

L'objectif de ce projet est de mettre au point un ensemble de tests pertinents permettant l'évaluation de ces effets secondaires. Dans cet ensemble, seront évalués certains effets secondaires les plus

fréquemment observés après une prise abusive d'opioïdes tels que la détresse respiratoire, la sédation, la réduction de la mobilité intestinale...

Si aucun modèle animal ne peut reproduire parfaitement la complexité de la physiologie humaine, des critères pertinents dans l'évaluation des effets secondaires d'un candidat médicament peuvent être définis. Si les animaux sont incapables d'auto-évaluation, leurs comportements en réponse à des molécules pharmacologiques peuvent être étudiés de façon fiable et objectivement quantifiés.

Ce projet s'inscrit dans le respect de la règle des « 3R » pour l'expérimentation animale. Si des méthodes alternatives existent lors des phases précoces de développement d'une molécule (modélisation informatique, ingénierie tissulaire, cellules souches), l'avancement de la caractérisation de la molécule d'intérêt ne permet pas à l'heure actuelle de remplacer l'étude de son efficacité chez l'animal vigile. Pour la société, les progrès méthodologiques et technologiques couplés aux avancées de la connaissance scientifique permettent d'une part de raffiner les modèles animaux existants et d'autre part de développer et proposer des modèles in vivo toujours plus proches des situations cliniques (induction de pathologies, mesures des composantes multiples de la douleur). Le raffinement passe également par la réduction autant que possible de la souffrance et du stress des animaux et l'amélioration de leur bien-être. Ce projet implique l'utilisation d'une nouvelle technologie non invasive, constituée d'un gilet télémétrique évaluant les paramètres cardio-vasculaires et respiratoires de l'animal. Ce dispositif a pour objectif dans ce projet, d'obtenir une mesure plus objective de la douleur et s'inscrit donc dans la démarche « 3R » avec pour finalité la réduction du nombre d'animaux et le raffinement des conditions expérimentales.

Enfin, pour chaque étude, le nombre de rats utilisés est réduit à un minimum acceptable pour l'obtention d'informations robustes et statistiquement pertinentes. Dans le cadre de ce projet de R&D (2ans) le nombre de rats est détaillé dans chaque procédure pour un total d'animaux utilisés de 369.

19341 La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est une maladie fréquente et grave où le poumon est progressivement remplacé par une cicatrice rigide et n'assurant pas les échanges gazeux.

Une famille de cellules appelées fibroblastes joue un rôle de premier plan dans le développement de la fibrose. Nos travaux préalables réalisés in vitro et à partir de prélèvements humains suggèrent qu'une protéine appelée ici CIBLE joue un rôle majeur dans l'activation des fibroblastes dans cette maladie.

L'objectif principal de ce projet est de faire la preuve que la diminution de l'expression pulmonaire de CIBLE protège du développement de la fibrose pulmonaire induite par l'administration dans le poumon de bléomycine, un médicament anticancéreux, chez la souris. L'expression de CIBLE dans le poumon sera réprimée par l'administration, par voie intrapéritonéale et sous forme d'aérosols inhalés, d'un médicament innovant composé de nanoparticules, ou nanomédicament.

Les objectifs secondaires seront 1) de comparer l'effet de la voie aérosolisée à la voie injectable, 2) de comparer l'effet du nanomédicament à celui d'un traitement de référence de la FPI, le nintedanib, 3) de préciser les mécanismes par lesquels le nanomédicament protège du développement de la fibrose, et 4) de valider l'effet antifibrosant du nanomédicament dans un autre modèle de fibrose pulmonaire, induite par l'exposition aux rayons X.

Ces résultats permettront de tester une nouvelle famille de traitements, applicables à la fibrose pulmonaire idiopathique mais aussi à de nombreuses autres maladies fibrosantes atteignant d'autres organes.

Le nombre total de souris nécessaires pour mener à bien ce projet est de 600.

Les expérimentations ont été planifiées selon la règle des « 3R ». Remplacer : les modèles in vitro ne permettent pas de modéliser un organisme entier, par conséquent des modèles animaux sont nécessaires pour faire la preuve d'une nouvelle thérapeutique. Réduire : les expériences ont été planifiées dans un ordre précis pour réduire le nombre d'animaux. Le nombre d'animaux pour obtenir des résultats robustes a été calculé en fonction des tests statistiques utilisés et de la survie attendue des animaux. Raffiner : Les administrations par voie trachéale seront réalisées sous anesthésie générale. Les animaux seront élevés en communauté dans des cages enrichies par la

présence de boîtes à oeufs, et surveillés quotidiennement. Les animaux sont euthanasiés à la fin de l'expérience. Les prélèvements sont effectués après la mort de l'animal.

19342 La recherche thérapeutique translationnelle développée au sein de notre unité nécessite différents modèles expérimentaux préclinique chez la Souris principalement et le Rat. Notre unité est spécialisée dans le développement de nouvelles approches thérapeutiques chimiques et biologiques dans le traitement des conflits inflammatoires en transplantation, maladies inflammatoires et auto-immunes, et dans le cancer, ainsi que dans le traitement de différentes pathologies néoplasiques, de la tumeur solide aux leucémies. Le développement de ces approches nous amène à leur évaluation dans des modèles simples de culture cellulaire par exemple, puis dans des modèles plus complexes permettant de reproduire un environnement biologique au plus près de la condition réelle (l'Homme).

Nous avons ainsi développé différents modèles et utilisons des modèles communs comme les modèles d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), d'arthrite, de maladies chroniques de l'intestin, de transfusion, d'inflammation cutanée et pulmonaire ou encore des modèles de sepsis. Les modèles de transplantation sont des modèles basés sur la greffe de cellules hématopoïétiques, des approches de greffe de peau ou d'artériole. Enfin les modèles expérimentaux de cancérogénèse sont des modèles de greffe de tumeurs murines ou humaines comme les leucémies T et B, différentes lignées de cancer du côlon, du sein, de mélanomes, ou du pancréas. Ces différents modèles sont réalisés à l'aide d'animaux sauvages ou transgéniques permettant d'adresser en particulier un mécanisme d'action, ou encore à l'aide d'animaux immuno-déficients ou encore humanisés permettant d'adresser des approches thérapeutiques avec des produits biologiques humains. Notre recherche devrait nécessiter dans les 5 années à venir 123 550 rongeurs (Souris et rats).

Ces modèles sont pratiqués depuis plusieurs années au sein du Laboratoire et ont bénéficiés au cours des années passées de nombreuses améliorations notamment en termes de technicité et de prise en compte de la douleur et de la réduction du nombre d'animaux. Cette expertise nous permet le respect de la règle des 3R. Nous avons par exemple pu mettre en place des techniques (Préhension optimisée), de l'enrichissement (Pulpe de bois) et du matériel permettant une anesthésie et une euthanasie gazeuse et contrôlée des animaux, d'utiliser des médicaments (Sous certaines conditions de non interaction avec l'expérience) d'analgésiques et/ou anti-inflammatoires pour limiter la douleur post-interventionnelle ou encore des tapis chauffant à sonde rectale permettant le maintien de la température corporelle lors d'anesthésie prolongée. De plus, notre expérience dans certains modèles nous permet une homogénéité et répétabilité des modèles permettant la réduction du nombre d'animaux des groupes contrôles, par exemple. Enfin, les technologies actuelles (Comme la culture cellulaire sphéroïde ou d'organoïdes) maintenant disponibles au Laboratoire, nous permettent de nous passer de certains modèles.

19343 La sclérose en plaques (SEP) est une maladie auto-immune affectant le système nerveux central (SNC, comprenant le cerveau et la moëlle épinière). Dans une maladie auto-immune, le système immunitaire se dérègle et attaque l'organisme. Dans le cas de la SEP, le système immunitaire attaque la gaine de myéline qui entoure les fibres nerveuses et permet la transmission des messages nerveux. Les lésions dans la gaine de myéline entraînent des troubles moteurs (fonctionnement des membres), sensitifs (fonctionnement des sens) et cognitifs (fonctionnement mental, mémoire, apprentissages). Cette maladie touche plus de 2,3 millions de personnes dans le monde, avec environ 5000 nouveaux cas diagnostiqués en France chaque année.

Il existe plusieurs formes cliniques de la SEP, catégorisées selon la progression et l'aggravation des attaques et de l'altération des fonctions neurologiques. La première forme, la plus courante, est la forme récurrente-rémittente avec poussées (RR-SEP) qui concerne 80% des patients au début de la maladie. La deuxième forme est dite progressive primaire. Cette forme concerne 20% des patients avec une évolution de la maladie irréversible se traduisant principalement par des atteintes motrices. La forme RR-SEP évolue parfois vers une forme dite secondaire progressive. Dans ce cas, le handicap des patients s'accroît lentement et de façon irréversible. Ces deux dernières formes

sont dites chroniques. Les patients atteints de SEP ont une qualité de vie extrêmement altérée selon l'intensité et la fréquence des poussées.

A ce jour, les traitements disponibles sont dédiés à la forme RR-SEP et permettent de réduire les signes cliniques en bloquant l'inflammation. Ces traitements ralentissent la progression de la maladie, mais leur efficacité est limitée. Il n'existe pas de traitement efficace contre les formes chroniques de SEP. La découverte des cellules T régulatrices (Treg) a permis d'initier de nouvelles stratégies thérapeutiques, particulièrement pour les formes chroniques de SEP.

Il existe de nombreux modèles expérimentaux chez l'animal, comme par exemple l'Encéphalite Auto-immune Expérimentale (EAE) induite chez la souris. Dans ces modèles, les souris présentent une paralysie progressive des membres arrière puis des membres avant, accompagnés de la destruction de la gaine de myéline (démýélinisation). Les souris développent donc les signes d'atteintes neurologiques qui ressemblent aux signes cliniques de la SEP chronique chez l'humain (difficultés motrices). Pour limiter l'inconfort de ces animaux, un accès facilité à la nourriture et à l'eau est prévu (croquettes humidifiées et gel hydrique) dès l'apparition des symptômes de l'EAE. Dans ces modèles expérimentaux, il a été montré que ces cellules Treg étaient capables de réduire l'inflammation. De plus, il a également été démontré que les Tregs étaient capables de stimuler les processus de remýélinisation (réparation des lésions de la myéline), réduisant ainsi le nombre de lésions au niveau du SNC. Nous mettrons en place ces modèles expérimentaux dans deux souches de souris à phénotype non-dommageable (C57BL/6 ou ABH Biozzi) et 2 souches de souris à phénotype dommageable (SJL/J et NSG).

Afin de rendre cette approche encore plus efficace, nous avons décidé de modifier génétiquement les cellules T régulatrices. Notre objectif est que ces cellules Treg génétiquement modifiées puissent agir de manière spécifique et locale au niveau du SNC. Nous espérons que ce ciblage précis de l'activité des cellules Treg permettra de réduire leur toxicité potentielle.

Afin d'obtenir les données précliniques demandées par les autorités sanitaires avant d'entrer en phase de test chez l'humain, nous testerons cette nouvelle thérapie cellulaire dans les modèles d'EAE chez la souris. Le projet consiste donc à évaluer le bénéfice thérapeutique des Tregs génétiquement modifiés ainsi que leur distribution et éventuelle toxicité. Les règles d'expérimentation sont comme suit : (remplacer) : l'emploi des modèles in vivo est nécessaire au projet car il n'existe pas à l'heure actuelle de méthodes alternatives permettant de reproduire in vitro la complexité des mécanismes immunologiques mis en place lors des maladies inflammatoires du SNC. (Raffinement) : Nous veillerons à optimiser les conditions d'hébergement pour limiter l'inconfort des animaux souffrant de paralysie des membres. Un accès facilité à la nourriture et à l'eau est prévu (croquettes humidifiées et gel hydrique) dès l'apparition d'animaux affaiblis et de paralysie. Dans une approche éthique, nous prévoyons de limiter au maximum le nombre d'animaux avec des scores cliniques sévères et mettre en place des points limites adaptés. Pour les actes de prélèvement invasifs comme les prélèvements sanguins, nous utiliserons un anesthésique local pour limiter la douleur. (Réduction) : afin de réduire le nombre d'animaux utilisé, chaque groupe contiendra le nombre de souris minimum indispensable à l'obtention de résultats statistiquement significatifs. Notre stratégie expérimentale est choisie pour réduire le nombre d'animaux malades en choisissant une souche de souris sensible à l'induction de l'EAE. De plus, seuls les Tregs génétiquement modifiés montrant l'activité désirée in vitro seront testés in vivo afin de réduire le nombre de souris utilisé. Un nombre total de 6284 souris sera nécessaire.

19344 Résumé :

La plupart des vaccins efficaces reposent sur la formation d'une mémoire immunitaire basée sur les lymphocytes B et les anticorps protecteurs qu'ils fournissent.

De façon surprenante, la vaccination est un processus essentiellement empirique et les paramètres qui conditionnent une réponse efficace lors d'un rappel vaccinal sont très mal connus. Nous souhaitons donc étudier l'impact du calendrier de vaccination (délai entre l'immunisation et le rappel), de l'utilisation de différents adjuvants et de la nature des antigènes utilisés (pathogènes

entiers inactivés vs. protéines purifiées) sur la réponse des cellules mémoires B lors d'un rappel vaccinal.

Ce projet, qui vise à mieux comprendre les conditions de l'efficacité des vaccins, impliquera des injections d'antigènes (intrapéritonéales, sous-cutanées ou intramusculaires), le sacrifice des animaux à différents temps après immunisation (euthanasie par CO₂) et le prélèvement d'organes lymphoïdes pour analyse de la réponse. 500 animaux seront utilisés pour former les différentes cohortes.

Cet amendement concerne 2 nouvelles procédures, afin d'étudier le rôle de la nature des éléments présents dans le vaccin (protéines contre bactéries inactivées) dans le contexte de la vaccination contre la coqueluche. Nous comparerons l'efficacité d'un rappel avec le même vaccin (par exemple, un rappel protéique après une vaccination protéique) ou avec des vaccins différents (par exemple bactéries puis protéines) sur la qualité et la durée de la mémoire immunitaire ; dans une deuxième procédure additionnelle, des expériences de transfert de cellules permettront d'évaluer l'impact des lymphocytes T dans la qualité des réponses obtenues dans ces différents contextes.

Cet amendement impliquera 280 animaux soit, au total, 780 souris (500 de la demande précédente et 280 pour l'amendement).

Ces expériences seront menées dans le cadre des 3R :

- Remplacement : la réponse immunitaire implique des interactions cellulaires complexes qui ne peuvent être étudiées que sur l'animal entier.

- Réduction : Le modèle de souris utilisé (marquage fluorescent des cellules engagées dans la réponse immune) est extrêmement sensible et permet le suivi de la réponse à l'échelle de l'animal individuel, sans avoir à pooler les cellules lymphoïdes de plusieurs animaux pour obtenir une réponse détectable. De plus, notre expérience de la variabilité de la réponse immune dans le modèle murin étudié nous permet d'anticiper le nombre minimum d'animaux requis pour obtenir des résultats significatifs sur des comparaisons multiples (tests Anova).

- Raffinement : les expériences sur la mémoire immunitaire nécessitent d'étudier les animaux sur des périodes de plusieurs mois, et donc de porter une attention particulière à l'enrichissement du milieu (coton, maisonnettes, bâtons à ronger, etc.). Les procédures ne créent pas de pathologies spécifiques et se feront avec une analgésie préalable, pour l'injection sous-cutanée des vaccins ou l'injection intraveineuse des cellules, avec un suivi post-injection. Des points limites sont définis pour le suivi des animaux, qui seront mis à mort en cas d'atteinte de ceux-ci.

A terme, ce projet doit permettre de mieux définir les conditions d'une réponse immunitaire durable, efficace et capable de s'adapter à la diversité des infections.

19345 L'État de Stress Post-Traumatique (ESPT ou PTSD, pour Post-Traumatic Stress Disorder, APA 1994) est une pathologie psychiatrique qui touche 8 à 12% de la population générale.

Le PTSD se caractérise par une constellation de symptômes qui surviennent après l'expérience d'un événement traumatique pouvant être léthal, causer une blessure grave ou menacer l'intégrité physique. Ce traumatisme va provoquer une réaction de peur intense, un sentiment d'impuissance ou d'horreur. La symptomatologie du PTSD se définit alors par un syndrome de reviviscence traumatique, un évitement et émoussement affectif et une activation neurovégétative.

L'efficacité des thérapies pharmacologiques (antidépresseurs) ou psycho-cognitive reste cependant relative et limitée. L'amélioration de l'arsenal thérapeutique dans le traitement du PTSD représente donc un enjeu de santé publique majeur. Ces dernières années, les techniques de neurostimulation sont en train d'émerger. Au laboratoire, nous avons mis au point le traitement par Stimulation Transcrânienne Ultrasonore répétée (rTUS) du cortex infralimbique dans le traitement de la dépression. C'est une technique qui offre l'avantage d'être non-invasive

L'objectif de cette étude sera de tester l'efficacité d'une stimulation rTUS du cortex infralimbique dans le traitement du PTSD et de comparer ces effets à ceux d'un traitement chronique avec un antidépresseur.

Pour cette expérience, 120 souris seront réparties en 8 lots expérimentaux de 15 souris mâles

En application de la règle des 3 R au modèle utilisé dans cette étude :

Raffinement : le stress traumatique appliqué aux animaux, deux chocs électriques de 2sec à 1.5 mA dans un contexte inconnu, peut être qualifié de moyen, en raison de sa brièveté. Les conditions d'élevage des animaux seront optimales au regard des normes en vigueur. Tous les animaux seront hébergés ensemble, stressés et non stressés, avec enrichissement du milieu (cabanes, smarthome® et tubes). Les expérimentateurs sont experts dans la préhension/contention des souris et sont soucieux d'éviter tout stress lors de la réalisation des procédures. Les injections quotidiennes d'antidépresseur ont été remplacées par un traitement dans l'eau de boisson. Pendant la stimulation rTUS, les animaux sont sous anesthésie gazeuse, ils sont placés sur une couverture chauffante pour éviter toute hypothermie et leurs cornées sont protégées de la déshydratation par un gel.

Remplacement : aucune méthode alternative in vitro n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée. Le PTSD chez l'animal, comme modèle de pathologie psychiatrique humaine, repose sur l'observation du comportement de l'animal vivant.

Réduction : les effectifs sont optimisés, les observations comportementales nécessitent une taille d'effectifs suffisant compte tenu de la variabilité inter-individuelle (n=15 sujets par groupe). Les souris seront uniquement mâles, afin d'éviter les variations comportementales provoquées par le cycle menstruel de la femelle et ainsi réduire le nombre total d'animaux.

19346 Le syndrome de Meier-Gorlin (MGS) est une maladie rare (1 naissance sur 1000000) caractérisée par un défaut de croissance in utero et post-natal aboutissant à une petite taille, de petites oreilles et à de petites rotules ou leur absence. A cette triade clinique s'ajoute un large spectre d'autres anomalies, notamment cardiaques. Ce syndrome a été décrit pour la première fois en 1959 mais ce n'est qu'en 2011 qu'en sont identifiées les causes moléculaires, ce qui a permis le diagnostic moléculaire d'une centaine de patients dans le monde, dont 28 en France. Des mutations dans les gènes codant pour des protéines impliquées dans le processus de duplication de l'ADN sont à l'origine de ce syndrome. Parmi ces mutations certaines sont plus fréquentes. Une mutation génétique particulière entraîne un défaut de fonctionnement et de formation du cœur chez la souris, qui mime un signe clinique observé chez des patients atteints du syndrome. Il apparaît donc nécessaire de mieux comprendre les conséquences phénotypiques de cette mutation dans le modèle in vivo, qui récapitule des défauts chez les patients, et plus particulièrement les conséquences au niveau cardiaque. Dans ce cadre, les objectifs du projet sont 1) de mieux comprendre les conséquences sur l'évolution et les modifications anatomiques et fonctionnelles du cœur, et 2) les conséquences biologiques, cellulaires et moléculaires de la mutation, dans des études à court et long terme en utilisant un modèle murin codant la protéine mutée. Sur une période de 5 ans, 528 animaux seront nécessaires de manière à étudier la biologie cardiaque dans des conditions normales et dans des conditions de test à l'effort par injection d'une molécule qui stimule les récepteurs adrénergiques cardiaques. Pour cela nous utiliserons une technique non invasive, la technique d'échographie, sur des animaux placés sous anesthésie générale.

Ce projet sera mené dans le respect des règles des 3R :

Réduction : les analyses sont réalisées par une technique non invasive, l'échographie cardiaque sur des animaux placés sous anesthésie générale, qui permet de réduire significativement le nombre d'animaux utiles pour l'étude longitudinale. A partir d'une première analyse phénotypique, nous avons estimé le nombre optimal d'animaux par lot permettant de réaliser des tests statistiques fiables et obtenir des résultats scientifiques robustes.

Raffinement : Tous les animaux seront surveillés quotidiennement et seront maintenus en groupes sociaux. Le milieu sera enrichi par des tubes de carton. Plusieurs points limites sont mis en place dans le but d'identifier une éventuelle souffrance des animaux et de les mettre à mort de manière anticipée si nécessaire.

Remplacement : Les modèles cellulaires ne permettant pas de récapituler les processus impliqués dans la morphogenèse cardiaque, les chronologies des processus développementaux et les interactions des cellules cardiaques avec leur environnement et les autres tissus, le recours à l'animal est nécessaire.

La réalisation de ce projet permettra de mieux comprendre l'altération des mécanismes mis en jeu dans le développement et la fonction du cœur, et permettra d'apporter un éclairage nouveau sur l'origine des signes cliniques des patients atteints de MGS.

19347 Notre capacité à mesurer l'activité neuronale in vivo permet d'améliorer considérablement notre compréhension du cerveau. Un nouveau système d'imagerie ultra miniaturisé et portatif nous permet aujourd'hui de visualiser l'activité de centaines de neurones individuellement pendant la réalisation d'une tâche comportementale chez la souris.

L'objectif de cette étude est dans un premier temps la mise en place et la validation d'un protocole avec ce système pour l'observation de l'activité neuronale dans une zone du cerveau (le cortex infralimbique, CIL) de souris en utilisant un indicateur calcique apporté par injection d'un vecteur viral. Ces protocoles, une fois validés par ce premier volet, serviront de base à la seconde étape consistant à étudier les mécanismes sous-jacents.

Dans ce premier volet, 40 souris adultes (mâles et femelles) maximum seront utilisées. En effet dès que les procédés (expression de l'indicateur calcique, implantation et enregistrement de l'activité neuronale) seront réalisés avec succès de manière répétée (4 enregistrements successifs réussis dans chacune des stratégies), la technique sera considérée comme acquise et validée, et l'exploration des mécanismes pourra commencer.

La technique ayant déjà été mise en place précédemment pour une région différente dans le laboratoire, nous sommes confiants de pouvoir passer relativement rapidement au second volet qui consiste en l'étude des mécanismes neuronaux d'une nouvelle approche thérapeutique pour le stress post-traumatique, les stimulations crâniennes ultrasonores répétées (rTUS).

L'État de Stress Post-Traumatique (ESPT ou PTSD, pour Post-Traumatic Stress Disorder, APA 1994) est une pathologie psychiatrique qui touche 8 à 12% de la population générale et qui se caractérise par un ensemble de symptômes qui surviennent après l'expérience d'un événement traumatique comme un attentat par exemple. Ce traumatisme va provoquer une réaction de peur intense, un sentiment d'impuissance ou d'horreur. La symptomatologie du PTSD apparaît au bout de quelques mois, et se caractérise par un syndrome de reviviscence traumatique, des stratégies d'évitement, un émoussement affectif et une activation neurovégétative. De manière importante, le PTSD affecte différemment les personnes selon le sexe : les femmes sont en général plus touchées, certaines études rapportant jusqu'à deux fois plus de chance pour une femme de développer cette maladie. Il est donc capital de prendre le facteur du sexe des individus en compte lors de l'élaboration de nouveaux protocoles thérapeutiques, afin de pouvoir identifier et cibler de potentielles différences dans la réponse au traitement.

L'efficacité des thérapies pharmacologiques (antidépresseurs) ou psycho-cognitives reste cependant limitée. L'amélioration de l'arsenal thérapeutique dans le traitement du PTSD représente donc un enjeu de santé publique majeur. Ces dernières années, les techniques de neurostimulation ont émergé comme nouvelles options de traitement. Au laboratoire, nous avons mis au point le traitement par rTUS du CIL dans le traitement de la dépression et sommes en train de faire de même pour le PTSD. C'est une technique qui offre l'avantage d'être non-invasive mais dont l'efficacité à long terme et les mécanismes sous-jacents demeurent inconnus.

Dans un second temps, nous étudierons donc l'efficacité et l'impact à long terme d'une stimulation rTUS du CIL dans le traitement du PTSD à travers l'analyse de l'activité neuronale à l'échelle cellulaire. Pour cette expérience, 120 souris adultes réparties en 4 lots expérimentaux de 30 souris, mâles et femelles en proportions égales par groupe, soit un total de 160 souris pour les deux phases.

Raffinement : les populations neuronales ciblées par cette méthode sont très spécifiques. Les conditions d'élevage des animaux seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu (cabanes plexiglass et cartons, tubes). Les interventions chirurgicales se feront sous anesthésie générale par des chercheurs formés et expérimentés. Les animaux recevront un traitement analgésique avant l'intervention, un traitement anti-inflammatoire après l'intervention et 24 heures après. Si nécessaire un traitement antibiotique sera administré. Chaque

animal est placé sur une couverture thermorégulée pour éviter toute hypothermie. Les cornées sont protégées de la déshydratation. L'anesthésie gazeuse est ici privilégiée pour mieux contrôler la profondeur d'anesthésie et pour une meilleure récupération post-opératoire. Une surveillance post-opératoire d'une semaine est réalisée pour suivre chaque souris et intervenir si nécessaire.

Le modèle de PTSD appliqué aux animaux peut être qualifié d'intensité moyenne, en raison de sa brièveté. Les expérimentateurs sont experts dans la préhension et la contention des souris, et sont soucieux d'éviter tout stress inutile lors de la réalisation des procédures. Pendant la stimulation rTUS, les animaux sont sous anesthésie gazeuse, ils sont placés sur une couverture chauffante pour éviter toute hypothermie et leurs cornées sont protégées de la déshydratation par un gel.

Remplacement : aucune méthode alternative in vitro n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée.

Réduction : Lors du premier volet de mise en place de la technique, 40 souris (mâles et femelles) maximum seront utilisées pour la phase de test. Les effectifs sont optimisés pour la mise en place d'un nouveau protocole (pas de test statistique). En effet dès que le procédé (expression de l'indicateur calcique, implantation et enregistrement de l'activité neuronal) sera réalisé avec réussite de manière répétée (critère: 4 enregistrements successifs réussis dans chacune des stratégies et au moins 6 souris enregistrées par stratégie), le procédé et la technique seront considérés comme acquis et validés et nous passerons à la phase suivante sans utiliser la totalité de 40 souris. Les animaux seront commandés progressivement par lots de 5 à 10, afin d'éviter que certains animaux ne soient pas utilisés.

Pour la seconde partie d'étude des mécanismes, les effectifs sont optimisés, les observations comportementales corrélées à l'activité comportementale nécessitent une taille d'effectifs suffisante compte tenu de la variabilité inter-individuelle (n=30 sujets par groupe mâles et femelles, en considérant également le taux de succès des chirurgies estimé de 40 à 50%).

19348 L'objectif de ce projet est de rechercher une éventuelle accumulation de gadolinium dans l'organisme suite à des administrations répétées de produits de contraste (chélates de gadolinium), lors d'examen IRM et l'éventuelle toxicité associée.

Plusieurs publications et notamment celle de Kanda et al [Radiology 2014] mettent en évidence chez l'homme des zones d'hypersignal dans des régions du cerveau visibles par IRM suite à des injections multiples de produits de contraste gadolinés. De manière générale, la biodistribution à long terme des chélates de gadolinium dans l'ensemble de l'organisme est un sujet d'investigation continu [Lancelot et al, Invest Radiol 2016].

Afin de répondre aux interrogations que soulèvent ces publications et aux questions posées par les autorités de santé, nous proposons un projet préclinique pour :

- Mettre en évidence chez l'animal des hypersignaux en IRM liés à l'accumulation de Gd
- Démontrer le lien entre les zones d'hypersignal observées en IRM et l'accumulation de gadolinium dans ces mêmes structures.
- Etudier si la rétention de Gadolinium est liée, ou non, à la structure des produits
- Etudier le mécanisme impliqué.
- Rechercher une éventuelle toxicité

Les espèces Rat et Souris ont été choisies car ce sont des espèces de référence pour toutes les études de toxicité exploratoire, qui permettent facilement une imagerie par résonance Magnétique.

Le nombre global de rongeurs sur les 5 années du projet est de 1900 (200 souris et 1700 rats), de façon à évaluer le risque de chacun des produits de contraste à base de gadolinium présents sur le marché, de décrire le mécanisme d'accumulation du gadolinium et la potentielle toxicité liée à sa présence.

Les procédures expérimentales mises en œuvre au cours de ce projet seront réalisées sous analgésie et anesthésie, gazeuse ou chimique (excepté pour certaines injections intraveineuses). Elles seront menées dans le respect des guidelines des instances telles que le Gircor ou bien ou des textes de références sur les volumes et les conditions d'injection (Dhiel et al Journal of Applied

Toxicology, 2001). Les mêmes animaux serviront pour répondre à plusieurs questions scientifiques (imagerie, comportement, dosages, études histologiques) afin de limiter le nombre total d'animaux.

19349 Le but de cette étude chez la souris est d'analyser une série de nouveaux vecteurs viraux de thérapie génique quant à leurs capacités à transduire la rétine de souris et à exprimer une protéine reportrice (la Green Fluorescent Protein, GFP) dans les cellules rétinienne. Ces nouveaux vecteurs utilisés en recherche ou en thérapie clinique, dérivés de l'AAV ont été modifiés afin d'améliorer leur efficacité en terme thérapeutique. Ils pourront être utilisés par la suite comme vecteur de thérapie génique dans des pathologies dégénératives de la rétine. Cette étude est réalisée pour le compte d'une société de biotechnologie de stade clinique ayant pour objectif la recherche et le développement de médicaments pour les maladies rétinienne.

Le projet sera réalisé en respect de la règle des 3R : Remplacer, Réduire et Raffiner.

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

Réduction: Le nombre d'animaux utilisés est optimisé pour obtenir des résultats statistiques. Leur nombre : 63 souris a été restreint au minimum indispensable de façon à obtenir des données nécessaires pour valider l'efficacité d'une stratégie thérapeutique innovante qui peut être considérée comme cible dans plusieurs maladies en ophtalmologie. En effet, des travaux précédents ont permis d'établir les doses de vecteur à injecter et les temps d'analyses.

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

19350 Ce projet a pour but principal de caractériser, d'un point de vue comportemental et pharmacologique, la compulsivité à consommer de la nourriture sucrée dans une procédure d'auto-administration.

Pour étudier la compulsivité nous utilisons une procédure qui mime la difficulté à arrêter la consommation malgré des conséquences négatives, l'une des caractéristiques des comportements compulsifs tels que l'addiction. Ainsi ce projet permettra de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans ce comportement compulsif.

Plus spécifiquement, nous voulons étudier comment des manipulations comportementales modulant la motivation pour obtenir la nourriture ou le niveau de stress peuvent altérer la compulsion à consommer de la nourriture sucrée.

Par ailleurs, nous allons étudier si l'administration de produits pharmacologiques qui modulent l'activité des systèmes de neurotransmetteurs, notamment les catécholamines, peuvent altérer la compulsion à consommer de la nourriture sucrée.

Ce projet comporte 7 procédures, qui seront associées ou non, pour étudier le comportement de prise de nourriture, avec modulation aigue ou pharmacologique de l'état émotionnel.

Nous vérifierons en parallèle que les possibles différences observées dans ces comportements de prise de nourriture ne seraient pas liées à des niveaux de stress ou de sensibilité propre à chaque animal.

Dans ce projet, nous avons pris en considération la règle des 3Rs (remplacer, réduire et raffiner). Ce type de recherche, visant à comprendre les bases du comportement peut uniquement être menée sur un animal vivant (remplacer). Nous minimiserons le nombre d'animaux utilisés par des méthodes expérimentales validées et reproductibles. Et nous utiliserons des méthodes statistiques appropriées de type ANOVA qui nous permettront de faire des comparaisons multiples et de limiter

le nombre d'animaux utilisés (réduire). Nous avons calculé que pour cette étude 288 rats seront nécessaires pour obtenir des données analysables statistiquement. Pour améliorer leur bien-être, les animaux seront hébergés avec du matériel d'enrichissement (exemple : boules de coton). L'état des animaux sera régulièrement évalué selon une grille de suivi du bien être animal pendant toute la durée des expériences. (raffiner).

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

19351 Au cours de l'évolution, différentes pressions de sélection ont façonné les systèmes de communication des animaux. Chez de nombreuses espèces, la communication vocale permet de réguler les interactions sociales. Suivant l'espèce considérée, les vocalisations peuvent véhiculer de l'information à propos de l'identité, du sexe, de la motivation et/ou de la qualité de l'émetteur. Jusqu'à présent, les recherches sur la communication vocale chez les oscines (oiseaux chanteurs) se sont principalement focalisées sur les chants des mâles et leur rôle dans la reproduction. Deux types de signaux ont ainsi été historiquement délaissés : les chants des femelles et les cris des individus des deux sexes.

Les objectifs de ce projet, sont : 1) de caractériser les différences interindividuelles et intersexuelles des cris d'une espèce d'oscines, le Canari domestique (*Serinus canaria*) et 2) de tester expérimentalement les fonctions de différents types des cris et leur contexte d'émission, dans des conditions contrôlées de laboratoire. Pour cela, quatre expériences seront mises en place.

La première expérience consistera à étudier le répertoire vocal d'un couple de canaris pendant toute la durée d'un cycle reproducteur, permettant de décrire le plus précisément possible le répertoire vocal des mâles et des femelles du canari domestique afin de mieux comprendre le contexte et les fonctions des différentes vocalisations.

La seconde expérience portera sur les variations interindividuelles et la stabilité des vocalisations spécifique aux femelles (trille de sollicitation à l'accouplement) au cours de différents cycles reproducteurs. Nous chercherons aussi à savoir si ces vocalisations peuvent être un indicateur des qualités reproductrices de l'émettrice.

Troisièmement, bien que les parades soient souvent réciproques, la perception des signaux des femelles par les mâles est encore peu explorée chez les oiseaux chanteurs. Ainsi l'objectif de cette troisième expérience est de tester les préférences des mâles pour des signaux de femelles, et plus précisément les trilles de sollicitations à l'accouplement mentionnées ci-dessus.

Enfin, la dernière expérience aura pour but de vérifier si différents cris du répertoire vocal peuvent contenir une signature individuelle permettant aux individus récepteurs de discriminer l'identité de l'individu émetteur.

Les éléments qui suivent permettent d'éclairer nos démarches expérimentales au regard de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner).

Toutes les expériences nécessitent un contrôle optimal de l'environnement acoustique et c'est pourquoi elles doivent être réalisées en laboratoire pour permettre un enregistrement de qualité et pour ne pas influencer les réponses des sujets testés. Le choix d'une espèce domestiquée comme le canari domestique permet de minimiser le stress lié à la proximité des humains.

En tout, 125 canaris seront utilisés au court de ces quatre expériences ; 50 individus (25 mâles et 25 femelles) seront utilisés pour la première expérience et 25 individus pour chacune des expériences 2 à 4. De précédentes études menées dans notre laboratoire montrent que ce nombre d'individus par expérience, bien qu'insuffisant pour faire des statistiques paramétriques, permet néanmoins d'observer des effets significatifs avec des tests non paramétriques. Par ailleurs, pour chaque expérience un seul lot d'oiseau est utilisé. Ces oiseaux sont placés successivement dans plusieurs situations expérimentales et sont leur propre contrôle d'un point de vue statistique (test pour mesures répétées). Cela évite d'utiliser un lot d'oiseau pour chaque condition expérimentale.

Pour les trois premières expériences, les oiseaux seront placés dans des caissons d'isolement acoustique durant la période de test. Cet isolement acoustique est fréquemment utilisé pour étudier les vocalisations des oiseaux en laboratoire. Pour les expériences 1 et 2, les oiseaux seront placés seuls dans un caisson. Cependant les oiseaux ne seront isolés acoustiquement de leur congénère que quelques heures par jour (3 heures en milieu de matinée). Le reste du temps, les caissons resteront ouverts, permettant aux oiseaux de communiquer (cela ne modifie pas le comportement des oiseaux pendant les tests). Pour l'expérience 1 où les oiseaux seront en couple, le caisson ne sera ouvert que lors de la distribution de la nourriture, de l'eau et de l'entretien des cages ; l'objectif de cette expérience est de caractériser l'ensemble des vocalisations échangées dans un couple, leurs échanges devront être enregistrés durant toute la journée. En revanche, ces oiseaux ne sont pas isolés socialement puisqu'ils sont en couple.

Pour la quatrième expérience, les oiseaux seront isolés socialement mais pas dans un caisson (leurs congénères seront retirés de la pièce). Ils seront privés de nourriture 1h30 avant le début d'une expérience où ils recevront des récompenses alimentaires. Ce temps de privation est minime par rapport à une nuit (16h en hiver, 8h en été) n'a jamais engendré de diminution de la masse corporelle dans de précédentes expériences.

De plus, les expérimentateurs et les animaliers effectueront quotidiennement une inspection visuelle des oiseaux. Tout animal malade ou montrant des signes de fatigue ou de stress dû à l'isolement (prostration, toilettage excessif) sera immédiatement retiré de l'expérience et replacé dans des conditions standards d'hébergement. Après l'expérience, aucun animal ne sera euthanasié ; tous les oiseaux seront replacés dans des conditions d'hébergement standards de l'élevage du laboratoire.

19352 La sérotonine (5-HT) est un neurotransmetteur impliqué dans de nombreuses fonctions physiologiques comme la thermorégulation, le cycle veille-sommeil ou la douleur. Ses altérations sont évoquées dans de nombreuses pathologies telles que la dépression, l'anxiété ou la mort subite du nourrisson.

Les études sur les récepteurs de la 5-HT ont retrouvé 7 familles de récepteurs et de nombreux sous-types, dont le récepteur de sous type 6, récemment identifié. Les études récentes ont montré son implication dans de nombreux processus physiologiques et notamment la régulation de la prise alimentaire et du poids.

Médicalement parlant, l'obésité correspond à un excès de masse grasse et à une modification du tissu graisseux entraînant des inconvénients pour la santé et pouvant réduire l'espérance de vie. C'est pourquoi, le surpoids et l'obésité sont aujourd'hui considérés comme une maladie chronique. Plusieurs facteurs – comportementaux, génétiques et environnementaux – sont impliqués dans le développement et la progression de cette maladie chronique.

Au-delà des mesures hygiéno-diététiques prescrites par les médecins, le soutien par des traitements médicamenteux reste très limité du fait de l'absence de connaissances sur les mécanismes physiopathologiques.

Nous proposons donc d'explorer l'évolution de la densité de récepteurs à la sérotonine de sous-type 6 chez des rats dont l'obésité i) aura été induite par un régime alimentaire riche, ou ii) aura une origine génétique. A l'aide d'une technique d'imagerie nucléaire, la Tomographie par Emission de Positons (TEP), nous pouvons suivre au cours de la croissance pondérale du rat la densité de ce récepteur dans le cerveau via l'injection d'un radiotracer spécifique.

Pour cela, notre projet de recherche appliquée mené sur 24 mois comportera deux procédures de gravité légère réalisées sur 84 RATS au maximum.

Le projet se déroulera en deux temps, avec dans un premier temps une procédure pilote permettant d'explorer la faisabilité du modèle, dans un second temps l'étude expérimentale à proprement dite incluant un groupe contrôle non obèse, un groupe avec obésité induite par un régime gras, et un groupe avec une susceptibilité génétique pour l'obésité.

Remplacement : un modèle animal est nécessaire car nous souhaitons explorer l'évolution de certains récepteurs suite à l'apparition d'une maladie chronique. Une fois la preuve de concept

obtenue chez l'animal, ce projet d'imagerie sera rapidement transférable chez l'Homme en utilisant le même radiotraceur.

Réduction : le nombre d'animaux choisi correspond au minimum acceptable afin d'analyser les données de façon pertinente d'un point de vue statistique. Ce nombre est fonction du nombre d'exams techniquement réalisables par notre équipe. Le suivi longitudinal des rats en imagerie permet de diminuer le nombre utilisé. De plus une procédure préliminaire (procédure 1) est envisagée afin de s'assurer de la faisabilité du projet. En cas de résultats non satisfaisant après cette procédure, le projet pourra être arrêté.

Raffinement : le choix de rats comme modèle repose sur le fait que pour la maladie étudiée (obésité) un modèle robuste et connu est développé. La prise de masse grasse sera contrôlée par imagerie et permettra d'inclure uniquement des animaux avec des caractéristiques d'obésité (moindre variabilité attendue). L'utilisation du tariquidar permet de réaliser ce type d'imagerie chez le rongeur plutôt que chez une autre espèce plus sensible (chat, singe). De plus, l'utilisation de tariquidar évite l'utilisation de ciclosporine, une molécule ayant la même capacité que le tariquidar, mais ayant un effet immunosuppresseur et neurotoxique chez le rat.

Concernant les molécules injectées (radiotraceur et tariquidar), nous n'attendons pas d'effets secondaires. Ces molécules ont déjà été administrées à plusieurs reprises chez le rat dans d'autres études menées par notre équipe ou d'autres centres. Le régime hypercalorique peut avoir des effets secondaires (urines et selles abondantes et nauséabondes, modification du transit intestinal) chez le rat mais le suivi régulier et l'identification de points critiques permettra de stopper le protocole à tout moment en cas d'inconfort pour le rat.

Nous espérons apporter une preuve de concept concernant l'implication des récepteurs de sous-type 6 à la sérotonine dans l'obésité et sa possible translation chez l'Homme, ainsi que la capacité de notre centre à réaliser ce type d'étude longitudinale chez le rongeur à l'aide du tariquidar.

19353 La pathologie dégénérative valvulaire cardiaque est la plus fréquente des pathologies cardiaques dues au vieillissement. Elle constitue la première cause de chirurgie cardiaque. Ses origines sont multiples puisqu'on observe plus de dégénérescence valvulaire chez des malades ayant des facteurs de risque cardiovasculaire (tabac, diabète, dyslipidémie, hypertension) ou des pathologies ayant provoqué des lésions initiatrices de dégradation secondaire (endocardite, rhumatisme articulaire). Un certain contingent de malades développe ce genre de problème de manière anormalement précoce et on a pu identifier des facteurs génétiques à l'origine d'une anomalie de la structure géométrique de la valve. Dans tous les cas, il n'exista à ce jour aucun traitement médicamenteux permettant de ralentir ce processus dégénératif. Un des problèmes provient de l'absence de modèle expérimental de valvulopathie spontanée. Dans un travail précédent, nous avons pu montrer, par une caractérisation histologique, qu'une souche de souris présente spontanément une valvulopathie mitrale dégénérative. Avant ce travail nous ne connaissions qu'un seul « modèle » spontané, chez le chien, puisque certaines petites races (Cavalier King Charles, Lassa Apso, Yorkshire) développent spontanément une atteinte mitrale qui peut être extrêmement sévère. Dans un objectif de complément de caractérisation de ce modèle visant à pouvoir par la suite l'utiliser pour tester de nouvelles approches pharmacologiques, nous réaliserons dans le présent travail une étude échocardiographique à différents temps et l'activité plaquettaire de cette souche de souris

Dans le cadre de la règle des 3 R :

Réduire : le suivi échographique nous permettra de caractériser les lésions à l'âge de 24 semaines et à 54 semaines ce qui nous permettra d'effectuer un suivi échographique longitudinal évitant l'euthanasie d'animaux aux différents points de mesure pour des analyses histologiques. Dans ce projet, seulement deux groupes de 10 souris chacun seront étudiés.

Remplacer : nous avons déjà établi un modèle in vitro sur culture de cellules valvulaires porcines mais les approches que nous voulons réaliser nécessitent d'étudier in vivo le fonctionnement et le remodelage de la valve.

Raffiner : Afin de respecter la notion de raffinement, le bien-être de nos animaux sera pris en compte tout au long de l'étude. Pour cela un suivi quotidien sera réalisé par le personnel de l'animalerie et un enrichissement des cages sera proposé à l'aide de nids afin de réduire le stress et satisfaire les instincts naturels de la souris. Les souris seront hébergées en cages ventilées et suivies quotidiennement pour détecter d'éventuels signes cliniques.

Durant les procédures expérimentales, tous les efforts seront entrepris pour minimiser le stress encouru, pour limiter la douleur et la contrainte qu'elles imposeront aux animaux. Les souris seront anesthésiées avec une anesthésie gazeuse très légère (type isoflurane) le temps de l'expérience. Elles seront mises dans leur cage et sur une plaque chauffante le temps de récupération après la manipulation.

19354 La pathologie ischémique cardiovasculaire est un enjeu de santé publique bien connu car représentant une des principales causes de décès des maladies cardiovasculaires. Un événement ischémique apparaît suite à l'obstruction d'une des artères qui irrigue le muscle cardiaque, entraînant la lésion des tissus et une modification de la fonction cardiaque. Un diagnostic précis de ce syndrome est indispensable car les patients hospitalisés en urgence puis libérés de façon inappropriés représentent un groupe à haut risque, avec un taux de complications fatales ou potentiellement mortelles allant jusqu'à 26 %. Il devient donc essentiel de détecter le plus précocement possible la survenue d'un événement ischémique afin d'en réduire sa morbi-mortalité (impact sur la qualité de vie et l'espérance de vie). Actuellement un diagnostic rétrospectif d'un syndrome coronarien aigu bref est guidé par la clinique, dont l'Electrocardiogramme, et le dosage de la troponine dans le sang (protéine marqueur d'une atteinte cardiaque en cas d'augmentation) mais ne sont pas suffisants. D'autres techniques diagnostiques sont donc nécessaires et l'imagerie moléculaire en fait partie.

L'objectif de cette étude est de mettre au point une méthode de diagnostic précoce par imagerie isotopique, imagerie sur la détection d'un tracer radioactif, pour la détection de périodes ischémiques cardiaques. Un polysaccharide (polymère de glucides) radiomarqué est particulièrement étudié. Le radiomarquage de ce polysaccharide est décliné sous plusieurs formes pour être adapté à l'imagerie TEP (Tomographie par Emission de Positron) et l'imagerie TEMP (Tomographie par Emission Mono-Photonique).

Dans ce projet, plusieurs stades d'ischémie vont être étudiés afin d'obtenir des résultats sur un panel varié de conditions physiopathologiques de l'ischémie.

Etablissement de l'ischémie. Suite à l'anesthésie des animaux et un traitement analgésique adéquat, les animaux sont intubés afin de maintenir la fonction respiratoire. Une incision entre les côtes permet d'exposer le versant du cœur sur lequel sera réalisée la ligature (artère coronaire gauche). La ligature est réalisée, elle sera soit permanente, soit retirée après temps défini (5, 10 ou 20 minutes) puis la cavité thoracique puis la peau sont suturées successivement. Une fois l'anesthésie arrêtée et au premiers signes de réveil, l'intubation est retirée. Un programme d'injection d'analgésique est établi sur plusieurs injections à la suite de la chirurgie.

Imagerie. L'imagerie est réalisée sous anesthésie gazeuse dans un lit dédié avec un suivi de la fonction respiratoire comme marqueur de la qualité de l'anesthésie. Les images permettront d'estimer la proportion de produit dans les différents organes de l'animal en corrélation avec des mesures de biodistribution tissulaire ex vivo (méthode de mesure qui consiste à mesurer la quantité de radioactivité dans différents organes après leur prélèvement, méthode considérée plus précise). L'injection du radiotraceur sera réalisée au niveau de la veine du pénis. C'est une voie d'accès facile d'accès et maîtrisée dans notre centre.

Clairance. La mesure de la clairance permet de définir la capacité de l'organisme à éliminer un traceur par dosages répétés du traceur dans le sang. Suite à l'anesthésie des animaux et un traitement analgésique adéquat, un cathéter est placé au niveau de la veine jugulaire pour les prélèvements de sang précoces de l'étude de clairance (de 0 à 180 min post-injection) puis via le sinus rétro-orbitaire (à 6h et 24h post-injection).

Dans ce projet, la règle des 3R, remplacement, réduction et raffinement sera respectée.

Remplacement. L'ischémie cardiaque est un processus complexe faisant intervenir plusieurs phénomènes physiopathologiques et l'étude sur des modèles substitution in vitro ne suffit pour en comprendre les mécanismes. Ce projet s'inscrit dans une perspective de développement clinique chez l'homme, et il est donc indispensable d'avoir des données préliminaires avec un modèle animal. En effet, avant la première injection à l'homme d'un radiotracer, il est requis de déterminer sa biodistribution et sa pertinence clinique (sensibilité, spécificité) chez l'animal, le recours aux modèles murins se faisant en première intention.

Réduction. Pour cette étude nous utiliserons 634 rats mâles adultes sur 5 ans. Ce nombre minimal a été établi au regard des résultats préliminaires et permettra de réaliser avec un nombre minimal d'animaux pour les investigations requises. Pour chaque modalité d'imagerie, la mise au point du radiomarquage et l'évaluation de sa capacité de fixation à un site ayant subi une ischémie nécessite l'utilisation d'animaux sains ou ayant eu l'induction d'une ischémie cardiaque (transitoire ou permanente). L'imagerie in vivo permet un suivi longitudinal et donc un maintien des animaux après l'expérimentation, réduisant le nombre d'animaux utilisés. Les animaux utilisés lors des phases de mise en place de protocole seront réutilisés, si possible, dans le reste de l'étude. Différents groupes seront constitués, un groupe d'animaux sains, un groupe d'animaux avec une ischémie permanente et des groupes avec une ischémie (5, 10 ou 20 minutes)/reperfusion (2h, 6h et 24h).

Raffinement. Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées vont permettre de réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux (anesthésie adaptée pour la chirurgie et l'imagerie, points limites spécifiques surveillés). Les animaux sont hébergés dans un environnement enrichi par du coton ou des morceaux de bois et en leur permettant de vivre en groupe de 2 à 3 individus. Des points limites ont été établis pour ce projet pour éviter toute souffrance de l'animal, l'atteinte des points limites entraînera l'euthanasie de l'animal. L'euthanasie des animaux sera réalisée selon les méthodes approuvées par une personne compétente de l'établissement utilisateur.

Après la réalisation de ce projet et la validation sur animal de l'efficacité de détection précoce d'un événement ischémique par imagerie isotopique TEP et/ou TEMP, la preuve de concept se poursuivra chez l'homme au cours d'essais cliniques.

19355 Ce projet consiste à mettre en évidence le mécanisme d'action d'une nouvelle approche de contrôle du développement de tumeur médié par *Neospora caninum* chez la souris femelle, notamment par l'utilisation d'approches en imagerie in vivo. Ce traitement antitumoral a montré son efficacité dans plusieurs modèles pré-cliniques murins dont le mélanome à métastases pulmonaires lesquels les possibilités thérapeutiques sont encore limitées chez l'humain. Il est donc important de développer de nouvelles approches thérapeutiques pour combler le besoin médical actuel. Le développement d'une thérapie passe nécessairement par l'étude en modèle murin mimant la pathologie dans le but de déterminer ses mécanismes d'action et ses différentes interactions. Les modèles murins sont indispensables en cancérologie car ils permettent une forte reproductibilité du développement de la tumeur en offrant la possibilité de suivre la progression de la tumeur ainsi que l'effet du traitement. Après des premiers résultats encourageants de protection obtenus dans le modèle murin de mélanome à métastase pulmonaire, il est désormais indispensable de déterminer les mécanismes de protection induit par *N. caninum*.

Pour répondre à cette question un maximum de 1260 souris femelle de la lignée C57Bl/6 sera utilisé dans ce projet dans le respect de la règle des 3R.

-Remplacement : Une approche in vitro a été développée en amont afin de valider notre hypothèse de travail et l'utilisation des composés sur des cellules immunitaires impliquées dans le contrôle de la tumeur mais cela ne reproduit pas un modèle de régulation complexe permettant la validation de notre stratégie.

-Réduction : Le nombre d'animaux est calculé au plus juste à l'aide d'outils statistiques garantissant une puissance de test de 80% minimum en s'appuyant sur les données de la littérature et nos expériences précédentes. Le suivi de la tumeur par imagerie in vivo permet de réduire le nombre

d'animaux utilisés, le suivi à différents temps avant ou après traitement étant rendu possible sur un même animal, tout au long de l'expérience.

-Raffinement : Les souris sont hébergées en accord avec les normes réglementaires, en animalerie A2 à raison de 5 souris maximum par cage sur des portoirs ventilés et dans un environnement enrichi (objets en cellulose pour faire un nid ou à ronger). Un suivi quotidien de l'état de santé des animaux sera réalisé avec une surveillance systématique de points limites. Les procédures sont réalisées par du personnel déjà formé aux sciences et techniques des animaux de laboratoire.

19356 Dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, il est nécessaire d'étudier l'activité pharmacologique de la substance active chez l'animal.

Avant ces études pharmacologiques, il est indispensable d'évaluer l'innocuité des produits pharmacologiques en cours de développement, candidats-médicaments.

Cette démarche a pour but d'identifier les effets indésirables liés à l'administration des composés en prévision de leur utilisation future chez les animaux engagés dans des modèles complexes chez la souris.

Adéquation avec la règle des 3R

Remplacer

Pour réaliser ce projet, nous souhaitons utiliser la souris, car cette espèce est la plus utilisée dans le cadre du développement des candidats médicaments. A ce jour, aucun modèle moléculaire et/ou cellulaire n'est suffisamment intégré et complexe pour permettre de reproduire l'ensemble des phénomènes biologiques impliqués dans les mécanismes d'absorption, de dégradation, de métabolisme et d'élimination (ADME) des composés pouvant affecter l'activité et la innocuité des candidats-médicaments. C'est pour cette raison qu'une approche in vivo est indispensable pour s'assurer de l'innocuité d'un candidat médicament avant de poursuivre son développement.

Raffiner

La procédure expérimentale est conçue pour garantir le bien être de l'animal et réduire au maximum l'inconfort, le stress et la souffrance de l'animal. La souris étant un animal social, les souris seront maintenues par groupes sociaux, dans des cages enrichies de tubes en carton. Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi journalier des animaux.

La douleur liée aux injections des candidats-médicaments est une douleur ponctuelle réversible qui fera l'objet d'une surveillance de l'animal. Les animaux seront particulièrement surveillés après l'administration des candidats-médicaments pour visualiser tout signe de toxicité qui sera suivi de l'arrêt de la procédure.

Réduire

La réalisation des procédures par un technicien rompu à ces manipulations garantit une bonne reproductibilité et permet de limiter le nombre d'animaux à engager dans les protocoles. Nous avons montré que la procédure expérimentale parfaitement maîtrisée permet une évaluation efficace de l'innocuité d'un candidat-médicament à l'aide de 2 souris par groupe (dose, voie d'administration, sexe...) et un maximum de 10 animaux.

Il est prévu d'évaluer l'innocuité de 40 candidats-médicaments par an (400 souris) sur une période de 5 ans, soit un total de 2000 souris.

19357 La Dengue est une infection à fort potentiel épidémique et émergent, elle sévit dans les tropiques, mais s'étend maintenant aux zones tempérées à cause des changements globaux. Son incidence a été multipliée par 30 au cours des 50 dernières années. On estime que la moitié de la population mondiale est désormais exposée au risque de cette infection transmise par les moustiques (OMS, 2020). Il n'existe pas de moyen de lutte efficace contre cette maladie. Le seul vaccin disponible a une efficacité relativement faible et ne protège pas contre les premières infections. La lutte vectorielle est de son côté insuffisante.

Durant la piqûre, les moustiques injectent de la salive infectieuse dans la peau, où les cellules stromales et les cellules immunitaires résidentes de la peau sont infectées. L'infection initiale

déclenche une inflammation médiée par les cellules immunitaires résidentes, lesquels recrutent de nouvelles cellules immunitaires. Ces cellules entrantes sont à leur tour infectées par le virus et leur migration ultérieure vers les ganglions lymphatiques entraîne une infection systémique. Bien que cette description mécanistique semble convaincante, elle n'est basée que sur des études menées dans des conditions artificielles, c'est-à-dire l'infection par inoculation par seringue et/ou l'utilisation d'un modèle de souris immunodéprimées, qui supportent l'infection par le virus de dengue (DENV) parce qu'elles ne présentent pas une réponse immunitaire appropriée. En raison de ces limitations techniques, nos connaissances sur l'infection initiée par la piqûre sont discutables. Pour surmonter ces problèmes techniques, un modèle in vivo en utilisant des souris immunocompétentes est incontournable.

L'objectif de ce projet est de décrire l'initiation de l'infection de la peau à la suite d'une piqûre de moustique dans une souris immunocompétente. Ces résultats permettront de décrire avec une précision inégalée l'initiation de l'infection cutanée. Le projet comporte 3 expériences nécessitant l'utilisation des souris immunocompétentes C57BL/6J, un modèle développé par notre équipe qui permet l'infection par le DENV sur une courte durée (24h). Chacune de nos 3 expériences informe la suivante. i) Nous déterminerons d'abord, par étude de la cinétique de l'infection par le DENV, le temps où l'infection s'amplifie (T_i) suite à une piqure de moustique infecté. ii) A ce T_i , nous regarderons les changements dans l'expression des gènes au niveau de la peau initié par la piqure, en utilisant la technologie du séquençage de l'ARN en cellule unique (scRNAseq) sur des biopsies cutanées. iii) Par la suite, nous confirmerons ces résultats par d'autres approches.

Au total, nous allons utiliser 67 souris dans ce projet. Nous avons établi nos protocoles en conformité avec les exigences de remplacement, réduction et de raffinement :

Remplacement :

Le remplacement du modèle souris par un autre, e. g. in vitro, n'est pas possible pour étudier la transmission par piqure de moustique.

Réduction:

-Afin de minimiser le nombre de souris à utiliser, nous allons évaluer d'abord l'impact de multiples piqûres sur l'infection. Les résultats de cette expérience montreront soit qu'il n'y a pas d'effet de piqûres multiples, soit nous permettront de quantifier cet effet. Cette connaissance nous permettra de limiter le nombre de souris en pratiquant plusieurs piqûres sur la même souris et en interprétant les résultats en fonction de l'effet quantifié de multiples piqûres s'il existe. Deux groupes seront comparés : Groupe1, une seule piqûre de moustique par souris ($n=5$ souris) versus Groupe2, 5 piqûres de moustiques par souris ($n=5$ souris). Après 24h, nous anesthésierons les souris et procéderons à une biopsie de peau de 1 cm², dans laquelle nous quantifierons le virus et évaluerons la variabilité.

-Pour pallier aux variations intra et inter-individus pouvant influencer la détermination du T_i , un point clé dans ce projet, nous devrions alors utiliser un nombre suffisant pour chaque point de temps (de 60 à 90 souris pour 6 points de temps). Pour réduire le nombre ici, nous utiliserons des infections multiples sur la souris, alors nous utiliserons 18 souris au lieu de 60-90.

-De la même façon nous réduirons le nombre de souris pour la scRNAseq. Au lieu d'utiliser 10 souris/ groupe, soit 30 souris/ 3 groupes, et répéter l'expérience pour valider les résultats, donc 60 souris ; nous n'utiliserons que 6 souris/3 groupes exposées chacune à 5 moustiques et répéterons l'expérience. Donc au lieu de 60 souris, nous n'en utiliserons que 12.

Raffinement:

-Elles seront hébergées dans des cages (3 à 6 souris/cage). La nourriture et l'eau seront à volonté. Des enrichissements sont mis dans chaque cage. Un contrôle journalier est effectué avec des examens cliniques seront effectués.

-Les souris seront manipulées de façon à réduire au maximum le stress, la douleur et la souffrance. Elles seront anesthésiées avant leur exposition aux moustiques. Nous utiliserons des coussins chauffant pour maintenir la température des souris anesthésiés. Un contrôle régulier, chaque 15

min, sera effectué pour déceler toute possible anomalie liée à la narcose : suivi des grandes fonctions et dessèchement de la cornée.

19358 Depuis toujours l'homme a observé les animaux car sa survie dépendait de la connaissance de leur comportement. La meilleure connaissance du comportement animal permet de limiter les dégâts involontaires causés aux espèces et la perte de temps et d'argent dues à la mise en œuvre de plans de conservation mal adaptés. Notre projet se propose d'étudier les mécanismes par lesquels des signaux et des indices parviennent à un individu receveur et en modifient le comportement. Les signaux, eux, proviennent d'autres individus et interviennent dans la communication (par exemple acoustique ou olfactive), notamment dans la formation des couples (sélection sexuelle). Les indices, quant à eux, proviennent de l'environnement et interviennent dans la perception du milieu et sont notamment impliqués dans la navigation et le mouvement des individus dans l'espace. Ces signaux et indices pourraient être involontairement changés ou brouillés à cause des actions de l'homme par le biais de modifications environnementales allant des changements climatiques à l'introduction d'organismes exogènes. Un changement de régime alimentaire dû à la diminution/disparition d'une proie peut modifier la couleur des plumes d'un oiseau ou sa capacité à repérer correctement sa nourriture ; un changement de température peut modifier la transmission des chants ou des odeurs ; une modification climatique peut modifier le paysage en changeant ainsi les repères utilisés dans l'orientation. Mieux comprendre comment les animaux utilisent les indices extérieurs et comment ces indices influencent leurs capacités de survie est donc capital pour entreprendre des actions vouées à la préservation des espèces et donc de la biodiversité.

L'originalité de ce projet réside dans le fait que les différentes modalités sensorielles (olfaction, audition, vision), impliquées dans la perception des signaux et indices externes, seront abordées séparément mais aussi en synergie. Les modèles biologiques concernés par notre projet sont essentiellement les oiseaux marins subantarctiques (pétrels, manchots, labbes et chionis). Ce volet concerne les travaux prévus chez les pétrels, les volets concernant les autres espèces seront présentés sous forme de demandes séparées. Pour ce qui concerne le remplacement, s'agissant d'études comportementales sur la faune sauvage évoluant dans leur milieu naturel, il n'est pas possible de passer à des modèles *in vitro* ou *in silico*. Les exigences de réduction sont aussi prises en compte et le nombre total de pétrels utilisés sur la durée du projet est réduit au minimum permettant une analyse statistique fiable. Pendant les 4 ans du projet, 480 oiseaux répartis en 360 pétrels bleus et 120 prions de la désolation seront soumis à des actes identifiés comme « expérimentation animale ». Les exigences de raffinement ont été prises en compte, en adaptant les dispositifs expérimentaux à la morphologie et au comportement de chaque espèce pour assurer un confort aux oiseaux au cours de l'étude. Nos études visent à obtenir des réponses comportementales naturelles, autrement dit, non biaisées par le stress ou la manipulation. Par conséquent, la manipulation de tous les sujets est rapide et l'expérimentation a été construite de manière à pouvoir l'arrêter à tout moment en cas de signes de stress, et pour que l'animal relâché dans son nid souterrain soit dans un état qu'on pourrait définir comme « normal », c'est-à-dire comme s'il n'avait pas été manipulé.

19359 Malgré les progrès récents en neuro-oncologie, le glioblastome (GBM) reste l'une des formes de cancer les plus mortelles, la thérapie actuelle n'offrant que des perspectives palliatives. En effet, les traitements conventionnels actuels, qui associent une chirurgie suivie d'une radiothérapie associée à une chimiothérapie concomitante (Temozolomide), n'améliorent que modestement la survie des patients (survie médiane de 15 mois), et la récurrence semble être la règle. Les patients atteints de GBM présentent également un risque élevé de formation de caillots sanguins. PAR1 (protease activated receptor 1), un récepteur de la thrombine, dérégulé dans les cellules souches cancéreuses de GBM (CSC), est nécessaire au développement tumoral *in vivo*, chez la souris. Le but de cette étude est d'étudier la pertinence clinique de ce récepteur en testant l'efficacité thérapeutique d'un inhibiteur oral récemment approuvé de PAR1 en monothérapie, ou en association avec des traitements radio-chimiothérapeutiques classiques dans un modèle de souris immunocompétent. L'effet des traitements sur la réponse vasculaire et immunitaire sera également

évalué. A ce titre, cette étude pourrait aboutir au développement de nouvelles options pour le traitement des gliomes malins, utilisant à la fois un antagoniste déjà approuvé cliniquement comme agent antithrombotique, et permettant ainsi une traduction clinique rapide de cette cible thérapeutique fondamentalement nouvelle dans ce contexte.

Dans une première étude, la tolérabilité associées à des doses orales croissantes de l'inhibiteur sur des souris porteuses de GBM sous-cutanées (Objectif 1) ou intracrâniens (Objectif 2) sera évaluée. Compte tenu de la biodisponibilité limitée de nombreux inhibiteurs dans le cerveau, la pénétrance cérébrale de cet inhibiteur ainsi que les effets d'une administration intracrânienne directe sur le développement du GBM murin (Objectif 2) seront établies.

Dans un second temps, le but (Objectif 3) sera de tester l'efficacité thérapeutique de l'inhibiteur de PAR1 sur la croissance tumorale, la réponse vasculaire et immunitaire associées ou non à un traitement radiothérapeutique (RT) et/ou chimiothérapeutique (TMZ) chez des souris porteuses de GBM sous-cutanés (Objectif 3. 1) ou intracrâniens (Objectif 3. 2).

Un total de 1038 souris seront nécessaires afin d'obtenir des résultats fiables, tout en respectant la règle des 3Rs:

Remplacement : L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de PAR-1 bloque la croissance de cellules souches cancéreuses in vitro. A ce stade de nos connaissances, seule une étude in vivo sur des modèles animaux syngéniques de développement tumoral permettra d'analyser l'effet de l'inhibiteur seul et combiné à la radio- et/ou chimio-thérapie sur l'efficacité thérapeutique et la réponse immunitaire.

Réduction : Les effectifs sont justifiés par l'importante variabilité des résultats obtenus sur l'étude du système immunitaire dans l'efficacité du traitement pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Le nombre de paramètres mesurés par animal a été optimisé et nous avons privilégié les études longitudinales.

Raffinement : Toutes les manipulations susceptibles de générer de l'inconfort ou de la douleur (transplantation, irradiation) seront réalisées sous anesthésie générale. Les souris seront observées quotidiennement et la croissance des tumeurs sera mesurée régulièrement. Les données seront intégrées à l'aide d'une grille d'évaluation (état de stress, niveau de douleur, taille de tumeur, etc) et l'animal pris en charge selon le score obtenu (traitement contre la douleur si nécessaire). Des études préalables nous ont permis de définir les points limites les plus précoces afin d'éviter toute souffrance des animaux.

Les procédures expérimentales du projet seront réalisées par des personnes habilitées et formées. Les animaux seront hébergés selon les normes en vigueur avec des conditions d'hébergement et d'enrichissement de leur environnement conformes à la validation de la cellule bien-être (ex : baton à ronger, matériel de nidification permettant à l'animal d'exprimer des comportements naturels).

Une étude préliminaire, avec un nombre restreint de groupes conditionnera la suite du projet, le nombre d'animaux annoncé est donc un nombre maximum.

Menée à bien, cette étude devrait permettre de connaître la place d'une inhibition pharmacologique de PAR1 dans l'arsenal thérapeutique actuel des glioblastomes. L'analyse de la réaction immunitaire associée permettra de mieux appréhender son mécanisme d'action sur les cellules tumorales.

19360 Les nouveau-nés prématurés courent un risque plus élevé que les nourrissons nés à terme de développer des troubles neuro développementaux. Ces troubles sont associés à un élargissement des ventricules, ainsi qu'à des lésions diffuses de la substance blanche qui reflètent une perturbation de la myélinisation (hypomyélinisation).

Le modèle d'hypoxie chronique, est un modèle murin de grande prématurité. Il consiste à placer les souriceaux nouveau-nés avec leur mère dans une chambre d'hypoxie à 10% d'oxygène. Il vise à reproduire l'hypoxie associée à une immaturité des poumons et/ou aux apnées chroniques fréquemment observés chez les grands prématurés. Ce modèle reproduit les atteintes histologiques observés chez les grands prématurés, incluant l'hypomyélinisation.

Les cellules souches neurales représentent une cible thérapeutique potentielle pour corriger ces atteintes de la myéline. Ces cellules qui résident dans la région périventriculaire, produisent les oligodendrocytes (les cellules formant la myéline) des régions dorsales du cerveau durant la période périnatale. De nombreux projets de recherche visent à développer de nouvelles molécules thérapeutiques permettant de stimuler ces cellules et promouvoir leur différenciation en cellules myélinisantes.

Dans ce projet de recherche fondamentale, nous proposons d'évaluer le potentiel de deux nouvelles molécules thérapeutiques dans le traitement des hypomyélination perinatales. L'espèce animale retenue pour ce projet est la souris, espèce actuellement utilisée dans le modèle animal susmentionné. Nous estimons qu'un nombre total de 192 souris (32 femelles et 160 souriceaux), sera nécessaire pour accomplir cette étude d'une durée de 5 ans. La procédure 1 (génotypage, classe légère) sera effectuée de manière ponctuelle, afin de maintenir la lignée de souris transgénique nécessaire à ce projet, qui permettent une visualisation des cellules souches et de leur devenir. Tous les souriceaux issus du croisement de ces souris transgéniques seront exposés aux procédures 2 et 4, qui permettront respectivement de marquer les cellules à étudier (procédure 2, classe modérée), et d'administrer les molécules à tester par infusion intranasale (ou le véhicule, procédure 4, classe légère). Seule la moitié des souris seront exposés à l'hypoxie (procédure 3), l'autre moitié correspondant aux animaux contrôles. Les souris seront euthanasiés 7 jours ou 1 mois après administration de la molécule à tester (c'est-à-dire à P19 et P45, respectivement), afin de récupérer les tissus et effectuer une analyse histologique poussée du devenir des cellules marquées.

Application des 3Rs :

Remplacement : Les molécules candidates ont été identifiées *in vitro* puis validées par une équipe de pharmacologistes afin de sélectionner les molécules montrant une absence d'effet néfastes. L'analyse *in vivo* devient maintenant nécessaire. En effet, les lésions post-hypoxique dépendent de mécanismes complexes impossibles à reproduire *in vitro* d'où la nécessité d'un modèle animal pour étudier la pathologie et l'effet bénéfique potentiel des molécules candidates.

Réduction : La méthode d'échantillonnage utilisée permettra non seulement un échantillonnage homogène de notre région d'intérêt, mais aussi l'utilisation des mêmes cerveaux pour des marquages immunohistochimiques variés, nous permettant de minimiser le nombre d'animaux nécessaire à ce projet. Ainsi 192 souris seront utilisées qui correspondent à 8 expériences indépendantes (4 par molécules testées permettant d'effectuer 2 réplicants pour 2 temps de survie). Enfin, nous avons mis en place dans l'équipe depuis plusieurs années un système de préservation de toutes les séries de coupes non utilisées. Cette banque de tissu permet d'optimiser sur le long terme l'utilisation du tissu tout en réduisant le nombre d'animaux utilisés.

Raffinement : L'utilisation des procédures décrites dans ce projet par de nombreuses équipes de recherche, a permis leur raffinement afin de minimiser tout effet néfaste sur les animaux. Ainsi, les femelles seront échangées tous les 2 jours entre les cages normoxiques et hypoxiques, afin de préserver la quantité et la qualité du lait qu'elles produisent pour nourrir leurs souriceaux et de minimiser au maximum le stress conséquent à la procédure sur les animaux. De plus, un suivi journalier des souriceaux sera effectué durant la période hypoxique, mais aussi suite à l'administration des molécules candidates, afin de détecter et traiter immédiatement tout signe d'inconfort des animaux. Pour cela une grille de score sera remplie chaque jour pour évaluer des signes de stress (exploration rapide et répétée de la cage), léthargie, signes de douleurs (piloerection, dos voûté. . .), développement anormal des souriceaux. un score cumulatif de 1 entraînera une observation plus fréquente (2 fois par jours), et un score supérieur à 1 une interruption de l'expérience en accord avec le vétérinaire en chef.

19361 Malgré le nombre croissant de molécules thérapeutiques en oncologie et en infectiologie, les progrès thérapeutiques restent modestes. L'un des principaux obstacles est inhérent à l'absence d'une délivrance spécifique de médicaments, tels que des plasmides thérapeutiques dans un tissu cible. Une autre limitation importante est la présence de barrières biologiques (par exemple, la barrière endothéliale) qui limitent l'extravasation de molécules thérapeutiques en doses suffisantes

vers le tissu cible. De nouvelles méthodes basées sur l'utilisation combinée de microbulles de gaz et d'ultrasons fournissent des alternatives thérapeutiques sans précédent pour obtenir une action thérapeutique locale, efficace et non-invasive des médicaments. En effet, après leur administration par voie intraveineuse, l'activation de ces microbulles par ultrasons à proximité de la barrière hémato-tissulaire, augmente transitoirement leur perméabilité et permet ainsi le passage et la pénétration de plasmides thérapeutiques dans les tissus cibles. Grâce à cette extravasation augmentée, la biodisponibilité de ces molécules dans les zones cibles se trouve amplifiée, élément majeur pour une expression spécifique et efficace du gène thérapeutique dans le tissu cible. Ces microbulles peuvent être également administrées directement dans le tissu cible. Leur activation par ultrasons à proximité des cellules à transfecter, augmente transitoirement leur perméabilité et permet ainsi l'internalisation du plasmide thérapeutique dans les cellules qui composent les tissus cibles.

Dans ce contexte, l'objectif de ce projet vise à développer et à optimiser un protocole de délivrance de plasmides codant deux gènes rapporteurs, la luciférase (mimant la production localisée d'une protéine thérapeutique) et la phosphatase alcaline embryonnaire sécrétée (mimant la production d'une protéine thérapeutique sécrétée) dans divers tissus : peau, foie, muscle squelettique et tumeur (sous-cutanée et métastatique). La production de la luciférase et de la phosphatase alcaline embryonnaire sécrétée (SEAP) sera mesurée par imagerie bioluminescence et par dosage sérique, respectivement.

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

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

Réduction: Sur la base de nos études antérieures et en raison des variables mesurées, notre étude nécessite 528 souris. Les groupes contrôles et expérimentaux seront constitués de 8 souris. Nous réaliserons une étude statistique pour déterminer si les différents protocoles de délivrance de plasmides par sonoporation permettent une augmentation significative de la production des protéines rapportrices par rapport à l'injection directe de plasmide (Puissance de test: 80%, Seuil de risque: 0.05).

Raffinement: Les souris seront hébergées par groupe de 8 en présence d'un objet d'enrichissement (morceaux de carton). Les animaux seront observés une fois par jour afin d'évaluer leur stress/leur douleur après les différentes procédures réalisées sous anesthésie. La douleur sera prise en charge par une analgésie adaptée.

19362 Intitulé : L'imagerie multimodale des interactions neurogliales chez le rongeur in vivo

Durée : 36 mois

Mots-clés : Neuroimagerie, DREADDs, Neurones, Astrocytes

Finalité : Réaliser un outil préclinique de neuroimagerie multimodale innovant permettant l'exploration neurogliale in vivo à des fins de recherches pharmacologiques.

Objectifs et bénéfices :

Les besoins thérapeutiques liés aux maladies du système nerveux central ne sont que partiellement couverts par les médicaments actuels. Il est nécessaire de revisiter certains concepts pharmacologiques afin d'ouvrir le champ à de nouvelles stratégies thérapeutiques, notamment en ciblant des cellules autres que les neurones. Ainsi, les cellules gliales, composant 50% des cellules cérébrales de l'Homme, sont dorénavant considérées comme des acteurs à part entière dans la transmission des signaux chimiques et la régulation des neurones. Parmi les cellules gliales, les astrocytes contribuent à cette 'gliotransmission'. Si la gliopharmacologie (par analogie à la neuropharmacologie) est un nouvel enjeu pour les médicaments de demain, il est primordial d'avoir à disposition des approches in vivo permettant leurs explorations.

L'objectif de ce projet de recherche translationnelle, qui utilisera 256 rongeurs au maximum (souris et rats) sera de définir les contributions astrocytaires et neuronales dans les données de neuroimageries citées ci-dessous, obtenues chez le rongeur :

- Imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf),
- Tomographie par Emission de Positons (TEP)
- Imagerie par ultrasons (fUS).

Dans ce contexte, la neuroimagerie TEP, IRMf et fUS offre un champ d'exploration à la fois moléculaire et fonctionnel de l'activité cérébrale, tout en étant translationnel. Pour déterminer ces différentes contributions, une méthode récente de biologie moléculaire appelée « Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drugs » (DREADD) sera utilisée afin de moduler l'activité neurogliale. Cette méthode repose sur la modification d'un récepteur transmembranaire répondant à un ligand spécifique et exogène, modulant ainsi l'activité des cellules exprimant ce récepteur d'intérêt.

Nuisance : Les animaux seront étudiés dans un état d'anesthésie générale soit par imagerie fUS soit par IRMf, soit par TEP, mais également dans un état éveillé en imagerie fUS (uniquement chez le rat).

Les procédures d'imagerie fUS nécessiteront chez le rat de réaliser une fenêtrage d'amincissement afin de visualiser les structures d'intérêt. Une nuisance possible de cette procédure est l'apparition d'hémorragie lors de la chirurgie ou bien d'infection éventuelle à la suite de celle-ci. Le protocole sera optimisé pour que les risques de ces complications soient minimales (zone opérée réduite au maximum, stérilisation du matériel, administration systématique d'antibiotique et d'anti-inflammatoire, en plus de l'analgésie et de l'anesthésie profonde). Les autres techniques d'imagerie ne nécessitent pas de chirurgie.

Remplacement : L'ensemble du projet et des procédures utilisées ont été choisis après une lecture minutieuse de la littérature actuelle, avec une comparaison détaillée des données expérimentales mises à notre disposition. S'agissant d'un projet dont l'objectif final est de construire un outil préclinique in vivo, l'utilisation d'un modèle in vitro ou d'un modèle mathématique n'est pas pertinente, ni cohérente avec l'état actuel des connaissances.

Réduction : Le nombre d'animaux par groupe a été déterminé sur la base de calcul de puissance statistique compte tenu de la taille des effets observés et de la variabilité connue. De plus, lorsque cela sera possible, les animaux seront réutilisés sur l'ensemble des procédures après une période de clairance, sans compromettre les résultats.

Raffinement : Les animaux seront surveillés régulièrement grâce à une grille de score et des points limites adaptés. La douleur sera réduite au maximum par l'administration d'analgésiques dès l'apparition de signes. En cas de signes de détresse, la procédure serait interrompue et si nécessaire, la mise à mort serait effectuée. Les expériences chez l'animal éveillé seront précédées par une phase d'habituation afin de minimiser le stress. L'environnement sera enrichi avec morceaux de bois, boîtes ou cylindres.

19363 Ce projet concerne la partie pratique de la formation initiale réglementaire en expérimentation animale pour les personnes appliquant les procédures expérimentales (fonction A). Cette formation est spécialisée sur les rongeurs et a reçu un avis favorable du Ministère de l'Agriculture. La formation fonction A s'adresse à toute personne devant appliquer des procédures expérimentales aux animaux et constitue un pré-requis incontournable pour la réalisation de procédures dans le cadre de projets scientifiques.

Les objectifs de ces travaux pratiques sont :

- initier les participants à la manipulation de souris - illustrer les concepts fondamentaux abordés dans la partie théorique : prise en compte de l'animal comme être sensible, règle des 3Rs, comportement, points limites, anesthésie, anatomie, physiologie.
- apprentissage des bonnes pratiques relatives aux gestes techniques de base (préhension, contention, administrations, prélèvements sanguins)

- s'assurer que les personnes suivant cette formation aient les connaissances pratiques nécessaires pour participer à des expérimentations animales dans le respect de l'animal.

Ces TP permettront de former au maximum 42 personnes. Un total de 63 souris seront utilisées au maximum, pendant toute la durée du projet (1 an), pour réaliser les techniques de préhension, contention, administrations et prélèvements de sang.

Ce projet respecte la règle des 3R :

-Remplacement : une séance de travaux dirigés précède la réalisation de la procédure et consiste à détailler les gestes (support photo et vidéo) et à sensibiliser les apprenants aux notions d'éthique et de bonnes pratiques à appliquer. L'objectif pédagogique étant l'apprentissage de la manipulation de souris, par définition il s'agit d'un enseignement par la pratique. Il est donc indispensable et exigé par les autorités d'avoir recours à des animaux vivants. Néanmoins, les souris seront les seuls animaux vivants manipulés. Le modèle de rat ne sera abordé que par supports inertes tels que les mannequins, photos et vidéos.

-Réduction : le nombre d'animaux a été réduit au minimum nécessaire, permettant cet enseignement en tenant compte des différents gestes réalisés (seuls les gestes de base les plus courants et faiblement invasifs sont pratiqués afin de diminuer le nombre de souris utilisées). Les gestes spécifiques particuliers seront gérés ultérieurement par les responsables de compétences de chaque établissement. Le nombre de souris utilisées a été calculé au plus juste pour satisfaire à la fois à la nécessité de réduction, de raffinement et à l'exigence d'une formation de qualité. Les animaux utilisés sont des souris réformées d'élevage chez le fournisseur concerné.

-Raffinement : la procédure a été élaborée de façon à s'affranchir de toute souffrance inhérente à l'inexpérience des apprenants. Les formateurs sont formés et expérimentés. La chronologie des techniques enseignées lors des TP est définie de sorte que les gestes les plus invasifs soient réalisés en dernier. Tout geste/attitude permettant de s'affranchir ou le cas échéant de limiter au maximum souffrance, stress ou inconfort de l'animal, sera mis en exergue.

Cette formation comprend au préalable, des cours théoriques portant notamment sur l'anesthésie, l'analgésie, les points limites, les bonnes pratiques éthiques, afin de sensibiliser les futurs expérimentateurs à ces méthodes de raffinement expérimental indispensables dans le domaine. Les animaux sont hébergés dans des conditions répondant à leurs besoins (enrichissement, groupe social) et entrent en procédure après une période d'acclimatation de 5 jours minimum. Ils font l'objet d'un contrôle quotidien, et lors de la réalisation de la procédure, un encadrant est prévu pour six stagiaires au maximum afin de dispenser un enseignement aussi personnalisé que possible et donc une surveillance rapprochée de chaque animal, chacun réalisant tour à tour les manipulations sous l'œil exercé des formateurs expérimentés.

19364 De préférence, les chirurgiens utilisent des vaisseaux sanguins non essentiels prélevés chez les patients eux-mêmes pour créer un abord vasculaire permettant de réaliser une hémodialyse (méthode d'épuration du sang employée lorsqu'un patient souffre d'insuffisance rénale sévère), ou pour créer un pontage en remplacement de petits vaisseaux sanguins périphériques ou coronariens obstrués (< 6 mm de diamètre interne). Malheureusement, ces vaisseaux viennent souvent à manquer lors d'interventions répétées suite à la progression de la maladie. De ce fait, des prothèses vasculaires synthétiques sont utilisées, mais avec des résultats très décevants à moyen et long termes. Ainsi, de nombreux groupes de recherche ont émis l'hypothèse qu'une prothèse vasculaire entièrement biologique apporterait de meilleurs résultats qu'une prothèse synthétique, c'est pourquoi l'objectif de ce projet est de développer un substitut vasculaire entièrement biologique par ingénierie tissulaire qui repose sur la production de feuillets composés de matrice extracellulaire (MEC: assemblage de macromolécules tels que le collagène, des protéoglycanes ou des glycoprotéines, qui lient des cellules et les organisent en tissus) synthétisée par des cellules en laboratoire. À partir de ces feuillets, des fils sont produits et utilisés afin d'assembler un substitut vasculaire par tissage. Il est désormais possible de produire des feuillets de MEC à partir de cellules provenant de moutons. Cette avancée permet aujourd'hui de produire des substituts vasculaires tissés entièrement biologiques qui pourront être implantés dans un modèle ovin. Une implantation

dans un modèle animal pourra permettre d'évaluer, à court terme, la réponse immunitaire de l'hôte à la présence du greffon. Elle permettra de simuler les conditions cliniques en termes de technique chirurgicale, de taille du greffon et de pression circulatoire du sang dans le greffon.

L'expérimentation envisagée consiste à étudier à court terme (1 mois et 3 mois) l'efficacité du greffon à préserver la circulation sanguine ainsi que la réponse immunitaire de l'hôte suite à un remplacement de la carotide par un substitut vasculaire entièrement biologique produit par ingénierie tissulaire. Pour mettre en évidence la capacité du greffon à préserver la circulation sanguine, 8 animaux seront implantés et des suivis échographiques seront effectués après 1, 4, 8 et 12 semaines d'implantation. Des angiographies (technique permettant d'imager par rayons X des vaisseaux sanguins via l'injection d'un produit de contraste) et des analyses histologiques (anatomie des tissus) seront réalisées à la fin des temps d'implantations (1 mois et 3 mois) afin de montrer le niveau de remodelage et d'inflammation à court terme des vaisseaux implantés. Ces résultats permettront d'envisager la réalisation d'une étude à plus long terme (jusqu'à 1 an) pour évaluer le remodelage et l'intégration du greffon avec le tissu de l'hôte.

Justification liée aux 3R :

Un modèle de vaisseau humain peut être largement étudié in vitro d'un point de vue mécanique grâce à des bancs d'essai. Cependant, ces plateformes de test ne permettent pas d'étudier la réponse immunitaire ou l'intégration d'un greffon dans des conditions réelles d'utilisation. Il ne sera donc pas possible de REMPLACER l'utilisation d'animaux. Ainsi l'utilisation d'un modèle animal de grande taille possédant un système cardiovasculaire proche de l'homme (porcin, ovin, canin ou primate) est souhaitable pour ce projet. En effet, l'objectif du projet est d'évaluer la fonctionnalité, la réponse immunitaire et l'intégration du substitut vasculaire dans l'organisme vivant et entier afin d'envisager à terme une utilisation chez les patients. Il est aujourd'hui possible de produire des vaisseaux à partir de cellules provenant de moutons. Ainsi le modèle ovin représentera le choix le plus pertinent pour ce projet.

Ces expérimentations sont conçues pour avoir recours à un nombre minimal d'animaux permettant l'obtention de résultats exploitables sur le plan statistique (REDUCTION). Huits brebis seront implantées avec le même nombre de conditions expérimentales. Chaque animal sera son propre contrôle, ce qui permettra de réduire le nombre d'animaux impliqués dans l'expérimentation.

Le RAFFINEMENT sera pris en compte tout au long du projet. Le projet sera mis en place dans des locaux agréés, avec du personnel dédié et expérimenté. De l'enrichissement sera mis en place pour répondre au besoin des animaux (pierre à sel, foin, hébergement en groupe sociaux...).

Un protocole précis de prémédication, d'analgésie et d'anesthésie sera mis en place et le bien-être des animaux sera suivi constamment par le personnel dédié. Si nécessaire, des actions adaptées seront appliquées.

19365 Le diabète est défini par une hyperglycémie chronique, qui apparaît lorsque le pancréas ne produit plus suffisamment d'insuline et/ou que les organes cibles n'utilisent plus correctement l'insuline. Au vu des conséquences sur la santé des patients, de plus en plus nombreux, cette maladie pose un problème de santé publique majeur. Les traitements actuels reposent sur des médicaments délivrés par voie orale et par voie sous-cutanée, dont l'efficacité dépend de leur association avec une alimentation équilibrée et une activité physique régulière. Malheureusement, tous les antidiabétiques oraux sont globalement incapables d'assurer un contrôle à long terme de la glycémie, et sont parfois suivis d'effets secondaires gastro-intestinaux. De plus, lorsque la carence en insuline est trop importante ou lorsque l'augmentation progressive des antidiabétiques devient insuffisante en terme d'efficacité thérapeutique, l'injection d'insuline est incontournable. L'injection est une méthode contraignante et relativement invasive, pouvant provoquer une mauvaise observance des patients et un mauvais contrôle glycémique.

Dans ce contexte, le développement d'une méthode alternative de délivrance non invasive de médicaments apparaît nécessaire. Nous proposons une approche par voie transdermique.

A ce jour, des résultats obtenus ex vivo démontrent le passage de molécules comme l'insuline ou l'ondansetron à travers la peau avec ce dispositif. Toutefois l'activité biologique des molécules

relarguées dans la peau n'a pas été démontrée et nécessite l'utilisation de modèle animal, car le diabète est une pathologie touchant de nombreux organes ou de tissus cibles, mettant également en jeu de nombreuses interactions inter-organes impossibles à reconstituer in vitro ou ex vivo

En résumé, le but de cette étude est de développer un patch capable de délivrer des médicaments antidiabétiques à travers la peau lors de stimulation (chaleur) et de tester si les substances transmises induisent leurs effets biologiques in vivo comparées aux méthodes conventionnelles. Pour valider l'efficacité de la méthode, Nous étudierons la réponse biologique à l'insuline ou à la metformine en comparaison à son administration conventionnelle (injection ou par voie orale) chez des souris sauvages et dans des modèles de souris diabétiques. Les études préliminaires et la réutilisation d'animaux nous permettent de limiter au maximum le nombre de souris (n=801) en assurant sa validité scientifique et statistique. Nous serons attentifs à observer si les animaux souffrent ou présentent un comportement anormal en lien avec le responsable du bien-être animal suivant les paramètres cliniques définissant les points limites :

- Perte de poids de 15% ou plus (variation de de consommation de nourriture ou ingestion d'eau
- Changement de comportement (prostration, apathie, agressivité
- Modification de l'apparence externe (dos rond, poils hirsutes, signes d'infection)

19366 La douleur est un processus physiologique nécessaire à la survie : elle prévient l'organisme d'un danger imminent et permet la mise en oeuvre de réponses adaptées qui visent à en limiter les effets délétères. Cependant, lorsque la douleur est chronique ou persistante, elle devient alors pathologique car elle n'offre plus aucun avantage mais provoque au contraire une extrême souffrance. C'est notamment le cas des douleurs neuropathiques ou inflammatoires qui apparaissent suite à une lésion ou inflammation du système nerveux périphérique ou central. Les traitements disponibles ne sont souvent que partiellement efficaces et peuvent s'accompagner d'effets secondaires importants. Il est donc essentiel de découvrir de nouveaux traitements, et pour ce faire, de disséquer les mécanismes responsables de la genèse d'une douleur chronique. Parmi les symptômes douloureux, il existe l'allodynie qui correspond à une douleur provoquée par une stimulation normalement non douloureuse qui peut être déclenchée suite à une inflammation. En temps normal, les informations tactiles et douloureuses n'aboutissent pas au même niveau de la moelle épinière ou du tronc cérébral, les deux modalités sensorielles (tact et douleur) sont donc normalement séparées. En conditions pathologiques, par exemple lors d'une allodynie, l'information tactile devient capable d'activer des neurones nociceptifs, grâce à un circuit qui implique plusieurs cellules. Le tact va alors devenir douleur (allodynie mécanique). Ce processus va provoquer l'activation de plusieurs populations neuronales et implique également une population spécifique de cellules gliales, les astrocytes. Cependant, peu de choses sont connues sur ces cellules et leur implication dans le déclenchement de l'allodynie lors d'une inflammation.

L'objectif général de ce projet va consister à étudier l'implication des astrocytes et plus précisément l'expression de marqueurs spécifiques des astrocytes (notamment des canaux potassiques astrocytaires) et leur contribution des l'installation de l'allodynie mécanique. Ce projet fait suite à plusieurs projets initiaux au laboratoire. Les résultats obtenus nous confortent dans l'implication de ces canaux dans la maintien de la douleur. Ce projet combinera des études comportementales, électrophysiologiques, homéostasiques, et moléculaires chez le jeune rat (3 à 5 semaines). Ce projet présente donc un intérêt fondamental, et également un intérêt plus appliqué en permettant éventuellement de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques visant à diminuer les douleurs pathologiques chez l'homme. Cette étude nécessitera l'utilisation de 504 animaux sur 3 ans, afin de s'assurer une étude significative. Pour respecter la règle des 3R, le nombre d'animaux a été réduit au maximum à partir de l'expérience dans le domaine et des tests statistiques donnant le nombre nécessaire pour la discrimination des effets.

De plus, comprendre la physiologie de la douleur nécessite l'utilisation du modèle animal. Ainsi, aucune méthode alternative actuelle ne permet de remplacer les protocoles nécessaires à la réalisation de ce projet. Au cours des procédures expérimentales (injection et chirurgie), les animaux seront anesthésiés. Et pendant l'expérimentation, une observation régulière des points

limites, tels qu'une perte de poids et/ou un déficit moteur, sera effectuée. En cas d'atteinte de ces points, l'animal sera retiré de l'expérimentation, par euthanasie de l'animal afin de lui éviter toute souffrance.

19367 Une tumeur cérébrale est une masse de cellules anormales qui se multiplient dans le cerveau de façon incontrôlée. Elles peuvent être bénignes (non cancéreuses) ou malignes (cancéreuses). Leur dénomination provient du tissu cérébral dans lequel elles se développent.

Parmi les tumeurs malignes on trouve entre autres :

- Les tumeurs gliales, ou gliomes représentant 50 à 60 % de l'ensemble des tumeurs cérébrales. Elles se forment à partir des cellules gliales, cellules intervenant comme structure de soutien des cellules nerveuses.

- Les méningiomes se développent à partir de cellules des enveloppes du cerveau et de la moelle épinière appelées les méninges. Ce sont des tumeurs bénignes dans environ 75-80 % des cas mais peuvent se présenter plus rarement sous des formes plus agressives qui ont tendance à récidiver et peuvent menacer la vie du patient.

Les traitements varient selon le type de tumeur, sa taille et son emplacement. Les tumeurs malignes sont habituellement traitées à l'aide de thérapies combinées comme la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. Avant tout traitement les tumeurs sont précisément localisées par imagerie (IRM, imagerie isotopique, scanner, angiographie,...)

L'imagerie isotopique consiste à injecter une molécule radiomarquée (radiotracer) au patient qui va se fixer spécifiquement dans différentes régions de l'organisme, le patient est ensuite placé sous une caméra capable de détecter la radioactivité qui donne une image 3D de la localisation du radiotracer dans l'organisme. En fonction du radiotracer utilisé, différentes régions peuvent être ciblées, par exemple : des cellules tumorales, des zones de nécroses ou encore des zones d'inflammations.

Il existe 2 types de caméras pour détecter les radiotraceurs : la TEP (Tomographie par Emission de Positons) et la TEMP (Tomographie par Emission Monophotonique) encore appelée SPECT ou scintigraphie. L'imagerie isotopique est généralement associée à un scanner (CT) qui permet d'avoir une image anatomique.

La TEP et la SPECT sont les modalités d'imagerie corps entier les plus sensibles à ce jour et donc les plus appropriées quand il s'agit de détecter et localiser un phénomène moléculaire ou métabolique dont elles permettent une quantification absolue.

Dans ce projet, nous poursuivons 2 objectifs scientifiques et technologiques principaux : 1) le développement de nouveaux candidats pour l'imagerie isotopique (radiotracer) afin d'améliorer la détection et le suivi des tumeurs, 2) amener des candidats-médicaments aux phases précliniques de validation.

L'étude se fera sur des souris immunodéficientes, dans lequel on implantera par chirurgie des cellules tumorales humaines. Le développement des tumeurs et l'efficacité des traitements seront suivis par imagerie isotopique. A la fin du protocole les animaux seront mis à mort afin de récupérer les tissus cérébraux pour faire des analyses moléculaires et des imageries ex vivo.

La règle des 3R sera respectée dans ce projet :

REMPACEMENT : il n'existe à l'heure actuelle aucun modèle de substitution in vitro ou in silico pour étudier l'impact d'un nouveau médicament ou un nouveau radiotracer sur le développement de tumeurs cérébrales. La souris immunodéficiente est un modèle de choix car elle permet le développement et le suivi de lignées tumorales humaines. L'induction des modèles de glioblastome et de méningiome chez la souris sont des techniques maîtrisées et documentées.

REDUCTION : Sur l'ensemble de ce projet, nous utiliserons 1320 souris immunodéficientes âgées d'au moins 6 semaines (jeune adulte). L'imagerie TEP et SPECT permet de suivre un même animal de manière longitudinale, contribuant à hautement réduire le nombre d'animaux nécessaires.

RAFFINEMENT : Au cours de l'étude, les souris seront hébergées par 5 dans des cages enrichies de dômes et copeaux, sur portoir ventilé, dans une pièce avec des cycles de lumière-obscurité de

12h, dont la température et l'hygrométrie sont contrôlées en permanence et avec un accès libre à la nourriture et à l'eau. Le bien-être des animaux sera surveillé quotidiennement par du personnel qualifié ce qui nous permettra d'intervenir rapidement dès le moindre signe de souffrance pour la prendre en charge. Pour limiter au maximum la souffrance et le stress des animaux, la chirurgie nécessaire à l'induction des modèles tumoraux se fera sous anesthésie générale et analgésie selon des protocoles internes validés et une surveillance accrue des animaux se fera jusqu'à leur réveil. Après l'opération l'accès à la nourriture sera facilité en placent directement de la nourriture humidifiée dans la cage et des antalgiques seront administrés en cas de signes de douleurs. Toutes les imageries se feront également sous anesthésie, nous privilégierons dans ce cas une l'anesthésie gazeuse qui permet un endormissement et un réveil rapide. Afin d'éviter la souffrance, tout signe et comportement anormal : difficultés à respirer, souris prostrée ou en retrait, si ses poils sont hérissés et /ou une perte de poids supérieure à 20% du poids initial des animaux ; entraineront la fin de l'expérimentation pour ces derniers, et leur mise à mort sans délai.

19368 La diminution de la fonction musculaire associée à une perte de la masse et/ou de la qualité musculaire, caractérisant la sarcopénie, est une pathologie dont l'incidence est importante chez les patients atteints de carcinome hépatocellulaire (CHC) et de cancer colorectal (CCR). D'autre part, alors que l'effet bénéfique de l'activité physique dans la prévention des cancers, incluant les cancers digestifs, a été largement documenté, peu d'études ont investigué son impact sur la survie et l'efficacité thérapeutique anticancéreuse une fois le cancer diagnostiqué. La fonction immunomodulatrice du muscle et le rôle crucial du système immunitaire dans l'élimination des cellules cancéreuses soulèvent l'intérêt de comprendre comment la masse et/ou l'activité musculaire peuvent influencer la réponse immunitaire antitumorale. En oncologie, le blocage de points de contrôle immunitaire (PCI) par l'utilisation d'anticorps antagonistes ciblant PD-1, PD-L1 ou CTLA4 est une avancée majeure dans le traitement du cancer, cependant, des résistances à ces traitements existent notamment pour le CCR et le CHC qui ont un taux de réponse objective relativement faible (~ 20%). Le muscle génère de multiples cytokines solubles, appelées myokines, qui peuvent influencer l'activité et la polarisation des cellules immunitaires exprimant leurs récepteurs. Une dégradation de la masse et/ou de la fonctionnalité musculaire pourrait être associée à une altération de ces niveaux de myokines et compromettre la fonctionnalité du système immunitaire en général et anti-tumorale en particulier. Le rôle d'une interaction équilibrée entre le muscle et le système immunitaire par le maintien d'une masse musculaire adéquate et/ou par sa sollicitation grâce à l'exercice sur la progression de la tumeur et sa réponse aux immunothérapies reste suggestif et la démonstration d'une causalité est nécessaire. Nous émettons l'hypothèse que la fonction immunomodulatrice du muscle pourrait impacter la réponse immunitaire antitumorale lors d'un traitement par immunothérapie chez la souris. Nous évaluerons si une masse musculaire hypertrophiée améliore la sensibilité de la tumeur colorectale ou hépatique à un traitement par anti-PD-1. Le nombre total de souris prévues pour la mise en œuvre de ce projet est de 240.

Notre étude, étant une investigation physiologique et impliquant la communication entre différents tissus de l'organisme (tumeur, système immunitaire de la souris), nous ne pouvons remplacer ce modèle animal par aucune méthode alternative actuelle. Le modèle tumoral utilisé a été caractérisé préalablement, ce qui permet de s'affranchir de tests supplémentaires pour définir les temps auxquels les traitements doivent être administrés. Le raffinement du protocole prendra en compte le suivi de la taille des tumeurs à l'aide d'un pied à coulisse afin de s'assurer qu'elles restent inférieures à la taille classiquement utilisée comme point limite en cancérologie chez la souris. Ce suivi individuel permettra la surveillance du bien-être des animaux qui seront hébergés par groupe de cinq à dix dans un établissement agréé. Le nombre d'animaux minimum requis est calculé afin d'assurer une fiabilité statistique. Aussi, afin de limiter l'utilisation de souris, nous évaluerons sur le même animal la fonction des lymphocytes et la croissance tumorale lors d'expérience nécessitant l'utilisation de traitements sur des temps longs.

19369 Le trouble dépressif majeur (TDM) est la principale cause d'invalidité dans le monde. Néanmoins, l'efficacité des thérapies existantes est très limitée et environ 30% des patients ne répondent pas

aux traitements. La psilocybine, un médicament aux effets antidépresseurs rapides et persistants, est utilisée dans le TDM réfractaire aux traitements pharmacologiques conventionnels. La psilocybine pourrait modifier, selon le contexte environnemental de l'individu, l'humeur, l'appétit, la mémoire, la cognition, le sommeil, l'apprentissage et l'anxiété en agissant sur des réseaux neuronaux. L'objectif de ce projet est d'évaluer, chez la souris, si la psilocybine modifie la connectivité fonctionnelle des réseaux neuronaux en fonction du contexte environnemental. Pour cela nous utiliserons une technique d'imagerie par échographie ultrarapide, qui permet l'étude de la connectivité fonctionnelle chez la souris éveillée. Le nombre total d'animaux nécessaire à la réalisation de ce projet est de 502 pour une durée de 5 ans.

Ce projet sera réalisé dans le respect de la règle des 3Rs et met en jeu des procédures chirurgicales, une technique d'imagerie du flux sanguin cérébral basée sur des ultrasons et des tests de comportement.

Remplacement : A l'heure actuelle, il n'existe pas de méthode de remplacement permettant de reproduire la complexité du cerveau, ce qui rend l'utilisation d'un modèle animal indispensable à la réalisation de ce projet. L'analyse de la connectivité sur animal éveillé n'a été mise au point à ce jour que chez la souris.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est le minimum nécessaire permettant une analyse statistique robuste des résultats grâce aux données collectées au cours d'expériences précédentes.

Raffinement : Pour éviter toute souffrance, les procédures de chirurgie se feront sous analgésie et anesthésie générale. Les séances d'imagerie seront réalisées sur animal vigile dont la tête sera immobilisée mais dont le mouvement des pattes ne sera pas entravé ; des séances d'habituation seront effectuées au préalable. Les souris seront observées régulièrement et une grille précise d'évaluation des points limites sera utilisée. Tout signe de douleur, souffrance, angoisse ou stress chez les animaux sera soulagé avec des analgésiques.

A terme, ce projet permettra de démontrer si la psilocybine entraîne une modification de la connectivité fonctionnelle des réseaux neuronaux dépendante des stimuli environnementaux.

19370 L'IL-34 est cytokine impliquée dans le développement de certaines populations de macrophages résidents, de plus notre équipe a montré que les cellules T régulatrices exprimaient cette cytokine aux fonctions régulatrices démontrant son potentiel d'utilisation thérapeutique dans le cadre de patients transplantés ou souffrant de maladies auto-immunes. Des résultats précédents ont mis en évidence que l'absence d'expression de l'IL-34 chez le rat induisait des lymphocytes aux fonctions altérées suggérant une implication de cette cytokine au niveau du thymus. En effet, lors de la maturation des lymphocytes T, leurs précurseurs migrent au niveau du thymus où ils subissent des étapes de sélection permettant d'éliminer les cellules autoréactives, c'est à dire les cellules qui reconnaissent des antigènes du soi qui pourraient être à l'origine du développement de maladies autoimmunes. Ainsi, l'objectif de ce projet est d'étudier l'implication de l'IL-34 lors de la sélection thymique via le développement de chimères. En effet, le développement de chimère via l'injection de cellules chez un receveur irradié permet de remplacer le système immunitaire du receveur par celui du donneur. Ce modèle permettra donc d'étudier le développement de précurseurs des lymphocytes T d'animaux WT (sauvage) chez un animal où l'IL-34 n'est pas exprimé, et vice versa. Cette étude permettrait de découvrir un nouveau rôle de l'IL-34 encore inconnu à ce jour.

Le nombre d'animaux a été réduit à 53.

Ce projet est élaboré dans le cadre du respect de la règle des 3R:

- Remplacer : A ce jour, aucune expérience in vitro ou modélisation informatique ne permet de rendre compte d'un organisme chimérique
- Réduire : Le nombre d'animaux par groupe est réduit au nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs.
- Raffiner : Durant le protocole, les animaux seront suivis pour leur poids et la présence d'éventuels signes de souffrance. Les animaux atteignant une perte de poids de 20% par rapport à leur poids

initial seront euthanasiés, ainsi que les animaux montrant un score >3 (tableau des scores développés plus tard). Les animaux receveurs seront anesthésiés avec un mélange Rompun/kétamine pendant l'irradiation et injectés avec un antibiotique afin de limiter les effets de l'irradiation sublétales et lors de l'injection des cellules, ceux-ci seront anesthésiés par isoflurane.

19371 L'hyperuricémie est définie comme une augmentation du taux d'acide urique sanguin (> 68 mg/l chez l'homme). Cette pathologie est associée à un risque cardiovasculaire accru, au déclin de la fonction rénale et au développement de la goutte. Plusieurs facteurs peuvent expliquer cette hyperuricémie, notamment la diminution de la fraction excrétée de l'acide urique par le rein. À l'inverse, une augmentation de l'excrétion rénale d'acide urique favorise la formation de calculs urinaires. Cette maladie lithiasique peut être particulièrement invalidante et peut, à long terme, entraîner une insuffisance rénale chronique. Récemment, une épidémie de goutte sévère a été décrite dans le nord du Vietnam, région fortement exposée aux dérivés de la dioxine pendant la guerre du Vietnam. Ces patients ne présentent pas les facteurs de risque traditionnels de la goutte (surpoids, syndrome métabolique, consommation de produits riches en purines). Une origine toxique est donc probable, mais le mécanisme n'est pas encore connu. L'exposition aux dioxines pourrait expliquer cette situation. Plusieurs études ont en effet montré que les sujets exposés à la dioxine ont des taux d'acide urique sanguins plus importants. De plus, le gène qui régule l'expression d'un transporteur majeur de l'acide urique (GLUT9) est régulé par le récepteur à la dioxine (AHR). Enfin, une équipe a récemment rapporté la présence de nombreux calculs d'acide urique dans la vessie de souris mutées pour le récepteur AHR.

Nous émettons l'hypothèse que le récepteur de la dioxine aryl hydrocarbon receptor-AHR), exprimé dans le tubule proximal, régule l'excrétion rénale d'acide urique et donc l'uricémie. Le phénotype AHR^{-/-} (AHR KO) n'est pas dommageable pour les animaux.

Nous souhaitons donc évaluer l'impact d'une modulation du récepteur à la dioxine sur le comportement rénal de l'acide urique. Pour cela, nous souhaitons étudier un modèle génétique (souris mutée pour le récepteur AHR) et un modèle pharmacologique (agonistes et antagonistes d'AHR).

Une étude précédente, retrouve une association entre excrétion rénale d'acide urique et AHR). Néanmoins, l'étude des différents transporteurs connus de l'acide urique au niveau du rein et du tube digestif ne permettait pas d'élucider les mécanismes à l'origine de ce phénomène.

Dans ces différents modèles, nous étudierons donc un autre mécanisme imputable, le lien entre le métabolisme du lactate et celui de l'acide urique qui est finement régulé et impacté par la modulation d'AHR.

Nous espérons démontrer qu'il existe un mécanisme rénal de transport de lactate impliquant AHR qui régule le métabolisme de l'acide urique dans ces modèles, permettant d'expliquer l'hyperuricémie et la goutte liés à la dioxine. Ces mécanismes pourraient également permettre de mieux expliquer les troubles du métabolisme de l'acide urique chez les patients diabétiques (goutte, lithiase, hyperuricémie).

Notre modèle et nos procédures expérimentales sont optimisées selon la règle des 3Rs (Remplacer, Réduire, Raffiner). En effet, le modèle vivo est indispensable en raison des multiples interactions qui existent entre les différents récepteurs et leurs ligands au niveau du tubule rénal. Nous optimiserons également les expériences afin d'utiliser des modèles in vitro (culture cellulaire) afin de remplacer au maximum l'utilisation des animaux lors du projet. Le nombre d'animaux sera réduit au minimum à savoir des sous-groupes de 10 animaux, nombre nécessaire afin que nos procédures fournissent des résultats analysables statistiquement. Soit 320 souris au total. Le nombre d'animaux a été calculé par rapport aux données précédemment publiées. Dans tous les cas, nous minimiserons les dommages causés aux animaux en respectant les règles de gestion de la douleur et en veillant au bien-être des animaux lors des expérimentations les procédures seront réalisées sous anesthésie adéquate, les conditions d'hébergements seront respectées afin d'assurer le bien-être des animaux. Le suivi au quotidien sera réalisé.

19372 Les travaux de recherche entrepris au sein de notre équipe de recherche visent à étudier la plasticité structurale et cellulaire de l'hypothalamus au cours du développement embryonnaire et postnatal et à en évaluer le rôle fonctionnel sur deux fonctions physiologiques majeures : l'homéostasie énergétique et la reproduction. Notre objectif principal est de développer nos connaissances sur les modes de communication entre cellules gliales, cellules endothéliales et neurones, ainsi que d'en mesurer la portée à la fois sur le plan cellulaire (migration neuronale, plasticité neurogliale, neurosécrétion, . . .) et physiologique (fonction de reproduction et homéostasie énergétique). Par ailleurs, nous étudions l'impact de la nutrition et du milieu hormonal périnataux sur le métabolisme et la mise en place des circuits hypothalamiques régulant la masse corporelle et l'adiposité et l'apparition de la puberté ainsi que l'impact de la nutrition adulte sur les phénomènes d'hormonorésistance conduisant à l'obésité, au diabète de type 2 et à l'infertilité, mais aussi au développement de maladies neurodéveloppementales et neurodégénératives. Nous étudions également différents paramètres physiologiques chez la souris vivante au cours du développement ou à l'âge adulte, notamment le développement de populations de neurones au cours de la gestation chez l'embryon, l'activité électrique des neurones du cerveau chez la souris adulte éveillée et se déplaçant librement dans sa cage, l'effet d'une stimulation ou d'une inhibition sélective de certaines populations de neurones du cerveau sur le comportement et la physiologie des animaux, et la mesure en continue de paramètres physiologiques tels que les concentrations de glucose dans le sang ou le cerveau.

Les souches de souris utilisées sont les C57Bl6, B6D2 et FVB et le nombre total d'animaux utilisés durant la validité du protocole sera AU MAXIMUM DE 14122 SOURIS; les souches de rats seront les Sprague Dawley et Wistar et le nombre d'animaux utilisé sera AU MAXIMUM DE 310 RATS.

La nature de notre recherche, qui vise à explorer des processus physiologiques et physiopathologiques de grandes fonctions telles que la reproduction, la régulation de l'équilibre énergétique et la cognition, limite sérieusement la possibilité de REMPLACER les animaux utilisés (par exemple, le remplacement des modèles animaux par des systèmes cellulaires ou de tissus n'est pas envisageable). Cependant, la mise en oeuvre des axes de recherche énoncés dans ce projet va permettre de collecter de manière répétée de nombreuses données chez un même animal et donc d'augmenter la puissance statistique de nos résultats, ce qui nous permettra de REDUIRE le nombre d'animaux utilisés. De plus, une attention particulière a été accordée au principe de RAFFINEMENT, en améliorant par exemple les différentes procédures expérimentales à appliquer aux animaux, afin de minimiser l'inconfort ou les souffrances inutiles qu'ils pourraient endurer au cours des manipulations expérimentales.

19373 L'angiogenèse est la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux existants. Pour proliférer, les cellules cancéreuses ont besoin d'être approvisionnées en nutriments et en oxygène. Elles vont déclencher la création de nouveaux vaisseaux sanguins, c'est le processus d'angiogenèse. Les cellules cancéreuses pourront alors continuer leur développement en envoyant des métastases dans d'autres organes via la circulation sanguine.

Les traitements anti-angiogenèse visent à empêcher la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, ou à normaliser les vaisseaux sanguins existants dans les tumeurs afin d'améliorer l'efficacité de la chimiothérapie. Toutes les molécules testées chez l'animal, auront été au préalable validées in vitro. Seules les molécules les plus performantes seront testées.

Afin de tester le potentiel anti-angiogénique de différentes nanoparticules (NPs), nous utiliserons le test des éponges de cellulose. Ces éponges sont implantées sous la peau de l'animal. En fonction des facteurs avec lesquels elles seront imbibées, un réseau vasculaire se développera à leur surface. Ces éponges de cellulose sont stériles et très bien supportées par les animaux. Elles seront chargées en facteurs favorisant l'angiogénèse, auxquels seront ajoutées les molécules à tester. Les éponges seront greffées en sous cutanée à J0. Elles seront ré-injectées, à travers la peau, à J1 et J3. A J7 les éponges sont extraites afin de mesurer la quantité d'hémoglobine présente en périphérie de chaque éponge, ce qui indique leur niveau de néo-vascularisation. En fonction des études, l'angiogenèse, ainsi que son inhibition dans les groupes traités, sera suivie par imagerie de fluorescence non-invasive.

Cette étude nécessitera au total 180 souris.

Les études seront menées dans le respect de la règle des 3R.

Remplacer : Il n'existe pas de modèle non biologique ou in vitro permettant de réaliser ces travaux sans perte d'informations scientifiques.

Réduire : afin de limiter le nombre de lots expérimentaux et compte tenu que les expériences ne sont pas de classe sévère, des cohortes d'animaux pourront être utilisées pour répondre à plusieurs objectifs. De plus, le nombre d'animaux pourra être réduit jusqu'à 50% dans certaines procédures si l'effet attendu est suffisamment important pour obtenir des résultats statistiquement fiables avec la première moitié d'animaux ou si les données se révèlent non pertinentes (arrêt alors des expérimentations).

Raffiner : Les souris seront hébergées à l'animalerie en groupe sociaux, dans un environnement enrichi adapté à leur espèce. L'implantation des éponges sera effectuée selon un protocole optimisé en termes d'anesthésie et d'analgésie afin d'obtenir le maximum d'informations tout en gérant la douleur possible des animaux. De plus, toutes les procédures réalisées soit sur les animaux vigiles sont indolores et elles seront effectuées par des personnes expérimentées et formées. Les séances d'imagerie des animaux se feront sous anesthésie générale gazeuse, ils seront placés sur un tapis chauffant pour maintenir leur température et un gel ophtalmique sera appliqué afin de limiter leur inconfort. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et tout sera mis en œuvre afin que les animaux aient un niveau d'inconfort aussi limité que possible. En cas d'effets inattendus, de perte importante de poids ou d'observation d'un phénomène douloureux, le vétérinaire en charge du bien-être des animaux sera immédiatement alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider de l'interruption de l'expérimentation.

19374 La reproduction saisonnée est une réponse adaptative cruciale pour faire face aux changements environnementaux annuels. Afin de permettre la naissance des petits au printemps, les espèces se reproduisent durant le printemps (gestation courte, hamster) ou durant l'automne (gestation longue, mouton). Nos travaux ont identifié un rôle important pour deux peptides hypothalamiques dans le contrôle de la saisonnalité: RFRP3 (RF-amide Related Peptide 3) et KISS1. Contrairement à KISS1, les modalités d'action du peptide RFRP3 demeurent énigmatiques. En effet, les connaissances actuelles quant au rôle de ce peptide dans la reproduction sont même parfois contradictoires, notamment car les outils pharmacologiques disponibles ne sont pas suffisants pour répondre de façon univoque à la question de son implication. Pour définir de façon claire le rôle du RFRP3 dans le circuit qui régule la reproduction saisonnière nous allons donc invalider le gène chez le mouton, en utilisant la technique CrispR-Cas9 d'édition du génome (Genome editing = GE).

Ces expérimentations s'inscrivent dans le cadre plus large d'un projet qui a pour objectifs de définir en parallèle le rôle du peptide RFRP3 dans la saisonnalité de la reproduction chez le mouton et le hamster, et de mieux caractériser les neurones qui expriment ce peptide.

Pour la partie du projet consacrée à l'étude du rôle du gène *Npvf* (qui encode le peptide RFRP3) chez le mouton, objet de la présente demande d'autorisation, le GE se fera chez des brebis de la race Romanov qui présente plusieurs avantages. C'est une race poly-ovulante, avec une prolificité d'environ 2,5 (c'est à dire en moyenne 2,5 agneaux/agnelles par mise-bas) et les brebis présentent un comportement maternel très marqué, favorable à la survie des petits. La production des animaux édités se fera sur une ou deux années, selon les résultats obtenus lors de la 1ère année. La décision de poursuivre en 2ème année dépendra du nombre, du sexe et du génotype des animaux GE. Effectivement, il est nécessaire d'obtenir des moutons édités de sexe mâle (i. e. agneaux) afin de pouvoir générer une descendance suffisante pour étudier l'impact sur le phénotype saisonnier. Les expériences se dérouleront durant la saison de reproduction afin de faciliter les procédures. Chaque année, 4 expériences seront menées et, pour chaque expérience 12 brebis seront nécessaires (6 brebis donneuses d'ovocytes fécondés et 6 brebis qui recevront ces ovocytes fécondés après GE). Pour ce projet, nous utiliserons donc un maximum de 96 brebis Romanov. A partir du moment où 4 agneaux porteurs de mutations pour les deux copies du gène *Npvf* (édition bi-allélique) seront obtenus, les essais s'arrêteront et les expériences suivantes seront annulées. Ces agneaux de F0

serviront de fondateurs. Il est donc possible que ce projet engage moins d'animaux que les 96 prévus. Néanmoins, l'obtention d'animaux bi-alléliques pour Npvf dès la F0 demeure incertaine. Dans le cas où seuls des agneaux mono-alléliques seraient obtenus, un schéma d'élevage classique avec back-cross (croisement des brebis F1 avec le fondateur F0) serait envisagé afin d'obtenir des individus homozygotes pour la mutation du gène Npvf. La saisonnalité de la fonction de reproduction est caractérisée par des fluctuations cycliques annuelles des taux sanguins de nombreuses hormones (e. g. hormone lutéinisante (LH), hormone folliculostimulante (FSH), Progesterone et estradiol) qui seront donc dosées afin d'évaluer une éventuelle perturbation de cette fonction. La fertilité des animaux GE sera également évaluée par saillie naturelle. Il s'agit exclusivement d'un projet de recherche fondamentale, aucune application agronomique n'est envisagée. Dans le cas où les brebis seraient désaisonnées, ou présenterait un avantage reproductif quelconque, il n'est pas question qu'elles puissent être utilisées à des fins d'élevage et de consommation. Selon la directive de l'UE (25 Juillet 2018) les animaux édités par CrispR-Cas9 sont considérés comme des OGM et doivent donc être traités en tant que tel. La reproduction saisonnée affecte virtuellement toutes les espèces (plantes et animaux) qui vivent à des latitudes tempérées ; la compréhension des mécanismes de la saisonnalité et du photopériodisme va donc bien au-delà des questions d'agronomie. Il s'agit notamment d'un enjeu dans le contexte du réchauffement climatique.

Nos protocoles expérimentaux se conforment à la règle des 3R :

Remplacement : L'étude du RFRP3 et des neurones exprimant ce peptide ne peut être envisagée ex vivo car elle concerne un mécanisme complexe sur organisme entier. Les outils CrispR/Cas9 seront testés sur des ovocyte fécondés (=cellules-œufs) bovins produits in vitro à partir d'ovaires collectés en abattoir afin de valider les outils les plus efficaces pour réaliser les expérimentations sur la brebis.

Réduction : Nos protocoles utilisent un nombre minimal d'animaux, défini d'après les expériences antérieures des partenaires du projet. Ces protocoles permettent de diminuer le nombre de procédures expérimentales.

Raffinement : Tous les protocoles se font dans le respect du bien-être animal. Nous limiterons au maximum la souffrance des animaux avec l'utilisation d'anesthésiques et d'analgésiques lors du transfert chirurgical des embryons (terme employé à partir du stade 2 cellules) édités chez les brebis receveuses. Les femelles receveuses seront hébergées en petits groupes (espèce grégaire) dans un bâtiment conditionné pour accueillir des animaux génétiquement modifiés (agrément OGM). Une surveillance quotidienne des animaux sera effectuée par les responsables du bien-être animal. Si un animal devait présenter des signes de douleur, de stress ou d'inconfort, comme une prostration, une absence de déplacement après une stimulation physique ou tout autre critère défini comme point limite, nous solliciterions le vétérinaire référent pour trouver une solution. Si aucune solution n'était envisageable, l'animal serait euthanasié. Finalement, en l'état actuel de nos connaissances, aucun phénotype dommageable de la mutation du gène Npvf n'est envisagé.

19375 Le sepsis est défini comme une infection de l'organisme par un agent pathogène, qui conduit à une dysfonction d'organe menaçant le pronostic vital. En s'aggravant, le sepsis peut conduire au choc septique, stade le plus grave de l'infection, qui est responsable chaque année de nombreux décès dans les services de réanimation (30 à 45%) malgré une prise en charge optimale. Les raisons pour lesquelles une bactérie peut être responsable d'une infection contrôlée ou d'un choc septique fatal ne sont pas encore complètement comprises. Une recherche scientifique est donc nécessaire pour mieux comprendre les mécanismes du sepsis et du choc septique, afin de trouver de nouveaux traitements.

Une des principales caractéristiques du sepsis est le développement d'une inflammation excessive et non contrôlée, qui a des conséquences délétères sur l'organisme pouvant conduire au décès. On sait par exemple que les globules blancs, en particulier les polynucléaires neutrophiles, jouent un rôle central dans la réaction inflammatoire. Par contre, on connaît beaucoup moins bien le rôle joué par les plaquettes sanguines. Celles-ci sont bien connues pour leur rôle clé dans l'arrêt du saignement, en s'accumulant au site de lésion vasculaire pour former un agrégat qui arrête les

saignements. Dans le sepsis et le choc septique, les plaquettes activées peuvent être à l'origine de thromboses des vaisseaux de la microcirculation, favorisant les défaillances des organes et pouvant conduire au décès. L'activation des plaquettes peut être inhibée pharmacologiquement avec des médicaments utilisés en clinique comme antithrombotique.

Ce projet vise à évaluer l'impact de l'inhibition de l'activation des plaquettes dans le choc septique. Il sera réalisé à l'aide d'un modèle de sepsis chez souris, d'origine polymicrobienne, par péritonite. A terme, ce travail permettra de mieux comprendre le rôle des plaquettes sanguines dans le choc septique et, potentiellement, d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour des traitements plus efficaces.

Réduire : Les nombres d'animaux utilisés lors des expériences seront réduits au minimum nécessaire, avec la contrainte d'obtenir des données statistiquement significatives (test statistique t-test, one way ou two-way ANOVA, selon les questions posées et les expériences). Ce nombre a été réduit à un lot de 3 souris pour la chirurgie sham et à 10 souris pour la chirurgie CLP. Le maximum de tissus sera prélevé sur un même animal.

Raffiner : Afin de limiter l'angoisse, l'inconfort, le stress et la douleur associés, les expériences sont raffinées :

- Tout au long de leur vie, les animaux sont hébergés dans des cages individuellement ventilées contenant un nid en coton compressé et de la frisure de papier Krafft afin de leur permettre d'exprimer leur comportement de nidification naturel et de d'organiser leur environnement.

- Au moins 48h avant la procédure, les animaux sont répartis par groupes et mis dans les cages qu'ils occuperont tout au long du processus. Du gel nutritif est inséré dans la cage afin de familiariser les animaux à ce nouvel aliment qui facilitera la prise de nourriture et l'hydratation après la chirurgie.

- le maximum d'expériences sera réalisé sur des animaux anesthésiés. En plus de l'anesthésie générale à l'isoflurane, une anesthésie locale est effectuée par injection sous-cutanée de lidocaïne (Xylovet ND, forme injectable) et de bupivacaïne.

- Une analgésie est pratiquée par administration de Vetergesic® (buprénorphine) à toutes les 6h et ce, dès la fin de la chirurgie.

- les expériences auront une durée limitée dans le temps ;

- en fin d'expérience, le sang sera prélevé à l'aorte des animaux anesthésiés.

Remplacer : Dans la mesure du possible, les expériences in vivo sur souris seront remplacées par des études in vitro sur cellules. A l'issue de ce protocole, une évaluation rétrospective sera réalisée.

L'ensemble de ces expériences nécessitera 172 souris.

19376 A l'heure actuelle, 80% des nouvelles infections par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) se produisent au cours d'un rapport sexuel, avec une transmission du virus par voie muqueuse. Jusqu'à présent, la majorité des études menées sur les mécanismes de ce type de transmission du VIH est focalisée sur le rôle des particules virales libres. Or les cellules infectées par le VIH, présentes dans les sécrétions génitales, jouent également un rôle important dans la transmission de l'infection. Afin de développer des méthodes de prévention efficaces contre l'infection par le VIH, il est nécessaire d'évaluer les stratégies dans des modèles d'infection par voie muqueuse où des virus libres, mais également des cellules infectées, sont présents dans l'inoculum viral.

L'objectif de ce projet est de déterminer l'efficacité préventive d'un composé à visée microbicide dans un modèle animal de transmission de l'infection par voie muqueuse par des cellules infectées. Dans ce modèle, un gel microbicide comprenant un anticorps neutralisant à large spectre (bNAbs) sera testé. Cet anticorps a montré son efficacité à bloquer l'infection de plusieurs souches du virus VIH, dans des études in vitro. Le gel sera administré avant l'inoculation des cellules infectées pour évaluer le blocage par les bNAbs de la transmission in vivo du VIH associée aux cellules.

Le modèle animal choisi pour ce projet est le primate non humain (PNH). Il est aujourd'hui impossible de reproduire in vitro la complexité d'une infection par le VIH. Le recours à un modèle animal est la seule façon de suivre et d'analyser l'effet du traitement dans le temps, dès la phase initiale de l'infection, et de pouvoir observer d'éventuels effets secondaires. est nécessaire pour

apporter un maximum d'informations et mieux caractériser les nouvelles pistes de recherche pour le développement de méthodes préventives efficaces. Le macaque, par sa proximité génétique avec l'être humain, est le modèle le plus pertinent pour obtenir des résultats prédictifs et transposables à l'Homme. De plus, l'infection du macaque par des souches pathogènes du virus de l'immunodéficience simienne reproduit l'infection humaine par le VIH.

Il est prévu d'utiliser, sur une durée de 3 ans, au maximum 16 animaux nés et élevés en captivité dans un établissement reconnu. Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux sera réduit au minimum nécessaire permettant une interprétation statistique des résultats. Les méthodes expérimentales (prélèvements sanguins, tissulaires et inoculations virales) ont été définies de manière à éviter toute souffrance lors des interventions (manipulations sur l'animal sous anesthésie générale ; limitation des volumes sanguins prélevés). Des critères d'arrêt de l'étude sont prévus pour prendre en compte d'éventuels effets inattendus et en cas de progression de la maladie. Cela permettra d'intervenir immédiatement, avec un recours au vétérinaire de l'installation pour mettre en œuvre les traitements appropriés. Les animaux seront hébergés en groupe avant le début de l'étude, puis en hébergements individuels dans des modules contigus permettant des interactions sociales pendant l'étude. Ils bénéficieront d'un programme défini par la cellule « bien-être animal » de l'établissement pour l'enrichissement de leur milieu de vie, renforcé lors des phases d'hébergement individuel.

19377 La douleur chronique (DC) est une pathologie qui a une diffusion impressionnante en Europe et exige une dépense sanitaire de milliers de million d'euros. Aujourd'hui il n'existe pas de traitements pharmacologiques vraiment efficaces pour soigner la DC. La difficulté thérapeutique est liée au fait que le vrai siège de la maladie est dans le cerveau et en particulière dans le thalamus et le cortex cérébral. Du point de vue neurologique, la DC est caractérisée par de nombreuses anomalies de l'activité des cellules nerveuses. Ces anomalies provoquent une réduction du flux des informations sensorielles, c'est à dire de la transmission des signaux nerveux générés dans le corps et dirigés vers le cerveau. Aussi, ces signaux deviennent plus confus dans le cas du DC et le cerveau n'est pas capable de bien les interpréter. Des études préliminaires conduites en imagerie par résonance magnétique sur des patients souffrants de douleur chronique ont permis de découvrir que le cortex sensoriel présentait des modifications macroscopiques importantes de son architecture dans les six couches de cellules nerveuses qui le compose. Toutes les anomalies macroscopiques ont une origine microscopique. Notre projet est d'observer ces anomalies microscopiques, concernant notamment la microarchitecture des neurones dans leurs relations avec les cellules de support et de nourriture (cellule gliales) et aussi des micros vaisseaux sanguins et de leur interrelation avec un modèle de rat.

Le but principal de cette recherche est de vérifier ces observations en étudiant de façon systématique les petits vaisseaux du cortex en utilisant l'imagerie tomographique à très haute résolution, effectuée sur des cerveaux prélevés à des animaux souffrants de DC à des stades différents. De plus, des groupes d'animaux, pris à des stades différents après l'apparition du DC, seront irradiés avec des microfaisceaux de rayons X de basse énergie et spatialement séparés. L'objectif de cette irradiation est de parcelliser le cortex en plusieurs zones, pour pouvoir étudier, par imagerie tomographique post-mortem, les interactions entre ces modifications survenues entre les vaisseaux et la microstructure nerveuse, suite à cette parcellisation. Si ces observations préliminaires se conforment, il serait possible de définir un nouvel modèle d'interprétation de la douleur chronique connue un syndrome complexe provoque non seulement par une activité neuronale anormale mais aussi par une mauvaise relation structurelle entre vaisseaux et neurones. Cette interprétation permettrait aussi d'envisager une nouvelle stratégie thérapeutique.

Toute l'activité expérimentale sera conduite sur des rats, et en particulier, sur le plus petit nombre de rats possible pour obtenir des valeurs statistiquement significatives.

Il n'existe pas de modèle de DC in-vitro, la DC doit être étudié dans la complexité d'un organisme vertébré vivant. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée en cas de signes de douleur aigüe. On utilisera un total de 202 rats, divisés en 25 groupes: un groupe d'animaux de contrôle sans

aucune application des modèles de douleur chronique et 24 groupes après la génération de deux typologies de DC et traitées (ou pas) avec les faisceaux de rayonnement X soit des groupes de 8 individus ce qui est un chiffre minimum pour des observations statistiques.

19378 La surdité, altération quantitative ou qualitative de l'acuité auditive peut toucher une seule oreille, surdité unilatérale, ou les deux oreilles, surdité bilatérale, et être plus ou moins sévère. En fonction de leur sévérité, les pertes auditives peuvent avoir des conséquences variables sur la vie des patients : impacts négatifs sur l'acquisition du langage oral, sur l'apprentissage scolaires et le développement cognitif, conséquences sur la vie sociale, déclin cognitifs chez les personnes âgées pouvant conduire à des altérations de la mémoire ou à la survenue de démence de type maladie d'Alzheimer... L'OMS estime que 466 millions de personnes présentent des troubles auditifs dans le monde. En France, environ 6 millions de malentendants sont recensés soit 8 à 10 % de la population. La surdité affecte 6% des 15-24 ans et plus de 65% des 65 ans et plus.

Il existe plusieurs façons de classer les surdités en fonction de :

- Leur origine : les surdités dites de naissance (génétiques ou acquises in utero) se distinguent des surdités survenant au cours de la vie qui peuvent être d'origines infectieuses (méningites bactériennes, rougeole, otite chronique de l'enfant), médicamenteuses (dues à des effets indésirables ototoxiques d'antibiotiques, d'anticancéreux...) ou mécaniques (blessures, traumatismes sonores, exposition au bruit...). Le vieillissement peut conduire à une perte d'audition ou presbyacousie qui apparait le plus souvent à partir de 50-60ans.

- La structure touchée : les surdités de transmission ou de conduction qui résultent d'une anomalie de l'oreille externe ou de l'oreille moyenne sont opposées aux surdités neurosensorielles ou de perception caractérisées par des atteintes de l'oreille interne (cochlée) ou du nerf cochléaire. Les surdités mixtes quant à elle résulte d'une surdité de perception et de transmission.

Bien que des traitements et chirurgies existent (aides auditives conventionnelles pour rétablir la conduction aérienne, aides en conduction osseuse, implants d'oreille moyenne ou implants cochléaire...) l'audition, dans bien des cas, n'est pas totalement restaurée. Il apparait donc nécessaire de continuer les recherches afin d'approfondir les connaissances sur les gènes liés aux formes congénitales de surdité, d'identifier des facteurs de vulnérabilité au bruit ou à la perte de cellules ciliées cochléaires ou de fibres nerveuses mais aussi d'améliorer les traitements et le diagnostic des troubles auditifs. De plus, le développement de thérapie génique pourrait également permettre des progrès considérables dans la prise en charge des surdités.

Les études restent toutefois limitées chez l'homme car le système auditif (notamment l'oreille interne et les composantes nerveuses et cérébrales) n'est que difficilement accessible et le prélèvement d'échantillon est complexe voir dangereux pour le patient. D'autre part, les modèles de cultures cellulaires ne permettent pas de refléter la structure complexe du système auditif et les interactions entre les différentes structures qui le composent et ne peuvent complètement remplacer le recourt aux modèles animaux. L'utilisation de modèles de rongeurs mimant les troubles auditifs est donc essentielle afin d'obtenir une meilleure compréhension de leurs développements et/ou et de favoriser la mise au point de traitements thérapeutiques.

L'objectif du présent projet est de maintenir en élevage et de produire des lots animaux génétiquement altérés souris et/ou rat qui seront destinés à la poursuite de la caractérisation de ces modèles précliniques de surdités ainsi qu'au développement et à l'identification de nouveaux candidats médicaments.

Afin de satisfaire au raffinement, l'hébergement des animaux sera réalisé dans des locaux adaptés, avec un enrichissement systématique des cages (bâtons de bois à ronger et matériel de nidification) et un personnel habilité qui réalisera les différentes procédures en respectant les règles d'éthiques, le bien-être animal et le principe des 3R. Nos surveillances quotidiennes nous permettront d'identifier d'éventuels animaux en souffrance et de prendre les mesures nécessaires (surveillance accrue, mise à mort dans les cas les plus graves selon une méthode recommandée par la réglementation et approuvée par le comité d'éthique et la Structure Bien-être Animal).

Pour pouvoir constituer les lots requis pour ces études, nous estimons qu'est nécessaire sur 5 années de recherche un total de de 40 animaux génétiquement modifiés ayant un phénotype léger qui seront hébergés sur notre site 2. Ces quantités comprennent les animaux nécessaires au maintien de la lignée et ont été calculées de manière à produire le nombre d'animaux requis pour les expériences et études prévues. Dans un souci constant d'appliquer la règle des 3R, notre savoir-faire et l'optimisation de nos protocoles permettront d'utiliser peu d'animaux avec la garantie d'un rendement maximum.

19379 L'Adénosine-TriPhosphate extracellulaire (ATPe) est une molécule de signalisation permettant de réguler l'activité des cellules immunitaires. L'ATPe est libéré en grande quantité lors de situations physiopathologiques par des cellules en état d'activation et/ou en état de souffrance ou de stress cellulaire telle qu'une stimulation importante ou un stress oxydatif. Par conséquent, sa concentration peut être élevée au niveau des sites inflammatoires ou dans l'environnement tumoral. Au niveau immunitaire, la présence d'ATPe est un signal de danger capable, au travers du récepteur P2RX7, d'activer l'immunité innée et de stimuler le développement d'une réponse immunitaire adaptative conduisant à une amplification de l'inflammation.

Le récepteur P2RX7, thématique de nos recherches, a un rôle complexe dans le cancer puisqu'il peut être, suivant le contexte, pro- et anti-tumoral. L'activation de P2RX7 présent sur les cellules immunitaires par l'ATPe conduit à une réponse pro-inflammatoire et donc anti-tumorale. Cependant, P2RX7 est également exprimé par certaines cellules tumorales. Dans ce contexte, son activation peut stimuler la croissance et le potentiel métastatique de ces tumeurs. Il est donc important d'étudier le rôle de P2RX7 dans le cancer et notamment les effets de son activation ou de son blocage.

Les objectifs de ce projet de recherche sont :

- i) De mieux comprendre le rôle de P2RX7 dans le cancer, d'une part sur le microenvironnement tumoral et donc sur les cellules immunitaires, et d'autre part sur les cellules tumorales elles-mêmes.
- ii) De valider l'intérêt thérapeutique d'une nouvelle classe d'anticorps, les « nanocorps », ciblant P2RX7 dans le cancer.

Pour cela, nous utiliserons les méthodes et modèles expérimentaux suivants :

- i) Des modèles de souris génétiquement modifiées dans lesquels le récepteur P2RX7 a été soit invalidé dans l'ensemble des cellules soit de façon conditionnelle dans des populations cellulaires d'intérêt.
- ii) Des souris injectées avec des vecteurs de thérapie génique de type AAV (virus Adéno-associés) codant pour des « nanocorps » fonctionnels produits in situ capables de bloquer ou d'activer le récepteur P2RX7 in vivo. L'injection intramusculaire de ces vecteurs est réalisée sous anesthésie.

Dans chacun de ces modèles, une greffe hétérotypique syngénique sera réalisée. Elle consiste en l'injection sous-cutanée sur un flanc de l'animal de cellules tumorales provenant de la même espèce pour éviter les réactions de rejet. Cela permet le suivi de la croissance tumorale. Une fois l'injection réalisée, l'état général des animaux sera suivi quotidiennement, de façon à évaluer l'atteinte de points limites mettant fin au protocole, le tout en accord avec les objectifs de notre étude.

Les expérimentations envisagées ici reposent sur l'utilisation de souris d'élevage. Les groupes expérimentaux envisagés comprennent 8 animaux par groupe afin de pallier aux variabilités inhérentes à ce type de modèles expérimentaux et permettre une analyse statistique fiable. Dans certains cas, les résultats devront être confirmés afin de s'assurer de la reproductibilité des expériences comme l'exige les standards scientifiques internationaux. Le nombre maximal de souris d'élevage utilisé dans cette étude est estimé à 1280.

L'ensemble de cette étude a été conçue pour respecter la règle des 3R :

RAFFINEMENT :

Les procédures expérimentales peuvent engendrer une douleur modérée. Pour la limiter, nous avons établi une grille d'observation visant à définir des points limites à partir desquels l'expérience sera arrêtée et cadrant les mesures prises à l'apparition des premiers signes de douleur. Dans le

cas où les animaux semblent ressentir de la douleur, de la buprénorphine pourra être utilisée (0,05 mg/kg). Un enrichissement du milieu est également apporté par des abris de cellulose et des carrés de coton vierge.

REDUCTION :

Une étude approfondie de la littérature a été menée avant d'initier ce projet pour s'assurer de l'absence de résultats publiés s'approchant des objectifs de notre étude. Le nombre d'animaux utilisé lors des expériences sera établi de façon à obtenir des résultats statistiquement significatifs.

REMPACEMENT :

Il n'existe pas actuellement de modèle in vitro permettant d'évaluer les interactions entre les différents compartiments cellulaires (cellules du système immunitaire, cellules tumorales, etc.). Ainsi, la faisabilité et l'efficacité d'une nouvelle approche à visée thérapeutique a recours à un modèle animal.

Ce projet est financé par l'Institut National du Cancer (INCa) et par l'ANR-DFG (projet franco-allemand) après évaluation par des comités scientifiques indépendant.

19380 Avec plus de 650 millions de personnes touchées dans le monde en 2016, l'obésité est un problème de santé public majeur, notamment chez les femmes. En effet, les femmes obèses ont un risque plus élevé de développer une infertilité ainsi que plusieurs maladies mortelles, dont le diabète, les maladies coronariennes et les cancers. Cependant, les traitements pharmacologiques actuels contre l'obésité ne sont pas très efficaces, et les régimes ou l'exercice physique ne conduisent qu'à une perte de poids temporaire, qui est suivie très souvent d'un retour rapide au poids initial à la fin de ces interventions, ce que l'on appelle "l'effet yo-yo".

Pour envisager de nouvelles thérapies, il est nécessaire de mieux comprendre les mécanismes biologiques responsables de cette maladie, et le cerveau se révèle être un organe clé dans ce contexte. Plus précisément, une région du cerveau appelée hypothalamus joue un rôle majeur dans la régulation du poids corporel et de la glycémie (taux de sucre dans le sang), chez les deux sexes. Un nombre important de patients obèses présentent une activité altérée des neurones de l'hypothalamus, ce qui est considéré comme une « marque distinctive » de l'obésité puisque ce défaut neuronal prédispose significativement ces patients à accumuler de la masse grasse et à développer plusieurs complications létales de l'obésité. Néanmoins, les mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacents ont jusqu'à présent été explorés principalement chez des animaux mâles, et très peu d'informations sont disponibles concernant le rôle joué par ces mécanismes dans la progression de l'obésité chez les femelles.

L'objectif principal de notre projet est de déterminer le rôle d'une molécule récemment découverte qui, d'après nos données préliminaires, régule l'activité « correcte » de certains neurones de l'hypothalamus. Nous avons observé que si l'on perturbe l'action de cette molécule au sein de ces neurones-là, le développement de l'obésité s'en trouve favorisé, de façon encore plus importante chez les souris femelles que chez les mâles. Ainsi, nous faisons l'hypothèse que cette molécule est particulièrement pertinente pour la physiopathologie de l'obésité chez la femme. Dans ce projet, nous proposons d'étudier les principaux processus biologiques par lesquels cette molécule influence le poids corporel, la prise alimentaire et la régulation de la glycémie chez des souris femelles. Pour ce faire, nous évaluerons l'évolution pondérale, la prise alimentaire, la dépense énergétique et la régulation de la glycémie chez des souris transgéniques pour lesquelles notre molécule d'intérêt est absente de certains neurones de l'hypothalamus. Certaines de ces souris auront également les ovaires retirés pour étudier l'impact des hormones sexuelles dans ce contexte. Cette recherche pourrait nous aider à mieux comprendre les causes biologiques de l'obésité chez la femme, ce qui constitue une première étape nécessaire à la génération de nouveaux médicaments anti-obésité plus efficaces pour les deux sexes.

Au total, nous utiliserons un maximum de 408 souris sur 5 ans, dans le respect du principe des 3R, détaillés ci-dessous.

Remplacer : la souris est le modèle de choix pour notre projet car il nous permet d'étudier des individus génétiquement modifiés dont la physiologie générale est suffisamment proche de celle de

l'être humain. Ainsi, nous serons en mesure d'obtenir des informations médicalement pertinentes. De plus, les mécanismes biologiques que nous étudions (équilibre énergétique et glycémie) impliquent un processus de communication entre le cerveau et le reste du corps. Il est donc nécessaire d'étudier un organisme vivant entier, qu'aucune méthode *in vitro* ou *in silico* ne peut remplacer.

Réduire : nous avons optimisé les protocoles afin de minimiser le nombre de souris utilisées : des tests de puissance statistique ont été utilisés pour prédire le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir des résultats statistiquement fiables.

Raffiner : une attention particulière sera accordée au bien-être des animaux. Les souris seront logées dans des cages collectives dans une pièce dédiée, avec une régulation de la température, de l'humidité et de la lumière. L'enrichissement des cages permettra en outre aux animaux de reproduire certains comportements naturels : carrés de cellulose pour la nidification, bâtonnet en bois pour ronger, tunnel en carton pour se cacher. Avant chaque expérience, les animaux seront manipulés fréquemment pour les habituer aux expérimentateurs et ainsi réduire leur stress. Pour étudier finement le comportement alimentaire et la dépense énergétique des animaux, il nous sera nécessaire de les isoler ponctuellement. Cette expérience se déroulera au sein de « cages métaboliques » individuelles hermétiques, qui reproduisent les conditions d'hébergement classique, mais en l'absence de contacts sociaux. Ce manque d'interaction sera néanmoins de courte durée, l'expérience ne durant qu'une semaine, à l'issue de laquelle les animaux seront remis en cages collectives. La chirurgie réalisée pour le retrait des ovaires sera réalisée sous anesthésie générale et sur tapis chauffant pour prévenir tout risque d'hypothermie. Un protocole analgésique associant un morphinique et un anti-inflammatoire sera également mis en place. Enfin, pour chaque procédure du projet, des points limites précoces et terminaux ont été définis, afin d'éviter toute souffrance qui ne pourrait être soulagée.

19381 Chez l'homme comme chez la souris l'administration d'hormones thyroïdiennes augmente la dépense d'énergie. Il existe un lien direct entre ces hormones et la température corporelle. Elles sont en particulier nécessaires lors d'une exposition au froid longue pour permettre le maintien de la température. Les hormones thyroïdiennes peuvent agir soit dans le cerveau où elles stimulent le système nerveux sympathique qui utilise la voie nerveuse pour stimuler les organes métaboliques, soit directement dans ces organes métaboliques comme le tissu adipeux brun. Ce dernier est spécialisé dans la dissipation d'énergie et la production de chaleur. Chez la souris lors d'une exposition au froid mais aussi à 23°C, le tissu adipeux brun produit de l'hormone thyroïdienne localement, ce qui permet le maintien de la température corporelle. Les individus hypothyroïdiens ont des difficultés à maintenir leur température corporelle lorsqu'ils sont exposés au froid. Cependant des études récentes ont aussi démontré que les hormones thyroïdiennes participaient au développement du tissu adipeux brun durant la période périnatale. Ce tissu qui commence à se développer à la fin de la période embryonnaire, devient clairement repérable à la naissance et sa taille augmente durant la période périnatale. Cette augmentation de taille résulte d'une prolifération des cellules de ce tissu mais aussi de l'augmentation de la taille de chacune des cellules qui le constituent par accumulation de lipides. La période de prolifération est particulièrement importante durant la deuxième semaine postnatale pour devenir quasi inexistante par la suite. Durant cette deuxième semaine postnatale, les concentrations circulantes d'hormones thyroïdiennes augmentent fortement pour redescendre ensuite. Dans ce projet nous étudierons si une hypothyroïdie limitée à la période de développement du tissu adipeux brun, impacte sa capacité à produire de la chaleur lors d'une exposition au froid ou à un régime obésogène à l'âge adulte, deux situations où la thermogenèse est fortement activée et pendant lesquelles le tissu adipeux brun est recruté.

Pour cela nous utilisons des souris gestantes nourries avec une alimentation contenant un traitement pharmacologique pour les rendre hypothyroïdiennes. Ces souris seront maintenues sous ce régime après la mise bas pendant 14 jours afin que les petits de leurs portées soient aussi hypothyroïdiens au moment où leur tissu adipeux brun se développe. Un retour à une nourriture normale et donc à un statut thyroïdien normal sera ensuite rétabli par retour à un aliment normal.

Lorsque les petits auront atteint six semaines, leur capacité à la thermogénèse sera testée dans deux conditions étudiées dans deux procédures différentes, 1) à résister à une exposition au froid ; 2) à limiter le développement de l'obésité lorsque nourries avec un régime obésogène. Pour la procédure 1 les animaux sont équipés de transpondeurs sous-cutanés qui permettent de suivre la température des animaux sans les manipuler. En fin de procédure 2 les souris seront soumises à des tests permettant d'évaluer leur capacité de régulation métabolique. Ces tests impliquent une injection (glucose ou insuline selon les cas) et le prélèvement de gouttes de sang pour doser le glucose sanguin.

Aucun modèle *in vitro* ne peut se substituer au modèle animal pour ce type d'études physiologiques qui impliquent la communication entre différents organes et des effets au cours du temps. Les mécanismes sont complexes et doivent être envisagés à l'échelle de l'organisme entier.

Un suivi adapté à chaque procédure a été mis en place et des points limites suffisamment prédictifs ont été fixés pour éviter toute souffrance des animaux et au-delà desquels la procédure est arrêtée. Le maintien en groupes sociaux et l'utilisation d'anesthésiques permettent aussi d'éviter le stress et de limiter tout risque de souffrance. Le nombre minimal d'individus nécessaires a été calculé au plus juste pour permettre l'obtention de résultats statistiquement significatifs.

Ce projet permettra donc de déterminer l'impact d'une hypothyroïdie précoce sur la capacité d'un adulte « euthyroïdien » à produire de la chaleur en condition de stress thermique et à dépenser de l'énergie en présence d'un régime obésogène.

L'ensemble de ce projet utilisera au maximum 336 souris.

19382 Avec l'allongement de l'espérance de vie de la population, les pathologies liées au vieillissement deviennent un enjeu sanitaire majeur. Au niveau du muscle, le vieillissement musculaire s'accompagne d'une perte de masse musculaire, d'une diminution du nombre et de la taille des fibres et d'une perte de force. Les mécanismes, notamment moléculaires, intervenant dans l'homéostasie musculaire restent encore mal compris. La protéine GDF5 (Growth Differentiation Factor 5) est impliquée dans ces mécanismes de maintien de la masse musculaire.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'effet de cette protéine sur la masse musculaire chez des souris âgées. Pour cela, l'imagerie par Résonance Magnétique Nucléaire (IRM), méthode non-invasive et atraumatique, représente une méthode de choix pour évaluer la masse musculaire *in vivo* et est utilisée depuis des décennies dans le diagnostic des maladies neuromusculaires grâce à ses contrastes d'imagerie adaptés à l'évaluation du muscle.

Le nombre total d'animaux utilisés dans ce projet sera de 30 souris C57Bl/6 JRj. Ce nombre a été calculé pour avoir des groupes constitués de minimum 5 animaux afin de pouvoir réaliser une analyse statistique et permet de répondre à la règle des 3R.

A ce jour il n'existe pas de méthode alternative *in vitro* mimant la complexité de l'architecture du tissu musculaire et possédant ses capacités contractiles et métaboliques. Concernant le premier R de la règle des 3R, Remplacer, il n'est donc encore possible de remplacer les évaluations dans des modèles animaux. Cependant, l'IRM est une technique de choix pour remplacer des méthodes invasives telles que l'histologie.

Pour répondre au second R de la règle, Réduire, l'IRM apparaît comme étant une méthode de choix par son caractère non-invasif et atraumatique car elle permet la réutilisation des animaux. De plus, nous couplerons l'IRM à haut champ 7 tesla avec la technologie Cryoprobe afin d'atteindre des hautes résolutions en coupe transversales de l'ordre de $40 \times 40 \mu\text{m}^2$ sur une épaisseur de coupe de $200 \mu\text{m}$ augmentant alors significativement notre précision sur l'évaluation du volume musculaire. La minimalisation de la variabilité entre individus sera effectuée en utilisant qu'un fond génétique C57Bl/6J Rj et un seul sexe, femelle pour tous les animaux. Même si les animaux seront réutilisés de deux projets distincts, ces derniers proviendront d'un même fournisseur et dans les mêmes conditions d'hébergement pour minimiser les variations sanitaires.

Enfin, pour répondre au 3ème R, Raffiner, et limiter l'angoisse et la souffrance des animaux, les animaux seront hébergés en groupes dans des cages jetables sur portoirs ventilés avec enrichissement (tube en cartons et papier absorbant pour la confection de nid). Si besoin de la

nourriture pourra être déposée dans la cage. Le relevé des paramètres de l'hébergement (température, hygrométrie) ainsi que l'observation des animaux seront faits quotidiennement par du personnel compétent. Pendant les acquisitions, les animaux seront sédatisés par inhalation d'un mélange O₂/isoflurane et la fréquence respiratoire sera contrôlée tout au long de l'examen. La température corporelle de l'animal sera quant à elle maintenue stable autour de 37°C grâce à un tapis chauffant.

Des points limites relatifs au comportement de l'animal et à son état général ont été définis.

19383 La surdité, altération quantitative ou qualitative de l'acuité auditive peut toucher une seule oreille, surdité unilatérale, ou les deux oreilles, surdité bilatérale, et être plus ou moins sévère. En fonction de leur sévérité, les pertes auditives peuvent avoir des conséquences variables sur la vie des patients : impacts négatifs sur l'acquisition du langage oral, sur l'apprentissage scolaires et le développement cognitif, conséquences sur la vie sociale, déclin cognitifs chez les personnes âgées pouvant conduire à des altérations de la mémoire ou à la survenue de démence de type maladie d'Alzheimer... L'OMS estime que 466 millions de personnes présentent des troubles auditifs dans le monde. En France, environ 6 millions de malentendants sont recensés soit 8 à 10 % de la population. La surdité affecte 6% des 15-24 ans et plus de 65% des 65 ans et plus.

Il existe plusieurs façons de classer les surdités en fonction de :

- Leur origine : les surdités dites de naissance (génétiques ou acquises in utero) se distinguent des surdités survenant au cours de la vie qui peuvent être d'origines infectieuses (méningites bactériennes, rougeole, otite chronique de l'enfant), médicamenteuses (dues à des effets indésirables ototoxiques d'antibiotiques, d'anticancéreux...) ou mécaniques (blessures, traumatismes sonores, exposition au bruit...). Le vieillissement peut conduire à une perte d'audition ou presbycousie qui apparait le plus souvent à partir de 50-60ans.

- La structure touchée : les surdités de transmission ou de conduction qui résultent d'une anomalie de l'oreille externe ou de l'oreille moyenne sont opposées aux surdités neurosensorielles ou de perception caractérisées par des atteintes de l'oreille interne (cochlée) ou du nerf cochléaire. Les surdités mixtes quant à elle résulte d'une surdité de perception et de transmission.

Bien que des traitements et chirurgies existent (aides auditives conventionnelles pour rétablir la conduction aérienne, aides en conduction osseuse, implants d'oreille moyenne ou implants cochléaire...) l'audition, dans bien des cas, n'est pas totalement restaurée. Il apparait donc nécessaire de continuer les recherches afin d'approfondir les connaissances sur les gènes liés aux formes congénitales de surdité, d'identifier des facteurs de vulnérabilité au bruit ou à la perte de cellules ciliées cochléaires ou de fibres nerveuses mais aussi d'améliorer les traitements et le diagnostic des troubles auditifs. De plus, le développement de thérapie génique pourrait également permettre des progrès considérables dans la prise en charge des surdités.

Les études restent toutefois limitées chez l'homme car le système auditif (notamment l'oreille interne et les composantes nerveuses et cérébrales) n'est que difficilement accessible et le prélèvement d'échantillon est complexe voir dangereux pour le patient. D'autre part, les modèles de cultures cellulaires ne permettent pas de refléter la structure complexe du système auditif et les interactions entre les différentes structures qui le composent et ne peuvent complètement remplacer le recourt aux modèles animaux. L'utilisation de modèles de rongeurs mimant les troubles auditifs est donc essentielle afin d'obtenir une meilleure compréhension de leurs développements et/ou et de favoriser la mise au point de traitements thérapeutiques.

L'objectif du présent projet est de maintenir en élevage et de produire des lots animaux génétiquement altérés souris et/ou rat qui seront destinés à la poursuite de la caractérisation de ces modèles précliniques de surdités ainsi qu'au développement et   l'identification de nouveaux candidats médicaments.

Afin de satisfaire au raffinement, l'hébergement des animaux sera réalisé dans des locaux adaptés, avec un enrichissement systématique des cages (bâtons de bois à ronger et matériel de nidification) et un personnel habilité qui réalisera les différentes procédures en respectant les règles d'éthiques, le bien-être animal et le principe des 3R. Nos surveillances quotidiennes nous permettront

d'identifier d'éventuels animaux en souffrance et de prendre les mesures nécessaires (surveillance accrue, mise à mort dans les cas les plus graves selon une méthode recommandée par la réglementation et approuvée par le comité d'éthique et la Structure Bien-être Animal).

Pour pouvoir constituer les lots requis pour ces études, nous estimons qu'est nécessaire sur 5 années de recherche un total de 664 animaux génétiquement modifiés ayant un phénotype léger qui seront hébergés sur notre site 1. Ces quantités comprennent les animaux nécessaires au maintien de la lignée et ont été calculées de manière à produire le nombre d'animaux requis pour les expériences et études prévues. Dans un souci constant d'appliquer la règle des 3R, notre savoir-faire et l'optimisation de nos protocoles permettront d'utiliser peu d'animaux avec la garantie d'un rendement maximum.

19384 Les pathologies cardiovasculaires représentent la principale cause de mortalité à ce jour. Elles résultent en grande partie de l'obstruction des vaisseaux sanguins suite à des processus inflammatoires avec de l'ischémie tissulaire, puis la destruction progressive des organes atteints.

Dans certaines maladies génétiques du globule rouge, des processus inflammatoires exacerbés accélèrent l'obstruction du flux sanguin. Les globules rouges malades se rompent, on parle d'hémolyse intravasculaire, qui favorise l'occlusion des vaisseaux de petit calibre et les épisodes ischémiques.

La plus connue des maladies génétiques du globule rouge est la drépanocytose, commune en occident et en Afrique, répandue aussi en Inde et au Moyen-Orient. Les épisodes vaso-occlusifs aigus, dits crises vaso-occlusives, sont extrêmement douloureux pour les patients drépanocytaires qui nécessitent des hospitalisations régulières de plusieurs jours. La drépanocytose est un enjeu de santé publique aigu en Afrique, aux Etats-Unis et en France. Pourtant, l'offre thérapeutique reste extrêmement restreinte : Aucun traitement ne permet actuellement de libérer les vaso-occlusions drépanocytaires de façon efficace ou ciblée.

Nous avons préalablement établi que des fragments de globules rouges appelés vésicules extracellulaires (EV), circulent dans tout le corps. Elles sont toxiques pour les vaisseaux sanguins et divers organes. Cependant, leur composition moléculaire, les effets cardiovasculaires et la biodistribution de ces EV une fois libérées dans le sang, restent mal connus. Pour comprendre les mécanismes des vaso-occlusions et des atteintes dégénératives qui touchent les organes drépanocytaires, il convient donc de caractériser les EV, et d'explorer leurs effets et leur biodistribution dans l'organisme. L'objectif du projet est de caractériser les EV circulantes chez les souris lors de la drépanocytose, leur libération, leur contenu, leurs rôles, et identifier de nouvelles opportunités pour bloquer leurs effets délétères.

Les résultats permettront de comprendre les mécanismes physiopathologiques liés aux EV et identifier de nouvelles opportunités d'action thérapeutique pour lutter contre leurs effets délétères.

Nous mettrons à profit deux modèles complémentaires de souris transgéniques drépanocytaires (à phénotype dommageable), correspondant aux 2 grands types de patients drépanocytaires, et portant des globules rouges drépanocytaires légèrement différents. Nous utiliserons également des souris transgéniques (à phénotype non dommageable) pour des protéines connues pour être impliquées dans les manifestations pathologiques de la drépanocytose. Nous élèverons ces souris et prélèverons du sang pour en étudier les cellules et les vésicules circulantes.

L'étude est prévue sur 5 ans et nécessitera d'utiliser au total 315 souris.

1/ Remplacer: Nous avons d'abord effectué de nombreux tests in vitro dans les échantillons de sang humain afin de remplacer l'utilisation de sang murin. Mais les modèles murins restent une source essentielle de globules rouges pour l'étude des EV qu'ils libèrent, ainsi que pour les EV du plasma. Seuls les modèles murins permettent d'observer les effets de délétion de protéines (souris knock-out ou transgéniques) sur des cellules sanguines, les vésicules qu'elles libèrent, et les vésicules du plasma.

2/ Réduire: Les procédures expérimentales sont conçues pour réduire le nombre d'animaux utilisés au maximum, tout en obtenant des résultats statistiquement pertinents, sur la base de publications et de notre expérience avec ces modèles.

3/ Raffiner: Toutes les interventions sur les souris se feront dans un contexte contrôlé et reproductible. Nous réduirons au maximum la souffrance des animaux. Les prélèvements sanguins se feront sous anesthésie générale [Isoflurane], avec prise en charge de la douleur potentielle. Une grille de scoring sera suivie et des points limites adaptés seront strictement observés. Tout sera mis en oeuvre pour favoriser le bien-être et enrichir l'environnement.

19385 Intitulé du projet :

Caractérisation du sommeil chez la souris transgénique TgM83 exprimant l'alpha-synucléine humaine mutée A53T, un modèle largement étudié de la maladie de Parkinson.

Durée du projet: 36 mois.

Mots clés: alpha-synucléine, sommeil, maladie de Parkinson, maladie neurodégénérative, vieillissement, modèle préclinique.

Finalité du projet : Recherche fondamentale. Recherche translationnelle et appliquée.

Objectifs et bénéfices escomptés du projet :

Le trouble comportemental en sommeil paradoxal anticipe d'une décennie la maladie de Parkinson dont il est considéré comme le meilleur marqueur précoce.

Pendant le sommeil paradoxal, nous sommes naturellement paralysés. Cette paralysie est absente chez les patients atteints du trouble comportemental en sommeil paradoxal. Nous faisons l'hypothèse que la zone cérébrale contrôlant cette paralysie serait une cible précoce des mêmes processus pathologiques que ceux responsables de la maladie de Parkinson et qui envahiraient au cours du vieillissement l'ensemble du cerveau.

Notre objectif est de tester cette hypothèse sur une souche de souris de type transgénique (TgM83), fréquemment utilisée pour la recherche sur la maladie de Parkinson, qui expriment une protéine humaine mutée responsable d'une forme génétique de cette maladie neurodégénérative. Différentes études comportementales indiquent que les souris TgM83 présentent des altérations motrices sévères de type parkinsonien dès l'âge de 8-10 mois. En revanche, on ne sait pas si leur sommeil est perturbé en amont de ces signes cliniques, comme chez les patients parkinsoniens.

Ce projet nous permettra de caractériser le sommeil des souris TgM83 porteuses de la pathologie, de prévoir l'émergence de la maladie de Parkinson à la détection de symptômes précoces durant le sommeil et enfin d'étudier la propagation cérébrale de la pathologie au cours du vieillissement.

Nuisances prévues :

2 procédures expérimentales distinctes sont prévues:

La procédure 1, dont le degré de sévérité est modéré, vise à étudier le cycle veille-sommeil de souris TgM83 pendant la période présymptomatique qui seront traitées de manière à induire une atteinte ciblée d'une structure cérébrale clé dans la régulation du sommeil paradoxal. Notre but est de déterminer si ce traitement intensifie la progression de la maladie neurodégénérative et les effets délétères sur le sommeil par rapport aux souris TgM83 contrôles. Pour ce faire, 30 souris TgM83 seront soumises à une intervention chirurgicale sous anesthésie générale, visant à injecter bilatéralement dans le SLD (l'aire cérébrale ciblée) de l'alpha-synucléine pathogène (ou de l'alpha-synucléine contrôle) suivie d'une implantation d'électrodes cérébrales et musculaires pour l'enregistrement continu du cycle veille-sommeil. Pendant la durée de cette intervention estimée à 90-120 min, toute douleur potentielle sera couverte par l'administration générale et locale d'analgésiques adaptés en pré-, per- et post-opératoire. Une légère perte de poids sera attendue dans les 2 premiers jours (environ 5% - 1 à 2g par souris) avec un retour au poids initial en 48h. A l'issue d'une semaine de récupération, les animaux seront placés en chambre d'enregistrement jusqu'à l'âge de 10 mois maximum. Nous nous attendons à l'apparition d'un dérèglement du sommeil paradoxal, signe précoce de la maladie de Parkinson. Les souris seront mises à mort dès son apparition et leurs cerveaux seront prélevés pour analyses post-mortem.

La procédure 2, dont le degré de sévérité est également modéré, vise à étudier la propagation de la pathologie cérébrale induite par le traitement, analyser objectivement son évolution au cours de la période pré-symptomatique et identifier toutes les aires cérébrales impactées au cours du temps. Pour ce faire, 40 souris TgM83 seront soumises à une intervention chirurgicale sous anesthésie générale, visant à injecter unilatéralement dans le SLD droit de l'alpha-synucléine pathogène. Pendant cette intervention dont la durée est estimée à 40-60 minutes, toute douleur potentielle sera couverte par l'administration générale et locale d'analgésiques adaptés en pré-, per- et post-opératoire. Une légère perte de poids sera attendue dans les 2 premiers jours (environ 5% - 1 à 2g par souris) avec un retour au poids initial en 2 jours post-opératoires. Ces animaux seront mis à mort après 30, 60, 90 et 180 jours post-traitement, leurs cerveaux prélevés pour analyses post-mortem.

Application de la règle des «trois R» :

1. Remplacement

L'intérêt d'étudier ces mécanismes physiopathologiques réside dans leur caractère prédictif et évolutif vers la maladie de Parkinson. Il est impossible d'aborder ces questions chez l'homme sain ou malade, d'autant qu'aucun marqueur spécifique des mécanismes impliqués n'est encore validé en neuroimagerie. Des contrôles anatomo-pathologiques sont souvent réalisés sur des biopsies de patients décédés des décennies après le déclenchement des processus pathologiques. Aussi, des modèles animaux demeurent essentiels pour reproduire les observations cliniques, les comprendre et les modéliser. La souris est un animal parfaitement adapté aux études longitudinales (faible prise de poids et de volume corporel avec l'âge), chez qui la transgénèse permet d'induire l'expression d'une alpha-synucléine humaine mutée et d'en étudier les effets délétères sur son sommeil. Enfin, les réseaux neuronaux responsables du sommeil paradoxal sont communs aux mammifères, incluant les rongeurs et l'homme, et bien identifiés.

2. Réduction

Le nombre d'animaux (n=70) est légitimé par l'organisation de l'étude autour de deux procédures expérimentales (physiologique et anatomo-pathologique) indépendantes mais conduites en parallèle. La petite taille de chaque lot expérimental a été calculée sur la base de nos travaux publiés chez la souris et de manière à tenir compte, sans compromettre la significativité des données (petits échantillons), des « erreurs et échecs » aux différentes étapes des procédures, la validité du traitement appliqué et la dégradation des signaux polysomnographiques au cours du temps pouvant dès lors rendre leur interprétation aléatoire. Chaque animal ne sera soumis qu'à une seule procédure expérimentale avec mise à mort pour les analyses post-mortem, éliminant toute possibilité de réutilisation.

3. Raffinement

Les animaux seront suivis régulièrement avec une attention quotidienne lors de la phase post-opératoire et l'optimisation de la récupération de animaux (ajout d'AINS si nécessaire, suivi du poids, de la mobilité et du comportement) grâce à l'utilisation d'une grille de score post-opératoire. Notre préoccupation sera ensuite d'analyser quotidiennement grâce à des fiches de scorage l'évolution des paramètres physiologiques et le comportement locomoteur des animaux pour détecter au plus tôt les perturbations caractéristiques du trouble comportemental en sommeil paradoxal. Celles-ci constitueront de-facto le point limite des expérimentations avec mise à mort des animaux, tout en établissant la preuve de concept recherchée. Dans tous les cas, les souris seront mises à mort dès l'apparition des signes cliniques moteurs de type parkinsonien apparaissant vers l'âge 8-10 mois décrits dans la littérature chez ces souris TgM83 pour prévenir l'apparition d'une quelconque souffrance.

19386 La cryptosporidiose est une maladie parasitaire intestinale à prévalence cosmopolite et responsable de diarrhées chez les individus immunodéprimés et les jeunes. Zoonose mal contrôlée, elle affecte la santé humaine et animale. Sa transmission est assurée de manière oro-fécale, suite à la contamination de denrées alimentaires ou eaux de boisson par les fèces d'un individu contaminé. Chez les animaux de production, elle conduit à des pertes économiques importantes ainsi qu'à des

problèmes sanitaires et environnementaux. Les cibles les plus sensibles sont les jeunes ruminants (veaux, agneaux, chevreaux) en raison de l'immaturation de leur système immunitaire intestinal. Cette pathologie atteint également à la notion de bien-être animal, provoquant symptômes digestifs, déshydratation et retard de développement.

Seule une molécule possède une AMM (Halocur™) pour les veaux, mais celle-ci, pour être efficace, doit être administrée préventivement tous les jours pendant 7 jours à tous les animaux. Ceci représente une contrainte élevée et un coût pour l'éleveur.

En raison des limites de tolérance des vaccins chez les animaux de rente et de l'augmentation des résistances aux antiparasitaires qui rendent inefficace leur utilisation, des méthodes alternatives naturelles ou des molécules de synthèse sont développées en santé vétérinaire.

La présente demande s'inscrit dans un projet qui vise à mettre en place une stratégie d'immunostimulation des jeunes animaux pour renforcer leurs défenses naturelles via l'administration par voie orale de produits levuriens ou des molécules de synthèse à la naissance, afin de favoriser le contrôle de la cryptosporidiose des ruminants. Elle a pour objectif précis d'étudier la prise en charge et les capacités immunostimulantes des produits levuriens ou des molécules de synthèse au niveau de l'intestin chez l'agneau, modèle de ruminant nouveau-né pour l'étude de la cryptosporidiose. Pour ce faire, la technique de chirurgie de création d'anses intestinales sur agneau sera mise en place. Elle permettra d'injecter in situ directement dans les loops les produits levuriens ou des molécules de synthèse. Le second objectif de ce projet est d'évaluer l'impact du microbiote de l'agneau tout juste naissant dans la capacité immunostimulatrice des produits levuriens ou des molécules de synthèse. Le but étant de déterminer si l'administration orale sur le terrain de ces produits ou molécules doit être réalisée dès les premières heures de vie. La naissance par césarienne constitue donc un second élément clé dans la réalisation de ce projet.

Ce projet s'inscrit dans la dynamique de respect de la règle des 3 R en expérimentation animale. La technique de chirurgie des loops intestinales nous permet de réduire considérablement le nombre d'animaux à utiliser étant donné la possibilité de tester plusieurs produits sur un seul animal, ce qui serait impossible avec une administration par voie orale. Les traitements anesthésiques et antalgiques sont adaptés à la chirurgie intestinale et aux animaux nouveau-nés. L'animal ayant subi la chirurgie sera systématiquement maintenu avec un animal du même âge « accompagnateur » ou lui aussi ayant subi la chirurgie tout au long de l'expérimentation (Raffinement). Nous ne pouvons remplacer ce modèle in vivo étant donné la complexité de la mise en place des réponses immunitaires et des interactions cellulaires.

Le nombre d'animaux est estimé à 48 pour les 4 ans (4 agneaux subiront la chirurgie par an + 4 animaux « accompagnateurs ou ayant subi la chirurgie » + 4 mères).

Le nombre d'animaux est estimé à 48 pour les 4 ans (par an : 4 agneaux subiront la chirurgie (issus de césarienne ou non) + 4 animaux « accompagnateurs » + 4 mères, soit 12 animaux par an).

19387 Nous souhaitons étudier l'impact de la perturbation de l'enveloppe du noyau des cellules du système immunitaire. Ce projet est la suite de travaux menés in vitro sur un type particulier de cellules immunitaires humaines. Des lignées cellulaires déficientes pour un gène important dans la structure du noyau de ces cellules ont été suivies dans des canaux très fins, resserrés conçus pour stresser l'enveloppe de leurs noyaux. Nous avons constaté que ces cellules sont mortes plus fréquemment que les cellules sauvages et présentaient divers défauts. Pour comprendre si ce phénomène est pertinent pour le système immunitaire in vivo, nous l'avons modélisé à l'aide de modèles murins pour reproduire toute la complexité du système immunitaire. En supprimant ce gène dans les cellules immunitaires, nous avons constaté que les animaux perdent un type spécifique de cellule du système immunitaire (les macrophages des alvéoles pulmonaires) au fil du temps et que les cellules qui restent sont défectueuses. Ces animaux présentent également des signes d'inflammation dans les poumons à l'état basal. Nous avons également des preuves suggérant que cette perturbation génétique induit un vieillissement prématuré des macrophages alvéolaires. Ces résultats suggèrent donc que l'enveloppe nucléaire a un rôle important dans la protection de ces cellules dans les poumons contre les stress externes ou internes.

Nous voulons comprendre les conséquences pathologiques de ce phénotype, qui peuvent avoir un rapport avec les états pathologiques humains (tels que la progéria ou le vieillissement naturel). Étant donné que l'infection grippale est une maladie pulmonaire importante et qu'il a été démontré qu'elle affecte les personnes âgées avec une plus grande gravité, cette infection est un bon modèle pour tester les conséquences pathologiques de la perturbation de l'enveloppe des noyaux des cellules. Il n'y a aucun moyen de le faire *in silico* ou *in vitro* en raison de la complexité du système dans lequel le microenvironnement du système immunitaire pulmonaire doit être répliqué. C'est pour cela que nous souhaitons réaliser nos expérimentations chez la souris.

La souris est une espèce de choix pour ces expériences car la physiologie de la souris est proche de celle de l'Homme.

Réduction : Nous prévoyons d'utiliser 42 souris pour ce projet.

Le nombre de souris est réduit pour limiter le nombre d'animaux utilisés, mais suffisamment grand pour conserver une signification biologique qualitative

Raffinement : Dans un souci de raffinement, toutes les mesures seront prises pour éviter le stress et la douleur des animaux. Des points-limites ont été établis. La dose de virus utilisée sera diminuée au maximum pour permettre aux animaux de guérir spontanément au bout de 10 jours.

19388 Les bactéries filamenteuses segmentées (SFB) sont des bactéries naturellement présentes dans la flore intestinale de nombreuses espèces notamment chez l'Homme. Ces bactéries sont attachées à la paroi intestinale de manière spécifique à l'espèce hôte. Il a récemment été démontré que les SFB pouvaient induire au niveau de l'intestin une réponse immunitaire chez leur hôte. Chez la souris, la colonisation par les SFB protège l'hôte de bactéries infectieuses, mais cette colonisation exacerbe également la gravité d'un certain nombre de maladies auto-immunes. Ces observations nous permettent de dire que les SFB sont des bactéries clés à la fois dans l'évolution de la santé et de la maladie. Cependant de nombreux impacts des SFB sur leur hôte doivent encore être définis. De nouvelles études sont donc nécessaires pour étudier le rôle de la colonisation des SFB sur l'évolution des interactions bactériennes et l'évolution de la réponse immunitaire chez l'hôte.

Ces études permettront une meilleure compréhension des mécanismes de stimulation immunitaire et des interactions entre les SFB et leur hôte. Elles nous donneront également des informations essentielles sur la façon dont la flore intestinale intervient dans la résistance lors d'une colonisation bactérienne.

Toutes ces connaissances nous permettront d'intervenir sur les mécanismes d'interaction et les propriétés immunitaires des SFB. Nous pourrions ainsi envisager l'utilisation des SFB pour améliorer la santé intestinale Humaine et également d'utiliser les SFB comme nouvelle plateforme vaccinale.

Pour permettre cela, notre projet se divisera en 3 objectifs principaux. Le premier objectif sera de caractériser chez l'hôte l'activation immunitaire modulée par les SFB au niveau de l'intestin. Le deuxième objectif sera de définir le rôle des différentes molécules immunitaires dans la détection précoce des SFB par le système immunitaire de l'hôte. Le dernier objectif sera de définir chez l'hôte l'impact de l'activation immunitaire modulée par les SFB sur les différentes interactions bactériennes et lors d'infection au niveau de l'intestin de l'hôte.

Pour pouvoir atteindre ces objectifs nous devons utiliser des modèles reproduisant le plus fidèlement possible les mécanismes observés chez l'Homme. La culture en laboratoire des SFB est très difficile et limitée à quelques jours. Cela limite nos expérimentations et ne nous permettrait pas d'atteindre nos objectifs de recherche. Nous devons donc utiliser un modèle animal qui nous permettra d'étudier en détail l'impact de la colonisation des SFB chez l'hôte et ainsi d'atteindre nos objectifs précédemment décrits.

Nous utiliserons pour notre projet des souris mâles et femelles âgées de 8 à 12 semaines exemptes de tous germes et ayant des caractéristiques génétiques différentes. Quatre procédures expérimentales seront exécutées dans notre projet.

La première procédure consistera à coloniser de manière spécifique des souris exemptes de tous germes avec les SFB. Nous pourrions ainsi étudier l'évolution des SFB tout en modulant des

paramètres physiologiques chez l'hôte. Cette procédure est associée à une sévérité légère pour l'animal.

La deuxième procédure permettra d'étudier la fixation des SFB au niveau de la paroi intestinale tout en modulant certains paramètres de l'inflammation. Cette procédure est associée à une sévérité légère chez l'animal.

Dans notre troisième procédure nous évaluerons l'évolution et l'impact de la colonisation par les SFB chez des souris ayant des caractéristiques cellulaires et immunitaires différents. Cette procédure est associée à une sévérité modérée pour l'animal.

Notre dernière procédure nous permettra d'étudier l'impact de la colonisation par les SFB sur la réponse immunitaire de l'hôte lors d'une infection par des bactéries intestinales. Cette procédure est associée à une sévérité modérée pour l'animal.

Pour atteindre nos objectifs fixés ainsi que garantir l'utilisation d'un nombre minimum d'animaux nous avons consulté un biostatisticien lors de la conception de nos expériences. Pour les comparaisons entre 2 groupes, nous utiliserons le test statistique de Mann-Whitney. Pour les comparaisons entre 4 groupes, nous utiliserons le test statistique Anova. Pour notre projet 4320 souris des deux sexes, âgées entre 8 et 12 semaines seront utilisées sur une période de 5 ans.

La colonisation par les SFB est sans complication chez l'animal. Nous estimons cependant que 1728 souris subiront des procédures de sévérité légère. Ces souris seront sujettes à une légère réponse immunitaire et un changement de composition de leur flore intestinale. Lors de l'infection par des bactéries intestinales chez les souris colonisées par les SFB, nous estimons que 2592 souris subiront des procédures de sévérité modérée. Ces souris seront sujettes à une réaction immunitaire, une légère perte de poids entraînant une fatigue passagère. Une légère inflammation du colon peut également survenir après l'infection. Tous ces effets secondaires disparaîtront naturellement et rapidement.

Lors de nos expérimentations les doses injectées aux animaux seront calculées pour réduire au maximum les effets indésirables tout en permettant d'atteindre nos objectifs scientifiques. Conformément aux points limites fixés pour chaque procédure. Si des animaux présentent des signes cliniques tel qu'une perte de poids, une déshydratation ou un état laissant supposer un mal-être des actions seront mises en place pour limiter les souffrances et améliorer rapidement l'état de l'animal. Si aucune amélioration n'est visible rapidement l'animal sera mis à mort pour mettre un terme à ses souffrances. Les souris seront hébergées dans un environnement protégé et contrôlé afin de limiter l'atteinte à leur bien-être. Les cages contiendront également des matériaux de nidification, ainsi que des structures permettant de garantir les besoins comportementaux des animaux.

19389 La surdité, altération quantitative ou qualitative de l'acuité auditive peut toucher une seule oreille, surdité unilatérale, ou les deux oreilles, surdité bilatérale, et être plus ou moins sévère. En fonction de leur sévérité, les pertes auditives peuvent avoir des conséquences variables sur la vie des patients : impacts négatifs sur l'acquisition du langage oral, sur l'apprentissage scolaires et le développement cognitif, conséquences sur la vie sociale, déclin cognitifs chez les personnes âgées pouvant conduire à des altérations de la mémoire ou à la survenue de démence de type maladie d'Alzheimer... L'OMS estime que 466 millions de personnes présentent des troubles auditifs dans le monde. En France, environ 6 millions de malentendants sont recensés soit 8 à 10 % de la population. La surdité affecte 6% des 15-24 ans et plus de 65% des 65 ans et plus.

Il existe plusieurs façons de classer les surdités en fonction de :

- Leur origine : les surdités dites de naissance (génétiques ou acquises in utero) se distinguent des surdités survenant au cours de la vie qui peuvent être d'origines infectieuses (méningites bactériennes, rougeole, otite chronique de l'enfant), médicamenteuses (dues à des effets indésirables ototoxiques d'antibiotiques, d'anticancéreux...) ou mécaniques (blessures, traumatismes sonores, exposition au bruit...). Le vieillissement peut conduire à une perte d'audition ou presbyacousie qui apparait le plus souvent à partir de 50-60ans.

- La structure touchée : les surdités de transmission ou de conduction qui résultent d'une anomalie de l'oreille externe ou de l'oreille moyenne sont opposées aux surdités neurosensorielles ou de perception caractérisées par des atteintes de l'oreille interne (cochlée) ou du nerf cochléaire. Les surdités mixtes quant à elle résulte d'une surdité de perception et de transmission.

Bien que des traitements et chirurgies existent (aides auditives conventionnelles pour rétablir la conduction aérienne, aides en conduction osseuse, implants d'oreille moyenne ou implants cochléaire...) l'audition, dans bien des cas, n'est pas totalement restaurée. Il apparaît donc nécessaire de continuer les recherches afin d'approfondir les connaissances sur les gènes liés aux formes congénitales de surdité, d'identifier des facteurs de vulnérabilité au bruit ou à la perte de cellules ciliées cochléaires ou de fibres nerveuses mais aussi d'améliorer les traitements et le diagnostic des troubles auditifs. De plus, le développement de thérapie génique pourrait également permettre des progrès considérables dans la prise en charge des surdités.

Les études restent toutefois limitées chez l'homme car le système auditif (notamment l'oreille interne et les composantes nerveuses et cérébrales) n'est que difficilement accessible et le prélèvement d'échantillon est complexe voir dangereux pour le patient. D'autre part, les modèles de cultures cellulaires ne permettent pas de refléter la structure complexe du système auditif et les interactions entre les différentes structures qui le composent et ne peuvent complètement remplacer le recourt aux modèles animaux. L'utilisation de modèles de rongeurs mimant les troubles auditifs est donc essentielle afin d'obtenir une meilleure compréhension de leurs développements et/ou et de favoriser la mise au point de traitements thérapeutiques.

L'objectif du présent projet est de maintenir en élevage et de produire des lots animaux génétiquement altérés souris et/ou rat qui seront destinés à la poursuite de la caractérisation de ces modèles précliniques de surdités ainsi qu'au développement et à l'identification de nouveaux candidats médicaments.

Afin de satisfaire au raffinement, l'hébergement des animaux sera réalisé dans des locaux adaptés, avec un enrichissement systématique des cages (bâtons de bois à ronger et matériel de nidification) et un personnel habilité qui réalisera les différentes procédures en respectant les règles d'éthiques, le bien-être animal et le principe des 3R. Nos surveillances quotidiennes nous permettront d'identifier d'éventuels animaux en souffrance et de prendre les mesures nécessaires (surveillance accrue, mise à mort dans les cas les plus graves selon une méthode recommandée par la réglementation et approuvée par le comité d'éthique et la Structure Bien-être Animal).

Pour pouvoir constituer les lots requis pour ces études, nous estimons qu'est nécessaire sur 5 années de recherche un total de 6536 animaux génétiquement modifiés ayant un phénotype léger qui seront hébergés sur notre site³. Ces quantités comprennent les animaux nécessaires au maintien de la lignée et ont été calculées de manière à produire le nombre d'animaux requis pour les expériences et études prévues. Dans un souci constant d'appliquer la règle des 3R, notre savoir-faire et l'optimisation de nos protocoles permettront d'utiliser peu d'animaux avec la garantie d'un rendement maximum.

19390 Les maladies neuromusculaires sont des maladies du muscle dans lesquelles le muscle ne se contracte pas ou très mal. Le handicap subi par les personnes affectées par des maladies neuromusculaires mais aussi la nécessité d'assister ces personnes représentent un poids économique pour la société et le système de santé. Seule une fraction des troubles neuromusculaires possède actuellement une thérapie efficace. Il existe plus de 400 maladies neuromusculaires différentes. Les myopathies sont l'ensemble des pathologies qui touchent les muscles squelettiques caractérisées par une structure et une fonction musculaire altérée. Les patients atteints de myopathies montrent une diminution de l'activité physique sans modification de la fonction sensorielle et autonome. Dans presque toutes les myopathies, la détérioration progressive de l'activité quotidienne du patient s'accompagne d'une détresse physique et psychologique, c'est pourquoi des thérapies de supports sont recommandées.

Les dystrophies musculaires comprennent plus de 30 types de maladies héréditaires qui sont caractérisées par une perte de tissus musculaires associée à une réduction progressive de la

fonction musculaire et à un décès. La perte de la fonction musculaire s'accompagne dans certains cas de troubles au niveau du muscle cardiaque et du diaphragme. En effet dans certaines pathologies comme la dystrophie musculaire de Duchenne, les patients ont une espérance de vie de 30 à 40 ans. L'évolution de ces pathologies est dépendante de différents facteurs : l'âge d'apparition, la sévérité et le groupe de muscles affectés. Progressivement la maladie va avoir un impact sur le muscle cardiaque et le diaphragme. Les gènes associés aux dystrophies musculaires codent pour des protéines de la membrane plasmique, les citernes terminales, la matrice extracellulaire et le sarcomère. Certaines dystrophies musculaires comme les dystrophinopathies sont liées au chromosome X et se développent majoritairement chez les garçons qui portent une anomalie dans le gène concerné. Les femmes porteuses d'une anomalie sur un chromosome X ne présentent bien souvent aucune gêne mais ce chromosome X peut se transmettre à la descendance.

Les myopathies congénitales représentent un groupe divers de maladies rares et héréditaires des muscles squelettiques qui sont caractérisées par une structure anormale des fibres musculaires. Les signes cliniques sont larges mais sont souvent associés à une diminution du tonus musculaire, une faiblesse musculaire et une malformation A cause du manque de thérapies efficaces, des études sont requises pour trouver un candidat pour soigner les patients avec différents types de myopathies.

La découverte des gènes impliqués dans les formes génétiques de ces maladies est une avancée majeure dans la compréhension des mécanismes mis en cause. Ainsi, de nombreux modèles animaux ont été développés par ingénierie génétique et permettent de reproduire efficacement ces troubles. Ces modèles murins donnent un aperçu des relations entre les gènes, forgent notre compréhension des mécanismes moléculaires et pathogéniques et conduisent à des progrès au travers de traitements pour les pathologies associées aux muscles. La plupart des approches thérapeutiques disponibles actuellement en clinique ont été développées à l'aide de ces modèles murins. A titre d'exemple, les polyphénols de thé vert, le tamoxifène et le riméporide font tous actuellement l'objet d'essais cliniques en tant que traitements possibles de la dystrophie musculaire de Duchenne. Pour être valide, un modèle alternatif aux modèles animaux devrait prendre en compte l'ensemble des phénomènes biochimiques et physiologiques qui ont lieu chez l'animal. A ce jour, les tests in vitro ou les modèles informatiques ne permettent pas de rendre compte de l'ensemble de ces phénomènes. Aucune méthode alternative n'est envisageable pour reproduire le plus fidèlement les myopathies et donc, étudier le potentiel effet bénéfique de nouvelles stratégies thérapeutiques.

L'objectif du présent projet est l'élevage de lignées génétiquement modifiées de rats et de souris reproduisant les troubles neuromusculaires. Cela permettra d'approfondir la caractérisation de ces modèles. Ultimement, ces études pourraient permettre d'identifier des substrats moléculaires et biologiques caractéristiques des troubles neuromusculaires et de développer de nouvelles cibles thérapeutiques. Afin de satisfaire au raffinement, l'hébergement des animaux sera réalisé dans des locaux appropriés avec des conditions optimales de température et d'hygrométrie et un cycle jour/nuit de 12h/12h. De plus, un enrichissement sera systématiquement placé dans chaque cage et le personnel sera habilité à réaliser les différentes procédures dans le respect des règles d'éthique, de bien-être animal et du principe des 3R. Les surveillances quotidiennes des animaux permettront d'identifier d'éventuels animaux en souffrance et de prendre les mesures appropriées (surveillance accrue, mise à mort dans les cas les plus graves). Le nombre d'animaux est calculé selon les protocoles expérimentaux de manière à obtenir le minimum d'animaux par groupe permettant des résultats significatifs et homogènes. Afin de constituer les différents lots expérimentaux, il est estimé que sur les 5 années du projet un total de 3000 animaux est nécessaire.

19391 La sclérose en plaques est une maladie invalidante touchant le système nerveux central, caractérisée par une démyélinisation, une inflammation et une dérégulation immune. Cette pathologie est médiée par des lymphocytes T présentant une auto réactivité contre les protéines de la myéline, et par l'activation de cellules B produisant des anticorps autoréactifs. Cette perte de tolérance au soi, accompagnée d'un défaut et d'une dysfonction des cellules T régulatrices et d'une

résistance des cellules T effectrices à la suppression, entraînent un déséquilibre immun responsable de la pathogénèse de la sclérose en plaques.

Des études menées par notre équipe ont mis en évidence que l'Interleukine (IL)-34 est une cytokine exprimée par les T régulatrices CD4+ et CD8+, et permet d'induire une tolérance dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat. Cette cytokine régulatrice est aussi nécessaire au recrutement et au développement de la microglie, macrophages résidents du système nerveux central dont le nombre augmentent lors d'épisodes neuro-inflammatoires et neuro-dégénératifs, observés notamment dans le modèle murin préclinique de sclérose en plaques (EAE, encéphalomyélite immune expérimentale induite par la glycoprotéine MOG).

Notre équipe a récemment montré que des souris déficientes pour l'IL34 développaient une EAE plus sévère que des souris contrôles. A l'opposé, l'injection d'un adénovirus codant pour l'IL34 murine, en association avec une dose sous-optimale de rapamycine, retardait le développement de la pathologie (résultats en cours de publication) (saisine 2019051318009506).

La barrière hémato-encéphalique (BHE) est un obstacle pour le passage de molécules ou d'anticorps thérapeutiques. Il a été montré que seulement ~ 0. 1% d'anticorps administré en périphérie pénètre dans le parenchyme cérébral, limitant le développement d'immunothérapie basée sur des anticorps pour le traitement de maladies neurodégénératives ou de désordres cérébraux. Cependant, certaines protéines, comme la transferrine qui transporte le fer au cerveau, sont capables d'être transportées activement au travers de la BHE via des récepteurs spécifiques exprimés sur cette même BHE. Plusieurs études ont montré par exemple l'efficacité du récepteur à la transferrine pour médier la transcytose d'anticorps thérapeutiques. En effet, des protéines de fusion constituées de protéines thérapeutiques fusionnées avec un anticorps contre le récepteur de la transferrine ont été précédemment décrites dans la littérature, et ont montré leur intérêt dans des modèles murins de maladie d'Alzheimer. Certaines d'entre elles sont en développement clinique.

L'objectif de ce projet est donc à la fois d'évaluer le transport actif à travers la barrière hémato-encéphalique de l'IL-34 fusionnée avec un anticorps contre le récepteur de la transferrine, et de montrer que cette protéine de fusion a le potentiel d'augmenter l'efficacité de l'immunothérapie de l'IL34 précédemment observée dans ce modèle murin préclinique de sclérose en plaques (EAE).

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

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

- Réduire :

Le nombre d'animaux par groupe est réduit au nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs (description des tests statistiques utilisés détaillée ci-après). Le nombre de groupes a été réfléchi de sorte à avoir les contrôles suffisants pour pouvoir conclure quant aux résultats obtenus. Le nombre d'animaux nécessaire pour ce projet sera de 108. Le modèle murin d'EAE induite par la MOG étant précédemment mis au point par le laboratoire et donc opérationnel.

- Raffiner : Durant le protocole, les animaux seront suivis pour leur poids, le développement de l'EAE. Les animaux atteignant une perte de poids de 20% par rapport à leur poids initial seront euthanasiés, ainsi que les animaux montrant une paralysie sévère.

Tous les animaux seront analysés afin d'en obtenir un maximum d'information post mortem, au niveau anatomopathologique pour les lésions dans la moelle épinière, et par immuno-histologie pour étudier l'infiltration des cellules dans les tissus inflammés.

19392 En raison de l'incapacité des antibiotiques à traiter les bactéries résistantes, les chercheurs ont cherché à trouver de nouvelles alternatives aux antibiotiques, ce qui ajoute le problème de la perturbation par les antibiotiques du schéma normal de Microbiotia, qui entraîne une plus grande perturbation de la santé. De nombreuses souches bactériennes ont développé de nouveaux mécanismes de résistance aux antibiotiques qui les rendent invincibles à presque tous les antibiotiques qui ont été développés. La prévalence de ces bactéries multirésistantes (MDR), en

particulier les entérobactéries résistantes aux carbapénèmes (CRE) et les entérobactéries productrices de β -lactamase à spectre étendu (BLSE), ne cesse d'augmenter, ce qui constitue une menace extrême pour la santé publique, entraînant des maladies graves et prolongées et une augmentation des taux de morbidité et de mortalité. La proportion d'entérobactéries résistantes aux carbapénèmes est devenue une préoccupation en Europe. Bien que le taux de résistance des entérobactéries soit assez faible en France (jusqu'à 0,7% en 2015), il est plus élevé en Europe de l'Est (10%) et particulièrement en Grèce (jusqu'à 60% de résistance). Cette augmentation de la résistance est principalement due à la production de carbapénémase par le type *E. coli* OXA-48. L'intestin est un réservoir d'organismes multirésistants (MDRO), en particulier chez les patients ayant reçu une thérapie antibactérienne intensive. La colonisation intestinale asymptomatique par des MDRO peut évoluer vers diverses infections, principalement urinaires, digestives et sanguines conduisant au décès, elle peut également conduire à la contamination de l'environnement et des sujets sains. Notre équipe de recherche développe des stratégies innovantes pour lutter contre la résistance bactérienne aux antibiotiques. L'une des alternatives actuellement testée dans notre laboratoire consiste à utiliser des souches bactériennes, considérées comme probiotiques, qui ont la capacité d'inhiber les pathogènes par plusieurs mécanismes, dont la sécrétion de divers composés antimicrobiens. Lors d'une manipulation in-vivo avec des souris suisses mâles (n=8), nous avons observé que certaines souris inoculées avec *E. coli* MDR, se décolonisent spontanément, contrairement à d'autres. Le séquençage métagénomique des fèces de ces différentes souris a montré que les souris décolonisées avaient des espèces bactériennes différentes de celles des souris colonisées, en particulier *Akkermansia muciniphila* et *Lactobacillus murinus*. Par conséquent, notre équipe de recherche a réussi à isoler et à caractériser différentes souches en les cultivant sur des milieux spécifiques dans des conditions de croissance imitant le tractus gastro-intestinal. L'administration de probiotiques tels que *Akkermansia muciniphila* et *Lactobacillus murinus* semble prometteuse pour éradiquer un pathogène multirésistant. *A. muciniphila* est une bactérie gram-négative, strictement anaérobie ; elle constitue jusqu'à 3% de la communauté microbienne intestinale chez les espèces de mammifères, et il a été proposé qu'elle contribue au maintien de la santé intestinale.

Lactobacillus murinus est un autre probiotique bénéfique, une bactérie microaérophile à Gram positif qui est considérée comme un habitant prédominant de l'intestin de l'homme et de la souris et qui aide à maintenir la résistance à la colonisation par les pathogènes entériques. Une étude récente a rapporté l'administration réussie de probiotiques du genre *Lactobacilli* incluant *L. plantarum*, *L. paracasai*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, dans l'éradication des *Enterobacteriaceae* du tractus gastro-intestinal, ce qui propose la possibilité d'utiliser *Lactobacillus murinus* également dans le traitement des infections à *Enterobacteriaceae*. Une autre étude confirme la capacité de *L. murinus* à protéger des rats prématurés d'une inflammation intestinale sévère.

Les prébiotiques sont également une autre alternative aux antibiotiques ; ce sont des substances alimentaires qui induisent la croissance du microbiote bénéfique, donc sans aucune toxicité pour l'homme. Le prébiotique inuline s'avère prometteur dans l'éradication d'un agent pathogène multirésistant. L'inuline est un polysaccharide naturel non digestible produit par les plantes de Chicorée et d'Artichaut et a été approuvé par la Food and Drug Administration comme une fibre alimentaire. Plusieurs études ont démontré la contribution de l'inuline au maintien d'un microbiote intestinal sain et d'un bon équilibre microécologique. De plus, nos expériences in-vitro ont rapporté l'effet d'inhibition de l'inuline contre *E. coli* oxa48, ce qui soutient fortement l'efficacité possible in vivo.

Les objectifs de notre travail sont de tester l'efficacité de l'utilisation des probiotiques *Akkermansia muciniphila* et *Lactobacillus murinus*, ainsi que du prébiotique inuline dans l'éradication d'*E. coli* OXA-48 producteur de carbapénèmes dans le tractus gastro-intestinal d'un modèle de souris par voie orale. Pour ce faire, nous utiliserons 408 souris SWISS mâles âgées de 6 semaines. Cette étude sera réalisée en appliquant la règle des 3R : Minimiser le nombre de souris :

le nombre de souris a été réduit au minimum afin de conserver une analyse statistique fiable, en effet pour les comparaisons inter-groupes lors d'études de portage de bactéries multi-résistantes un minimum de douze animaux par groupe est statistiquement nécessaire pour valider les résultats.

Nous avons donc choisi d'utiliser ce nombre minimum d'animaux par groupe, c'est-à-dire 12. Affiner en mettant en place des critères d'évaluation : en cas d'infection et de souffrance, les souris seront euthanasiées selon une procédure approuvée, pré-anesthésiées par inhalation d'isoflurane (3% débit de gaz frais 0.8L/min). Afin de minimiser l'inconfort, voire la douleur, que peut provoquer la procédure de gavage gastrique, celle-ci sera réalisée sous anesthésie générale de courte durée à l'isoflurane (gaz anesthésiant). Pendant cette manipulation, les souris seront surveillées pendant une heure pour s'assurer de l'absence de complications. Les autres manipulations ne devraient pas causer de souffrance à l'animal (émission naturelle de fèces, administration d'antibiotiques dans l'eau de boisson). Remplacer autant que possible l'utilisation d'animaux : le modèle de microbiote digestif est tellement riche et complexe que les expériences in-vitro ne permettent pas de répondre aux questions scientifiques posées. Enfin, le bien-être des animaux est contrôlé tout au long de l'étude.

Les souris sont hébergées dans des cages individuelles de taille suffisante dont la litière est changée régulièrement (une fois par semaine) avec accès libre à l'eau et à la nourriture (alimentation spécifique pour rongeur). Les analyses de microbiote réclament des hébergements en cage individuelles afin de limiter les contaminations interindividuelles des prélèvements. Chaque milieu sera enrichi en abris ainsi que des carrés de coton. Les animaux bénéficieront d'une semaine d'habituation avant le début des expérimentations

19393 Pour le développement de nouveaux médicaments, il est nécessaire d'étudier le devenir de la substance active dans l'organisme, déterminer l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination du composé (ADME), des propriétés qui vont influencer la posologie du médicament (dose administrée et fréquence d'administration). L'objectif de ce projet est la mesure de la biodisponibilité de produits pharmacologiques en cours de développement, molécules actives ou candidats-médicaments chez la souris et le rat. La biodisponibilité est déterminée à partir de prélèvements de sang et d'organes réalisés suite à l'administration du produit pharmacologique.

Adéquation avec la règle des 3R

Remplacer

Pour réaliser ce projet, la biodisponibilité et la pharmacocinétique de produits pharmacologiques sera évaluée chez la souris ou le rat, car ces espèces sont les plus utilisées pour le développement des candidats-médicaments. A ce jour, aucun modèle alternatif (moléculaire et/ou cellulaire) n'est suffisamment intégré et complexe pour permettre de reproduire l'ensemble des phénomènes biologiques qui sont impliqués dans les mécanismes de dégradation, de transport et d'élimination des composés susceptibles d'affecter l'activité des molécules. C'est pour cette raison, qu'une approche in vivo est nécessaire pour déterminer la biodisponibilité des nouveaux candidats-médicaments avant de poursuivre leur développement

Raffiner

Les candidats médicaments évalué auront été sélectionnés en amont pour leur propriétés physico-chimiques, leur activité et leur innocuité in vitro sur des modèles alternatifs.

La procédure expérimentale est conçue pour garantir le bien-être de l'animal et réduire au maximum l'inconfort, le stress et la souffrance de l'animal. La souris et le rat étant des animaux sociaux, ils seront maintenues par groupes sociaux dans des cages enrichies de tubes en carton et de bâtonnets à ronger. Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi régulier de l'état des animaux. Lorsque la procédure nécessitera d'anesthésier l'animal, il sera placée sur un tapis chauffant afin de prévenir une hypothermie durant l'anesthésie et jusqu'au réveil de l'animal. La douleur liée aux injections est une douleur ponctuelle réversible qui fera l'objet d'une surveillance de l'animal. Les animaux seront particulièrement surveillés après l'administration des candidats-médicaments pour visualiser tous signes de toxicité imprévue qui seraient suivi de l'arrêt de la procédure.

Réduire

Nous avons montré que la procédure expérimentale parfaitement maîtrisée permet une mesure efficace de la pharmacocinétique d'un candidat-médicament avec un minimum d'animaux. Les résultats sont exploités sous la forme de courbes cinétiques.

Aucune comparaison statistique n'est requise. La réalisation des procédures par un technicien rompu à ces manipulations garantit une bonne reproductibilité et permet ainsi de limiter le nombre d'animaux à engager dans les protocoles. Les mesures de pharmacocinétique seront réalisées à l'aide de 3 animaux par temps, par dose et par voie d'administration. Il est prévu de mesurer la biodisponibilité de 50 candidats-médicaments par an chez la souris (1200 souris) et 10 chez le rat (240 rats) sur une période de 5 ans, soit un total de 6000 souris et 1200 rats.

19394 Les maladies neuromusculaires sont des maladies du muscle dans lesquelles le muscle ne se contracte pas ou très mal. Le handicap subi par les personnes affectées par des maladies neuromusculaires mais aussi la nécessité d'assister ces personnes représentent un poids économique pour la société et le système de santé. Seule une fraction des troubles neuromusculaires possède actuellement une thérapie efficace. Il existe plus de 400 maladies neuromusculaires différentes. Les myopathies sont l'ensemble des pathologies qui touchent les muscles squelettiques caractérisées par une structure et une fonction musculaire altérée. Les patients atteints de myopathies montrent une diminution de l'activité physique sans modification de la fonction sensorielle et autonome. Dans presque toutes les myopathies, la détérioration progressive de l'activité quotidienne du patient s'accompagne d'une détresse physique et psychologique, c'est pourquoi des thérapies de supports sont recommandées.

Les dystrophies musculaires comprennent plus de 30 types de maladies héréditaires qui sont caractérisées par une perte de tissus musculaires associée à une réduction progressive de la fonction musculaire et à un décès. La perte de la fonction musculaire s'accompagne dans certains cas de troubles au niveau du muscle cardiaque et du diaphragme. En effet dans certaines pathologies comme la dystrophie musculaire de Duchenne, les patients ont une espérance de vie de 30 à 40 ans. L'évolution de ces pathologies est dépendante de différents facteurs : l'âge d'apparition, la sévérité et le groupe de muscles affectés. Progressivement la maladie va avoir un impact sur le muscle cardiaque et le diaphragme. Les gènes associés aux dystrophies musculaires codent pour des protéines de la membrane plasmique, les citernes terminales, la matrice extracellulaire et le sarcomère. Certaines dystrophies musculaires comme les dystrophinopathies sont liées au chromosome X et se développent majoritairement chez les garçons qui portent une anomalie dans le gène concerné. Les femmes porteuses d'une anomalie sur un chromosome X ne présentent bien souvent aucune gêne mais ce chromosome X peut se transmettre à la descendance.

Les myopathies congénitales représentent un groupe divers de maladies rares et héréditaires des muscles squelettiques qui sont caractérisées par une structure anormale des fibres musculaires. Les signes cliniques sont larges mais sont souvent associés à une diminution du tonus musculaire, une faiblesse musculaire et une malformation. A cause du manque de thérapies efficaces, des études sont requises pour trouver un candidat pour soigner les patients avec différents types de myopathies.

La découverte des gènes impliqués dans les formes génétiques de ces maladies est une avancée majeure dans la compréhension des mécanismes mis en cause. Ainsi, de nombreux modèles animaux ont été développés par ingénierie génétique et permettent de reproduire efficacement ces troubles. Ces modèles murins donnent un aperçu des relations entre les gènes, forgent notre compréhension des mécanismes moléculaires et pathogéniques et conduisent à des progrès au travers de traitements pour les pathologies associées aux muscles. La plupart des approches thérapeutiques disponibles actuellement en clinique ont été développées à l'aide de ces modèles murins. A titre d'exemple, les polyphénols de thé vert, le tamoxifène et le riméporide font tous actuellement l'objet d'essais cliniques en tant que traitements possibles de la dystrophie musculaire de Duchenne. Pour être valide, un modèle alternatif aux modèles animaux devrait prendre en compte l'ensemble des phénomènes biochimiques et physiologiques qui ont lieu chez l'animal. A ce jour, les tests in vitro ou les modèles informatiques ne permettent pas de rendre compte de

l'ensemble de ces phénomènes. Aucune méthode alternative n'est envisageable pour reproduire le plus fidèlement les myopathies et donc, étudier le potentiel effet bénéfique de nouvelles stratégies thérapeutiques.

L'objectif du présent projet est l'élevage de lignées génétiquement modifiées de rats et de souris reproduisant les troubles neuromusculaires. Cela permettra d'approfondir la caractérisation de ces modèles. Ultimement, ces études pourraient permettre d'identifier des substrats moléculaires et biologiques caractéristiques des troubles neuromusculaires et de développer de nouvelles cibles thérapeutiques. Afin de satisfaire au raffinement, l'hébergement des animaux sera réalisé dans des locaux appropriés avec des conditions optimales de température et d'hygrométrie et un cycle jour/nuit de 12h/12h. De plus, un enrichissement sera systématiquement placé dans chaque cage et le personnel sera habilité à réaliser les différentes procédures dans le respect des règles d'éthique, de bien-être animal et du principe des 3R. Les surveillances quotidiennes des animaux permettront d'identifier d'éventuels animaux en souffrance et de prendre les mesures appropriées (surveillance accrue, mise à mort dans les cas les plus graves). Le nombre d'animaux est calculé selon les protocoles expérimentaux de manière à obtenir le minimum d'animaux par groupe permettant des résultats significatifs et homogènes. Afin de constituer les différents lots expérimentaux, il est estimé que sur les 5 années du projet un total de 60000 animaux est nécessaire.

19395 Les maladies neuromusculaires sont des maladies du muscle dans lesquelles le muscle ne se contracte pas ou très mal. Le handicap subi par les personnes affectées par des maladies neuromusculaires mais aussi la nécessité d'assister ces personnes représentent un poids économique pour la société et le système de santé. Seule une fraction des troubles neuromusculaires possède actuellement une thérapie efficace. Il existe plus de 400 maladies neuromusculaires différentes. Les myopathies sont l'ensemble des pathologies qui touchent les muscles squelettiques caractérisées par une structure et une fonction musculaire altérée. Les patients atteints de myopathies montrent une diminution de l'activité physique sans modification de la fonction sensorielle et autonome. Dans presque toutes les myopathies, la détérioration progressive de l'activité quotidienne du patient s'accompagne d'une détresse physique et psychologique, c'est pourquoi des thérapies de supports sont recommandées.

Les dystrophies musculaires comprennent plus de 30 types de maladies héréditaires qui sont caractérisées par une perte de tissus musculaires associée à une réduction progressive de la fonction musculaire et à un décès. La perte de la fonction musculaire s'accompagne dans certains cas de troubles au niveau du muscle cardiaque et du diaphragme. En effet dans certaines pathologies comme la dystrophie musculaire de Duchenne, les patients ont une espérance de vie de 30 à 40 ans. L'évolution de ces pathologies est dépendante de différents facteurs : l'âge d'apparition, la sévérité et le groupe de muscles affectés. Progressivement la maladie va avoir un impact sur le muscle cardiaque et le diaphragme. Les gènes associés aux dystrophies musculaires codent pour des protéines de la membrane plasmique, les citernes terminales, la matrice extracellulaire et le sarcomère. Certaines dystrophies musculaires comme les dystrophinopathies sont liées au chromosome X et se développent majoritairement chez les garçons qui portent une anomalie dans le gène concerné. Les femmes porteuses d'une anomalie sur un chromosome X ne présentent bien souvent aucune gêne mais ce chromosome X peut se transmettre à la descendance.

Les myopathies congénitales représentent un groupe divers de maladies rares et héréditaires des muscles squelettiques qui sont caractérisées par une structure anormale des fibres musculaires. Les signes cliniques sont larges mais sont souvent associés à une diminution du tonus musculaire, une faiblesse musculaire et une malformation A cause du manque de thérapies efficaces, des études sont requises pour trouver un candidat pour soigner les patients avec différents types de myopathies.

La découverte des gènes impliqués dans les formes génétiques de ces maladies est une avancée majeure dans la compréhension des mécanismes mis en cause. Ainsi, de nombreux modèles animaux ont été développés par ingénierie génétique et permettent de reproduire efficacement ces

troubles. Ces modèles murins donnent un aperçu des relations entre les gènes, forgent notre compréhension des mécanismes moléculaires et pathogéniques et conduisent à des progrès au travers de traitements pour les pathologies associées aux muscles. La plupart des approches thérapeutiques disponibles actuellement en clinique ont été développées à l'aide de ces modèles murins. A titre d'exemple, les polyphénols de thé vert, le tamoxifène et le riméporide font tous actuellement l'objet d'essais cliniques en tant que traitements possibles de la dystrophie musculaire de Duchenne. Pour être valide, un modèle alternatif aux modèles animaux devrait prendre en compte l'ensemble des phénomènes biochimiques et physiologiques qui ont lieu chez l'animal. A ce jour, les tests in vitro ou les modèles informatiques ne permettent pas de rendre compte de l'ensemble de ces phénomènes. Aucune méthode alternative n'est envisageable pour reproduire le plus fidèlement les myopathies et donc, étudier le potentiel effet bénéfique de nouvelles stratégies thérapeutiques.

L'objectif du présent projet est l'élevage de lignées génétiquement modifiées de rats et de souris reproduisant les troubles neuromusculaires. Cela permettra d'approfondir la caractérisation de ces modèles. Ultimement, ces études pourraient permettre d'identifier des substrats moléculaires et biologiques caractéristiques des troubles neuromusculaires et de développer de nouvelles cibles thérapeutiques. Afin de satisfaire au raffinement, l'hébergement des animaux sera réalisé dans des locaux appropriés avec des conditions optimales de température et d'hygrométrie et un cycle jour/nuit de 12h/12h. De plus, un enrichissement sera systématiquement placé dans chaque cage et le personnel sera habilité à réaliser les différentes procédures dans le respect des règles d'éthique, de bien-être animal et du principe des 3R. Les surveillances quotidiennes des animaux permettront d'identifier d'éventuels animaux en souffrance et de prendre les mesures appropriées (surveillance accrue, mise à mort dans les cas les plus graves). Le nombre d'animaux est calculé selon les protocoles expérimentaux de manière à obtenir le minimum d'animaux par groupe permettant des résultats significatifs et homogènes. Afin de constituer les différents lots expérimentaux, il est estimé que sur les 5 années du projet un total de 60000 animaux est nécessaire.

19396 Les nombreuses émergences et ré-émergences de maladies infectieuses humaines et/ou animales ces dernières années (sars-cov2, fièvre catarrhale ovine, virus Schmallenberg, virus de l'encéphalite à tique, virus Usutu...) ont souligné la nécessité de bénéficier d'un modèle rongeur adapté pour évaluer la pathogénicité de ces menaces et tester des approches thérapeutiques et prophylactiques efficaces. De par leur sensibilité accrue à de nombreux pathogènes, les souris sensibles (souche IFNAR -/-) constituent un modèle de choix pour des études d'infections préalables à des essais sur l'espèce naturellement ciblée par ces pathogènes (mammifères de taille importante) ou en absence d'hôtes naturels connus (virus transmis par des arthropodes). Il s'agit donc d'un modèle privilégié pour plusieurs groupes de recherche de notre Laboratoire et leurs collaborateurs associés. Au cours des 5 prochaines années, nous souhaitons donc d'une part maintenir cette colonie de souris IFNAR -/- et d'autre part les utiliser pour les applications suivantes : isolement viral, étude de virulence, évaluation de vaccins et traitements, étude de la physiopathologie de l'infection.

Ces études in vivo, seront réalisées dans le respect de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). Des études préliminaires sont réalisées en modèles in vitro (cellules d'arthropodes et de mammifères) afin de limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés. Nous limitons le projet aux seules expériences considérées comme absolument indispensable avec ce modèle et qui permettront d'apporter un bénéfice pour l'Homme et/ou l'animal cible.

Les animaux sont maintenus en groupes sociaux (mères + souriceaux ou groupes de 6 animaux) dans des cages aménagées avec tout le nécessaire pour assurer leur bien-être (abris, coton, morceaux de bois à ronger...). Un examen bi-quotidien sera assuré pendant la phase d'expérimentation proprement dite afin de détecter au plus tôt la survenue de tout point limite.

Nous envisageons l'utilisation de 60 souris / an (ce qui correspond au nombre moyen d'animaux utilisés ces dernières années durant les différents projets) sur 5 ans soit environ de 300 souris au

maximum. En outre, des pré-tests sur un nombre très restreint d'animaux seront réalisés pour réduire les risques d'échecs sur des expériences à effectifs plus importants.

19397 Les produits de santé (médicaments, dispositifs médicaux, etc.) constituent un élément clé dans la dispensation de soins de qualité aux patients. En alliant innovation et santé, la recherche et le développement de ces produits s'avèrent indispensables pour favoriser le progrès médical et l'accès aux meilleurs soins à tous.

Or, comme le souligne la réglementation (directive 2007/47/CE), il est obligatoire de prouver l'efficacité de ces produits avant de proposer un produit sur le marché. Notre établissement est fortement engagé dans le développement de méthodes alternatives in vitro : tests de cytotoxicité, test d'irritation in vitro, test de sensibilisation in vitro, modélisation sur cultures tissulaires et analyse mathématique du risque de toxicité. Cependant, les méthodes alternatives existantes à ce jour ne permettent pas de tester intégralement l'efficacité des produits de santé, en particulier en raison de la complexité des mécanismes de régulation d'un organisme vivant. L'utilisation d'animaux est alors obligatoire pour y parvenir.

Lorsque la législation et les normes en vigueur imposent de s'assurer des performances des produits de santé sur des modèles animaux, les rongeurs, les lagomorphes, les petits ruminants ou les porcins sont des modèles privilégiés étant données les similitudes reconnues avec l'organisme humain.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est basé sur les recommandations des textes de référence (ex : norme ISO 10993) et sur les contraintes scientifiques (ex : nombre suffisant d'animaux pour assurer la validation scientifique des études). Dès que cela n'impacte pas la santé ni le bien-être de l'animal, l'utilisation d'un même animal est optimisée de sorte à réduire le nombre total d'animaux utilisés (réutilisation d'un même animal après une période de repos ou optimisation du nombre de sites étudiés sur un même animal). Sur les 5 années du projet, jusqu'à 3060 animaux peuvent être utilisés (200 ovins, 100 caprins, 200 porcins, 1500 lapins, 1000 rats et 60 souris).

Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. Quelles que soient les études, la douleur est rigoureusement contrôlée et proscrite grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (ex : anesthésie/analgésie). Les rongeurs, petits ruminants et porcins sont hébergés en groupes sociaux harmonieux sauf lorsque les contraintes de l'étude l'empêchent. Par ailleurs, les petits ruminants sont hébergés en extérieur en dehors des périodes d'intervention et des périodes post-opératoires. Dans tous les cas, pour toutes les espèces sociales, l'hébergement individuel devra être justifié et validé par la structure du bien-être animal. Concernant les lagomorphes, des contacts visuels, olfactifs, auditifs voire tactiles entre congénères sont maintenus grâce à la structure des compartiments. Des enrichissements standards spécifiques à chaque espèce (bâtons à ronger pour les rongeurs, jouets pour les porcins/chiens et chainette + baton à ronger et foin pour les lagomorphes) sont présents dans les hébergements. Enfin, de la musique est diffusée en salle d'hébergement.

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

19398

Un des enjeux de la recherche contre le cancer est de prédire le traitement qui donnera la meilleure réponse pour une tumeur donnée. Bien qu'une importante variété de composés chimiques soit disponible, pouvant cibler différentes voies de survie cellulaire, nous manquons encore souvent d'informations pour fragiliser efficacement une tumeur afin de permettre l'intervention thérapeutique la plus adaptée.

Il est possible d'interroger fonctionnellement l'ensemble des gènes connus chez l'homme (environ 20 000) dans une seule expérience appelée crible génétique : Grâce à l'outil CRISPR/Cas, ayant récemment valu le prix Nobel aux chercheuses Emmanuelle Charpentier et Jennifer Doudna, une cellule se verra dépourvue d'un gène et la réponse de la cellule à l'inactivation de ce gène sera

mesurée, permettant de déterminer les gènes revêtant un caractère essentiel au développement de la tumeur.

Les PDXs, xénogreffes obtenues à partir de l'implantation des tumeurs humaines sur souris immunodéficientes, sont actuellement parmi les modèles les plus proches des tumeurs des patients et permettent la réalisation d'études dont le potentiel prédictif clinique est très élevé.

Dans ce projet, nous proposons de réaliser des expériences de cribles génétiques sur différents modèles de PDXs (En particulier cancer pédiatrique, cancer du sein, mélanome de l'uvée et medulloblastome).

Nous avons conçu notre projet en limitant au maximum le recours aux modèles murins et en suivant la règle des trois R :

Remplacer : Les mises au point nécessaires à la mise en place du criblage seront réalisées sur des modèles de culture cellulaire in vitro. Seule l'expérience de criblage à proprement parlé utilisera le modèle in vivo afin de récapituler pleinement une réponse tumorale.

Par ailleurs, les validations des gènes candidats issus du crible se feront, autant que possible, soit sur organoïdes (en collaboration) soit sur lignées cellulaires pour éviter le recours aux modèles murins. Des limites techniques nous empêchent de réaliser le crible génétique directement sur les organoïdes.

Réduire : l'utilisation du criblage génétique en interrogeant le génome entier requiert l'utilisation d'un nombre important de souris. Grâce à une recherche bibliographique approfondie, nous avons défini une sous-liste d'environ 300 gènes, pour lesquels des composés chimiques ont déjà été décrits ou bien présentant un fort intérêt thérapeutique, afin de réduire drastiquement le nombre d'animaux utilisés. De plus le design du projet permet de tester ces 300 gènes en même temps afin de réduire encore davantage le nombre de souris utilisées. Nous avons estimé que pour une tumeur, nous obtiendrons des résultats statistiquement pertinents sur 300 gènes en utilisant 2 lots de 14 souris. (A titre de comparaison, selon le même modèle prédictif l'étude du génome complet requerrait l'utilisation de plus de 800 souris pour un seul réplica). Ainsi nous prévoyons, sur une période de 5 ans, d'utiliser environ 700 animaux afin d'étudier environ 40 tumeurs couvrant notamment les grands types de cancer cités précédemment.

Raffiner : les interventions prévues sur les souris vivantes sont peu invasives. Toutes les précautions seront prises pour réduire au minimum la souffrance et le stress des souris (anesthésie, analgésie). En accord avec les recommandations internationales dans le domaine de la cancérologie, les animaux sont suivis quotidiennement afin d'assurer leur bien-être et les expérimentations sont arrêtées avant la souffrance des animaux

19399 Le syndrome de Prader-Willi (SPW) est une maladie génétique neurodéveloppementale rare (1/25000) et complexe, pour laquelle il n'existe aucun traitement qui en cible la cause. Le SPW est causé par l'absence d'expression de sept gènes co-exprimés dans le système nerveux central, incluant le gène NECDIN. À l'avenir, une thérapie génique pour la ré-expression de ces gènes sera certainement la meilleure façon de guérir le SPW. Pourtant, à notre connaissance, il n'y a pas eu jusqu'à présent d'approche de thérapie génique pour le SPW qui ait réussie.

Le phénotype des patients atteints du SPW est complexe et évolue avec l'âge. Cependant, une altération est présente tout au long de la vie des patients et est dramatique, représentant la première cause de mortalité des patients : un dysfonctionnement du contrôle central respiratoire. Cette altération des réseaux de neurones qui contrôlent la respiration induit de profondes apnées, à la fois pendant le sommeil et pendant l'éveil, et une forte diminution de la réponse ventilatoire en hypoxie et en hypercapnie. Parmi les différents modèles murins du SPW, seules les souris invalidées pour le gène Necdin (Ndn-KO) reproduisent les altérations respiratoires présentes chez les patients. Les souris Ndn-KO présentent d'ailleurs une mortalité à hauteur de 30% entre le premier et le troisième jour de vie, due aux altérations respiratoires, comme en atteste la cyanose souvent présente chez les nouveau-nés.

Dans ce projet de recherche, nous souhaitons (i) étudier ces altérations respiratoires pour en comprendre les mécanismes pathologiques, dans la poursuite des travaux réalisés au sein de notre

équipe depuis plus de dix ans, et (ii) développer une preuve de concept pour une thérapie génique pour le SPW. En effet, nous avons récemment montré que l'altération d'un groupe de neurones spécifique est certainement la cause des altérations respiratoires chez les souris Ndn-KO. Nous utiliserons des approches transgéniques, par croisement de souris génétiquement modifiée, ou par injections virales, pour moduler l'expression de Necdin. Nous pourrions ainsi induire l'expression de Necdin que dans les neurones d'intérêt, afin de tester les répercussions que cela aura sur l'activité respiratoire des souris. En modulant l'expression de Necdin dès la période embryonnaire, avant que l'invalidation de Necdin ne puisse commencer à générer des altérations, nous pourrions ainsi tester nos hypothèses sur les mécanismes conduisant à ces altérations, et envisager des approches pour y remédier. Si certains outils viraux permettent d'empêcher la survenue des altérations respiratoires lorsqu'ils sont injectés pendant la période embryonnaire, alors une deuxième phase du projet sera réalisée en testant l'injection de ces virus à la naissance. En effet, le SPW est diagnostiqué à la naissance, et toute approche à visée thérapeutique doit être développée avec cette contrainte. Nous espérons ainsi réaliser une preuve de concept pour une thérapie génique pour le SPW.

Les animaux utilisés seront exclusivement des souris, car c'est actuellement le seul modèle animal du SPW (nombre maximum de souris utilisées : 1104). Les études se réalisant durant la période périnatale, les souris seront utilisées sans distinction de genre.

Ce projet cherche à découvrir le mécanisme pathologique conduisant aux altérations respiratoires dans le SPW, et à développer une approche thérapeutique. Il relève donc par essence d'un manque profond de connaissances sur le sujet, et ne peut pas être remplacé par des approches alternatives, in silico par exemple.

Ce projet de recherche s'inscrit dans les principes de réduction (1) et de raffinement (2) des règles éthiques sur l'expérimentation animale.

(1) Notre projet de recherche s'effectue en étapes successives, dont les résultats conditionnent au fur et à mesure la poursuite du projet, ce qui nous permettra de n'utiliser qu'un minimum de groupes de souris. Notamment, les études avec injections post-natales ne seront pas réalisées si les injections prénatales ne permettent pas d'empêcher la survenue des altérations respiratoires, et seules les constructions virales les plus pertinentes cliniquement seront utilisées en injection postnatales. Egalement, la variabilité interindividuelle sera réduite par l'utilisation de souches murines fixées génétiquement. Enfin, les outils statistiques les plus appropriés seront utilisés, afin d'utiliser un minimum d'animaux par groupe expérimental pour atteindre des conclusions valides sur l'effet de nos expérimentations.

(2) Les animaux seront hébergés dans une animalerie conventionnelle, dans des cages avec environnement enrichi et au nombre d'animaux par cage limité, avec accès à l'eau et la nourriture ad libitum, dans des pièces thermo-contrôlées et au cycle jour/nuit en 12h/12h. Les animaux seront anesthésiés pour toutes les procédures expérimentales induisant de la douleur. Cette anesthésie sera accompagnée d'une analgésie et d'un suivi post-opératoire appropriés (utilisation d'une fiche de suivi individuelle). Le porteur du projet possède une grande expérience dans ce domaine.

19400 L'hypophyse est une glande située à la base du cerveau. Elle contrôle les sécrétions hormonales du corps humain (hormones de croissance, hormones thyroïdiennes, hormones sexuelles,...).

Au sein de cette glande, des tumeurs peuvent se développer. Il s'agit de tumeurs ayant pour répercussions, soit un envahissement des structures proches de l'hypophyse, soit un dérèglement des productions hormonales, soit les deux.

Actuellement, le meilleur traitement contre ces tumeurs hypophysaires consiste à les retirer chirurgicalement. La chirurgie est souvent mise en échec lorsque les tumeurs envahissent les structures cérébrales adjacentes dont l'accès n'est pas possible pour le chirurgien.

Les traitements médicamenteux alternatifs sont coûteux pour une efficacité variable.

Les mécanismes à l'origine de la survenue d'une tumeur au sein de l'hypophyse et ceux à l'origine de sa propagation vers les structures cérébrales adjacentes ne sont pas compris. L'objectif de notre

projet est de comprendre les mécanismes de la tumorigenèse et de l'envahissement des structures cérébrales adjacentes pour mettre au point de nouveaux traitements.

L'utilisation de modèles animaux dans l'étude des mécanismes de dissémination tumorale est nécessaire pour reproduire au mieux le micro-environnement tumoral humain. Il n'existe à ce jour aucune méthode alternative ou substitutive qui permette un remplacement in vitro ou in silico, et l'étude de nouvelles stratégies thérapeutiques doit nécessairement être faite in vivo. Nous avons néanmoins optimisé les protocoles afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Nous limiterons nos expériences à l'étude des mécanismes ayant déjà montré leur efficacité sur des lignées cellulaires. Des tests de puissance statistique ont été utilisés pour calculer le plus petit nombre d'animaux nécessaire à l'obtention de résultats statistiquement exploitables.

Enfin, dans un souci de raffinement des procédures, un soin particulier sera apporté aux questions relatives au bien-être animal, les conditions d'élevage et d'hébergements seront appropriées, les animaux seront maintenus en cages collectives avec utilisation d'un enrichissement du milieu. Finalement nous utiliserons des analgésiques avant et après tout acte chirurgical.

La physiologie générale chez le rongeur est suffisamment proche de celle de l'être humain pour que les informations obtenues soient pertinentes d'un point de vue médical. Nous utiliserons au total un maximum de 140* animaux (souris, rats) sur 3 ans.

* Mise à jour le 18/06/21 de la saisine n°2020022115123683 : 17 souris supplémentaires provenant du croisement C57BL/6 x BALB/C, souche moins fragile ayant donné la lignée cellulaire LbT2, ont été utilisées avant les souris Nude afin de s'assurer du bon choix de modèle expérimental.

19401 Les brûlures constituent un important problème de santé publique, avec près de 11 millions de personnes dans le monde subissant annuellement des brûlures suffisamment graves pour nécessiter des soins médicaux. Ce problème de santé publique est particulièrement important chez les enfants, qui représentent près de 50 % des brûlés, et pour lesquels la stratégie thérapeutique choisie le plus souvent est d'effectuer une autogreffe de peau. Le nouveau biomatériau que nous testons dans ce projet vise à être utilisé en tant que pansement pour les brûlures de second degré, pour accélérer la cicatrisation, diminuer les risques d'infection et de douleur et permettre éventuellement la régénération de la peau. Ce pansement innovant, comprenant deux composantes qui seront testées indépendamment et conjointement, a été mis au point après de nombreux tests in vitro pour identifier de nouvelles molécules et de nouveaux mécanismes de régénération. L'intérêt est d'améliorer la vitesse et la qualité de cicatrisation par rapport aux pansements traditionnels. Notre étude est donc une étude pilote qui consiste à valider la biocompatibilité et l'efficacité du dispositif sur un modèle animal. Si cette première vérification était validée, des tests futurs démontreront les performances du biomatériau sur des cas cliniques de brûlures de second degré. En pratique, il faudra tester l'effet de chacune des deux composantes du pansement et des deux ensemble sur la cicatrisation d'une plaie cutanée et les comparer à un groupe de souris contrôles sans pansement. Pour cela, des plaies seront réalisées sur le dos des souris le premier jour de la manipe (J0) sous anesthésie gazeuse, puis une/deux/aucune composante du pansement sera appliquée sur la plaie (toujours sous anesthésie) et gardée jusqu'à J3, J5 ou J7 post-plaie. Les souris seront mises à mort à différents jours post-plaie (J3, J5, J7 ou J9) pour prélever les plaies et réaliser des analyses histologiques et moléculaires.

Les souris se diviseront en 4 groupes expérimentaux comportant 200 souris au total pour ce projet. Notre projet s'inscrit par ailleurs dans le respect de la règle des 3Rs :

Remplacement : Le biomatériau a préalablement été testé in vitro. Notre projet actuel étant de valider la biocompatibilité et l'efficacité du dispositif médical sur la peau qui est un tissu complexe, il doit réglementairement être réalisé sur des modèles animaux avant tout essai clinique chez l'homme. Un système vivant est nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu dans le développement du projet et il n'est pas possible, à l'heure actuelle, de recréer in vitro la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires rentrant en jeu dans la cicatrisation.

Réduction : Nous limitons au maximum le nombre d'animaux par groupe mais avons besoin d'un nombre minimal qui donnerait des résultats statistiquement fiables. Car, à cause des variabilités

interindividuelles et intergroupes, un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables et non valides. Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 200 souris pour une durée maximale de 3 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale déjà développée et validée par notre équipe. Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

Raffinement : Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures ont été mises au point afin de permettre une interprétation fiable des résultats, dans le respect du bien-être animal et en limitant sa douleur et son stress. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation, les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum. Le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification ou de maison de type igloo. Nous nous efforçons à chaque instant de raffiner nos procédures afin de garantir le bien-être des animaux en cours de procédure grâce à une surveillance attentive et des soins adaptés. Toute manipulation sera par ailleurs associée à une fréquence et un dosage d'analgésiques et d'antalgiques adéquates pour réduire la souffrance de l'animal.

19402 Nous sommes constamment bombardés d'informations sensorielles provenant de notre environnement. Ces informations sensorielles proviennent de sources multiples (visuelles, auditives, olfactives, tactiles, etc.) et doivent être traitées et intégrées correctement par le cerveau. Ce traitement d'information sensorielle est crucial pour l'interaction avec notre environnement, et pour la cognition et apprentissage. Les altérations de la perception sensorielle, est une caractéristique d'un certain nombre de troubles neuropsychiatriques. Ces altérations peuvent être extrêmement débilantes et affecter de nombreux aspects de la vie quotidienne. Une meilleure compréhension de la base neurologique de ces troubles est essentielle pour la prise en charge de ces maladies et pour la conception de nouveaux traitements thérapeutique ciblant les mécanismes sous-jacent ces maladies.

L'objectif de ce projet est de valider un nouveau dispositif expérimental permettant l'exploration de la prise de décision basée sur la perception sensorielle chez la souris. Le but ultime de notre projet est l'application de dispositif à la caractérisation des défauts comportementaux chez des modèles murins des troubles neuropsychiatriques. Cette étude correspond à une étude pilote qui nous permettra de mieux garantir le succès des études futures et de contribuer ainsi à une réduction globale des animaux utilisés. Pour la réalisation de cette étude pilote, nous demandons l'autorisation pour 30 souris.

En accord avec le principe des 3Rs (réduction, raffinement, remplacement), nous avons réfléchi à notre projet de recherche de façon à réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés ainsi que la souffrance imposée par les procédures détaillées dans ce document. Réduction : La conception expérimentale soigneuse de notre projet permettra une stratégie de réduction globale de nombre animaux utilisés pour les études futures. De plus, nous avons intégré une stratégie permettant une évaluation précoce de nos résultats et si nécessaire, une réduction de nombre d'effectifs nécessaire à la réalisation de nos objectifs scientifiques. Raffinement : Les animaux seront hébergés dans une manière adaptée à leurs besoins et recevront une surveillance quotidienne et les soins adaptés. Tous les animaux seront hébergés en groupe avec du matériel de nidification et auront accès à de la nourriture et de l'eau sous forme liquide ou solide (gel). Tous les animaux seront habitués à la manipulation et aux procédures comportementales (pièce d'expérimentation). Plusieurs raffinements spécifiques à la procédure seront également prévus (définition des points limites précoces et mesures conservatoires, et soins adaptés). Remplacement : Le projet porte sur la validation d'un test comportemental. Les expériences proposées nécessitent l'utilisation d'un modèle animal vivant et ne peut pas être remplacé par les études in vitro ou in silico. Les études cliniques ne sont pas adaptées à notre objectif expérimental car il s'agit d'une population clinique fragile et car les approches invasives sont nécessaires pour répondre à nos questions scientifiques futures. Les circuits neuronaux sont bien conservés chez les différentes espèces de mammifères et sont donc susceptibles d'être fonctionnellement similaires chez les rongeurs et les humaines. L'utilisation des modèles de plus faible sensibilité neuronale (tels que la mouche à vinaigre) n'est pas adaptée à notre projet, car cet organisme manque la structure cérébrale ciblée par notre étude.

19403 Les maladies neurodégénératives constituent un problème majeur en santé publique. Malgré d'importants efforts de recherche, il n'existe encore aucun traitement capable de combattre de façon efficace la progression de ce type de maladies.

Des nouvelles approches thérapeutiques sont essentielles pour progresser dans la prise en charge des patients. Parmi ces nouvelles approches prometteuses se trouve la thérapie génique. Elle utilise l'ADN pour soigner ou prévenir de la maladie. Selon la pathologie, cet objectif peut être atteint en délivrant aux cellules un gène à action thérapeutique (transgène) qui surexprime la protéine déficitaire dans la maladie. Ces acides nucléiques sont le plus souvent transportés dans les cellules grâce à des vecteurs viraux, des outils couramment utilisés en biologie moléculaire pour délivrer un gène d'intérêt. L'administration dans le cerveau se fera à l'aide d'un vecteur (AAV) administré par voie chirurgicale intracérébrale. Les vecteurs exprimeront des gènes rapporteurs/thérapeutiques. Le but est de développer des outils de transfert de gènes afin d'envisager des nouvelles stratégies thérapeutiques pour des maladies neurodégénératives graves et sans traitement aujourd'hui. Cette étude nous permettra de choisir le sérotype d'AAV optimisé le plus approprié pour une thérapie génique avec administration intracérébrale. Des rongeurs (souris) seront utilisées pour évaluer l'expression et biodistribution de différents gènes délivrés via différents AAVs, en vue d'une utilisation ultérieure dans des modèles rongeurs des pathologies ciblées, étape essentielle pour établir la « preuve de concept » d'une stratégie thérapeutique. Pour cela il faudra avant tout optimiser et maximiser l'expression des gènes thérapeutiques dans les régions cible. Le but principal est de comparer différents sérotypes d'AAV avec des modifications dans les capsides qui peuvent modifier et donc améliorer l'expression des transgènes, étape importante pour maximiser l'effet d'un traitement dans une future thérapie génique après injection d'un AAV exprimant un gène thérapeutique. A la fin de l'étude les souris seront euthanasiées et le nombre de copies de vecteurs et les niveaux de protéines seront comparés entre les différents vecteurs avec ou sans capsides modifiées.

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

Réduction: Le nombre d'animaux utilisés est optimisé pour obtenir des résultats statistiques. Leur nombre (248) a été restreint au minimum indispensable de façon à obtenir des données nécessaires pour valider l'efficacité d'une stratégie thérapeutique innovante qui peut être considérée comme cible dans plusieurs maladies neurodégénératives. En effet, des travaux précédents ont permis d'établir les doses de vecteur à injecter et les temps d'analyses.

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

19404 L'immunothérapie représente une révolution dans le traitement du cancer. Ce traitement consiste à réactiver la réponse immunitaire des patients contre les cellules cancéreuses. Avant on administrait un médicament qui avait pour but de détruire les cellules cancéreuses, comme avec les chimiothérapies. Avec les immunothérapies anti-cancéreuses, c'est le patient lui même qui est de nouveau capable de combattre le cancer. La famille des immunothérapies anti-cancéreuses est constituée par plusieurs agents : les inhibiteurs des points de contrôle immunitaires (anti-PD1, anti-PDL1 et anti-CTLA4). Ils ont démontré leur efficacité en réduisant la mortalité de nombreux cancers agressifs, comme le mélanome (cancer de la peau). Ils sont actuellement à l'essai dans de nombreuses autres indications. Ainsi, de plus en plus de patients vont bénéficier à l'avenir de cette nouvelle stratégie thérapeutique, dans une multitude de cancers. Cependant, ces thérapeutiques peuvent induire des complications, des toxicités médiées par l'immunité qui est « suractivée »,

appelées « immuno-médiées ». Elles peuvent toucher de nombreux organes et notamment la toxicité cardiovasculaire la plus fréquemment décrite est la myocardite aigue. Il s'agit d'une inflammation du coeur, dont la fréquence peut atteindre jusqu'à 1. 5% des cas dans les registres. Cette complication n'est donc pas très fréquente mais peut être très grave, puisqu'elle conduit au décès dans 25 à 50% des cas. Il s'agit donc d'une complication grave pour laquelle un diagnostic précoce est capital, afin de ne pas entacher le bénéfice anticancéreux de ces immunothérapies. Pour cela, il est nécessaire de mieux comprendre les mécanismes conduisant à cette toxicité cardiaque et les facteurs prédictifs, ce qui n'est pas encore connu dans la littérature scientifique rendant difficile une prise en charge rapide et efficace. De même, le traitement adéquat de ces myocardites repose sur un traitement immuno-suppresseur, par corticoïdes, pour diminuer l'immunité suractivée. En cas de mauvaise réponse, il est recommandé d'augmenter le traitement immunosuppresseur mais aucune précision n'est faite sur quelle molécule utiliser. Un modèle pré-clinique est donc indispensable pour bien comprendre tous les mécanismes qui conduisent à la toxicité cardiaque, afin de la prendre en charge, si possible la prévenir, et traiter les formes résistantes efficacement, améliorant ainsi la prise en charge globale de ces patients porteurs d'un cancer.

Afin de mieux comprendre et décrire ces complications, nous proposons de mettre en place un modèle murin d'étude de la toxicité cardiaque induite par les immunothérapies anti-cancéreuses de type anti PD1/CTLA4, molécules les plus fréquemment prescrites. Remplacer : Nous faisons le choix d'utiliser le modèle animal, afin de pouvoir aborder l'organisme vivant dans son entièreté et toute sa complexité, ce qui n'est pas possible ex vivo, d'autant que l'interaction entre tumeur / système immunitaire / coeur semble au centre du mécanisme d'action. Nous utiliserons le modèle murin car il présente des caractéristiques immunitaires et cardiovasculaires proches de celles de l'homme. Afin de reproduire le même contexte que chez l'homme, où le cancer crée un état inflammatoire, nous injecterons à ces souris des cellules tumorales engendrant le développement d'un mélanome. Nous les traiterons ensuite avec l'immunothérapie anti-cancéreuse sus citée et nous observerons : le développement de complications cardiaques à l'aide d'enregistrements électriques du coeur (électrocardiogramme), de prélèvement sanguins (biomarqueurs cardiaques), d'imagerie cardiaque (échographies et imagerie par résonance magnétique) et enfin d'analyse du tissu cardiaque et moléculaire. Cela devrait nous permettre de mieux caractériser la toxicité cardiaque induite par ce traitement d'immunothérapie. En particulier, le type de dysfonction cardiaque qu'elle induit, les cellules ciblées par les anticorps, les gènes et protéines impliqués dans ces défauts cardiaques, les relations entre cellules inflammatoires et cellules cardiaques. Nous allons également tester différentes thérapeutiques immunosuppressives pour ces myocardites afin de déterminer la plus efficace. Réduire : Le nombre d'animaux a été calculé et maintenu minimal tout en générant le maximum d'information exploitables scientifiquement et est porté à 300 souris sur 5 ans. L'étude du modèle par imagerie et prélèvements biologiques permettra une étude longitudinale du même animal et donc une réduction du nombre d'animaux nécessaires. Ce travail mené chez la souris sera confronté aux études cliniques chez des patients cancéreux traités par les mêmes molécules, et présentant des signes de toxicité cardiaque, afin de limiter au maximum le nombre d'animal utilisé. Raffinement : Les animaux seront hébergés dans des conditions maîtrisées : dortoir ventilé, avec eau et aliments à volonté, respectant le cycle jour/ nuit, avec enrichissement, bénéficiant de visites quotidiennes de personnels qualifiés. Les points limites anticipés sont la défaillance cardiaque et tout signe de détresse/souffrance liées au développement de cette défaillance et à l'inflammation induite. Une grille de score sera utilisée avec conduite à tenir préspecifiée en cas de score élevé et euthanasie de l'animal en cas de souffrance jugée inacceptable. Par ailleurs, la nature des expériences conduites (administrations intrapéritonéales, imagerie et ECG non invasifs sous anesthésie) n'entraînent pas de douleurs particulières.

19405 Nous nous intéressons aux dystrophies musculaires, un groupe hétérogène de maladies génétiques touchant le muscle squelettique. Elles sont caractérisées par une faiblesse musculaire, une dégénérescence progressives dans les muscles du corps. Dans certains types de dystrophies musculaires, comme par exemple la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) ou la dystrophie musculaire oculo-pharyngée (OPMD), l'apparition de tissu cicatriciel (fibrose) dans les muscles est

également observée. Dans ce contexte, nous nous intéressons à la régénération musculaire chez l'homme, pour comprendre comment elle se déroule et comment elle peut être perturbée dans le cas des pathologies touchant le muscle.

La régénération musculaire c'est le processus par lequel le muscle est capable de récupérer sa fonctionnalité après un dommage. Ce processus est géré par une population de cellules souches, appelées cellules satellites, qui est capable suite à un dommage musculaire de former de nouvelles fibres musculaires. Cependant, peu de choses sont vraiment connues de la régénération d'un muscle humain in vivo et encore plus au cours des dystrophies musculaires. En effet la régénération musculaire est principalement étudiée chez la souris soit en étudiant directement la régénération d'un muscle de souris avec tous les acteurs cellulaires murins, soit avec une xénogreffe de cellules humaines dans un modèle de régénération chez la souris immunodéficiente. La possibilité de xénogreffe d'un muscle humain offre donc beaucoup d'avantages pour étudier la régénération musculaire humaine in vivo. Le choix d'un modèle de souris immunodéficiente est indispensable puisque il s'agit de tester des biopsies humaines.

Ce projet consiste à étudier la régénération in vivo d'un muscle humain isolée à partir d'une biopsie humaine issue de patients atteints de dystrophies musculaires en le comparant à une biopsie du même muscle prélevé chez des sujets contrôles. Pour cela, le muscle Tibialis Anterior (TA) et le muscle Extensor Digitorum Longus (EDL) de la souris doivent être enlevés et un fragment du muscle humain est greffé chez une souris immunodéficiente. Ce protocole a été largement détaillé dans la littérature et dans notre laboratoire. Le muscle humain implanté commence par dégénérer pour ensuite régénérer progressivement avec une revascularisation et une réinervation, permettant ainsi d'étudier toutes les étapes de régénération musculaire humaine.

Au total, 360 souris seront utilisées. En respect de la règle des 3R, le fait que nous allons utiliser du tissu humain permettra de nous rapprocher de la recherche de thérapies chez l'humain, cependant la régénération musculaire est un processus qui peut être investigué exclusivement in vivo et pour lequel un remplacement in vitro n'est pas encore possible. Pour la réduction, nous utiliserons le nombre minimum de souris nécessaire pour avoir des différences statistiquement significatives entre les groupes de souris. Les souris sont anesthésiées. Un traitement analgésique est administré au moment de l'anesthésie afin de renforcer l'analgésie et en période post-opératoire. Pour le raffinement, le milieu dans lequel les souris sont élevées est enrichi et suite au réveil, les animaux seront surveillés quotidiennement pendant toute la durée de l'expérience afin de détecter des signes de douleur.

19406 Thématique :

Les mécanismes de l'immunité façonnent le développement du cerveau. En particulier, le complément, un système de plus de trente protéines en interaction qui contribue à l'immunité innée, est impliqué dans le raffinement des circuits neuronaux pendant l'enfance et l'adolescence : le surplus de connexions (synapses) entre les neurones est éliminé grâce à la reconnaissance des synapses à supprimer par le complément.

Ce phénomène est important pour la maturation du cerveau. Son dysfonctionnement est associé à des altérations pathologiques du cerveau. En particulier, certains gènes du système du complément prédisposent à la schizophrénie, une pathologie invalidante qui touche environ 1% de la population adulte et se caractérise notamment par des idées délirantes, un retrait social, des difficultés de concentration et de planification. L'ensemble de ces symptômes de la schizophrénie sont mal traités par les médicaments actuellement disponibles, et les effets secondaires de ces traitements sont importants.

Objectif :

L'objectif principal de ce projet est de mieux comprendre comment le complément élimine les synapses en conditions normales et pathologiques en utilisant des modèles de souris chez lesquelles certains gènes codant pour des molécules du complément ont été modifiés.

Le projet s'articule autour de deux grands axes :

- (i) étudier l'action du complément sur la construction des circuits neuronaux
- (ii) déterminer quels mécanismes neurobiologiques sous-endent l'action délétère de gènes du complément impliqués dans la schizophrénie.

Modalités techniques :

Dans les modèles de souris transgéniques, nous effectuerons des chirurgies pour modifier l'expression de certains gènes du complément dans le cortex préfrontal par électroporation in utero.

3 R :

Notre projet s'inscrit dans le cadre des 3R (remplacement, réduction, raffinement)

a) Remplacer :

De manière à réduire le nombre d'animaux utilisés, leur remplacement par une approche cellulaire est toujours privilégié, culture primaire de neurones mais aussi lignées cellulaires transfectées lorsque la question scientifique posée le permet. Cependant pour des raisons scientifiques nous devons utiliser le modèle murin qui est le seul modèle permettant de modéliser les pathologies du système nerveux central.

b) Réduire :

Une étude statistique a été réalisée pour déterminer le nombre d'animaux nécessaire pour chaque lot à partir de nos expériences précédentes. Ainsi nous avons réduit ce nombre au strict minimum nécessaire à atteindre la puissance statistique requise. Afin de restreindre encore la quantité, les animaux sont utilisés pour une série de test lorsque l'impact d'un premier test n'intervient pas sur les tests subséquents.

c) Raffiner :

Le raffinement de la qualité de vie des animaux est obtenu en enrichissant les conditions d'hébergement des animaux (pièces de cartons permettant la réalisation de nid), en réduisant la durée d'expérimentation et en prévoyant des anesthésiques et analgésiques en cas d'intervention invasive. Des points limites sont définis pour limiter au maximum la souffrance ou la détresse des animaux.

Le nombre d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats robustes non-contestables est de 920 souris pour les cinq années à venir.

19407 L'hémorragie sous-arachnoïdienne (HSA) correspond à une issue de sang d'origine artérielle dans les espaces sous-arachnoïdiens. Il s'agit d'une urgence neurovasculaire puisque le taux de mortalité s'élève à 60% à la phase initiale. L'incidence annuelle moyenne de l'HSA non traumatique est de 9,1 pour 100000 individus. Elle représente le deuxième motif neurologique d'admission en réanimation. La principale étiologie est la rupture d'un anévrisme artériel intracérébral. L'impact socio-économique de cette pathologie est majeur puisqu'elle touche des sujets jeunes dont près d'un tiers des survivants conservent de lourdes séquelles neurologiques. Le principal facteur associé à l'importance du handicap après HSA est la survenue d'une ischémie cérébrale retardée (ICR). L'ICR est actuellement définie par la survenue dans les suites d'une HSA 1/ d'un infarctus cérébral dont la preuve est faite en imagerie ou en histologie et 2/ de l'apparition d'un déficit neurologique retardé. A ce jour, en dépit de plusieurs années de recherches sur le sujet, aucune thérapeutique testée chez l'homme n'a fait la preuve de son efficacité pour réduire l'incidence de l'ICR telle qu'elle a été définie en 2010 par la communauté scientifique. Cette situation s'explique par une physiopathologie de l'ICR qui demeure mal connue. L'ICR a longtemps été rattachée à la seule survenue de vasospasme après HSA. En effet, le vasospasme, en réduisant le débit sanguin cérébral d'aval serait responsable d'ischémie cérébrale dans le territoire concerné. Or, la survenue possible d'ICR en l'absence de vasospasme (et inversement), ajoutée à l'inefficacité des thérapeutiques qui visent la restauration du calibre des artères, conduisent à explorer de nouvelles voies. En ce sens, il est actuellement fortement suspecté le rôle clé d'une dysfonction de la microcirculation à l'origine de phénomènes de microthromboses pouvant participer à la genèse de l'ICR. L'ICR peut être la conséquence de la formation de microthrombi, en rapport avec l'activation de cascades de la coagulation dans les jours suivant l'HSA : ces microthrombi ont été mis en

évidence en autopsies. De plus, des taux élevés de platelet activating factor et de facteur von Willebrand (vWF) ont été mis en évidence chez des patients avec ICR. Le vWF est une protéine procoagulante qui participe à l'hémostase primaire en permettant l'adhésion des plaquettes à l'endothélium vasculaire et en jouant un rôle de transporteur du facteur VIII de la coagulation. Il est actif sous forme de multimères composés de monomères de vWF reliés par des ponts disulfures. La N-AcetylCysteine (NAC) est une thérapeutique largement utilisée actuellement dans des indications mucolytiques et toxicologiques. Par sa structure moléculaire, la NAC peut réduire les ponts disulfures entre monomères de vWF et ainsi diminuer leur activité. L'implication du vWF dans les mécanismes physiopathologiques conduisant à l'ICR et le vWF comme cible thérapeutique spécifique de la NAC dans l'HSA n'a à ce jour jamais fait l'objet d'études expérimentales ou cliniques. Le développement récent d'outils de biologie moléculaire adéquats associé à des moyens d'investigation appliqués dans le champ des neurosciences que notre équipe maîtrise rend cette perspective envisageable.

Les objectifs de notre travail sont :

- 1/ L'évaluation de l'activité du vWF sur un modèle d'HSA chez la souris par différentes techniques.
- 2/ L'étude sur ce modèle préclinique de l'implication du vWF sur la genèse de microthromboses.

Cette étude basée sur l'expérimentation animale prend en compte le bien être animal et les pratiques éthiques et répond à la règle des 3R (Remplacer, Réduire et Raffiner). La souris est l'animal le plus étudié dans le domaine des accidents vasculaires cérébraux (AVC) hémorragiques et présente le meilleur compromis entre pertinence scientifique et sensibilité de l'espèce. La physiopathologie est donc globalement établie, ce qui nous permettra d'interpréter nos résultats de manière fiable. L'ensemble des acquis et des connaissances dont nous disposons rend cette espèce particulièrement intéressante dans le cadre de notre étude. Notre projet ne nous permet pas d'utiliser d'autres moyens qu'un modèle animal sous anesthésie.

Nous utiliserons le nombre minimal d'animaux par une planification rigoureuse des expériences afin de souscrire au principe de réduction. Un total de 420 animaux sera donc nécessaire pour la réalisation de ce projet. Afin de souscrire au principe de raffinement, les animaux bénéficieront d'une sédation-analgésie durant chaque procédure dès la présence de souffrance, de douleur ou d'angoisse. La douleur suite à la survenue de l'AVC hémorragique est considérée comme modérée: les observations initiales montrent que les animaux se déplacent et s'alimentent normalement, prennent bien soin de leur pelage, n'émettent aucun son et ne présentent aucun « sickness behavior syndrom ». Le bien-être des animaux sera suivi par du personnel formé bi-quotidiennement 5j/7 et quotidiennement pendant les WE et jours fériés. Les animaux seront hébergés dans des cages standards aux normes européennes. Les principes éthiques et les standards de raffinement seront utilisés jusqu'à la mise à mort de l'animal.

19408 De nos jours on fait face à une véritable pandémie en ce qui concerne le développement des maladies métaboliques telles que l'obésité et le diabète de type 2. Une étude parue dans la revue New England Journal of Medicine a quantifié cette pandémie en prévoyant pour 2030 un taux de développement de 72% pour les Etats Unis et même supérieur à 150% pour certains pays en cours de développement L'évolution de cette pathologie est pandémique, sa nature inflammatoire est reconnue et elle a pour conséquence l'augmentation du risque de développement d'autres maladies cardio-métaboliques telles que l'hypertension artérielle, l'athérosclérose et le diabète de type 2. Les impacts des facteurs génétiques et les mauvaises habitudes alimentaires (régime riche en graisse et pauvre en fibre) n'expliquent que 10% de cette augmentation. Aujourd'hui, un nouvel acteur dans le métabolisme de l'hôte a été identifié, c'est le microbiote oral. Les patients obèses sont caractérisés par un microbiote oral dysbiotique. La dysbiose se définit par un déséquilibre autant qualitatif et quantitatif de la flore pouvant se traduire par une diminution de la diversité bactérienne et/ou excès de certains pathogènes. La dysbiose du microbiote oral a été associée à la survenue de pathologies métaboliques, sans encore en avoir identifiés les mécanismes moléculaires responsables.

Le but de ce projet est de comprendre les mécanismes moléculaires à travers lesquels le microbiote buccal module et régule l'homéostasie lipidique et glucidique de l'hôte dans le cadre de l'obésité. Pour cela nous allons transférer le microbiote oral de personnes obèses ou normo-pondérées dans la cavité buccale de souris, puis étudier l'impact de ce transfert sur les paramètres immuno-inflammatoires (locaux et systémiques) et métaboliques sous régime obésogène (riche en graisses). Nous évaluerons également morphologiquement et qualitativement les différents tissus adipeux représentant des organes cibles des bactéries.

L'étude nécessitera l'utilisation d'une souche de souris classiquement utilisée dans les études du métabolisme et de l'obésité. L'utilisation du modèle animal de la souris s'impose quant à la nécessité d'étudier les effets nutritionnels du régime riche en graisse sur les altérations du métabolisme glucidique et lipidique conduisant à l'obésité. En effet, c'est bien ce type de régime qui est à l'origine de la pandémie métabolique ci-dessus mentionnée. De plus, l'homme partage avec les souris les composantes bactériennes principales, ce qui valide les études de modifications du microbiote du tractus gastro-intestinal vis-à-vis des approches nutritionnelles tels que le régime gras. En parallèle, nous utiliserons des modèles de souris génétiquement modifiées afin de mettre en évidence les mécanismes moléculaires responsables. Ces animaux sont viables, fertiles et ne développent pas d'anomalies pouvant entraîner un mal-être. Les souris seront hébergées par cage comportant un nombre d'individus adapté en fonction de leur poids. Les animaux seront observés quotidiennement et pesés une fois par semaine pour déceler de potentielles anomalies (comportementales et notamment au niveau de la prise alimentaire, éventuelles blessures). Des carrés de ouate seront placés dans les cages systématiquement (pour permettre aux animaux de faire des nids). Dans le cas où des blessures, un comportement anormal ou une taille anormale sont identifiés, les animaux seront pris en charge. En fonction des blessures et sur avis du vétérinaire référent de la structure, les animaux seront soit soignés, soit euthanasiés. Les manipulations prévues sont non-invasives ne devraient en aucun cas entraîner de douleur ou mettre en danger la vie de l'animal. Les études sur ces souris seront terminées par des prélèvements de tissus et organes après une méthode d'euthanasie appropriée et réglementaire.

Nous comptons utiliser un total de 560 souris âgées de 6 semaines au début de l'étude. Ce chiffre nous permettra d'atteindre un seuil statistiquement valable et donc de pouvoir interpréter les résultats obtenus. En effet, cela permettra donc de ne pas répéter les expérimentations tout en respectant la réduction du nombre d'animaux employés. Lorsque certains animaux seront utilisés pour plusieurs procédures indolores il sera vérifié que celles-ci sont compatibles et appliquées séquentiellement après un repos entre chaque procédure.

19409 Chez l'homme comme chez la souris, le tissu adipeux brun permet la production de chaleur et est très important pour maintenir la température corporelle en particulier chez les nouveaux nés. Alors que chez l'homme ce tissu régresse au cours de l'enfance, il est persistant chez la souris où tout au long de la vie, il permet de produire de la chaleur participant à garder une température corporelle stable, malgré les variations de la température extérieure. Chez la souris ce tissu qui commence à se développer à la fin de la période embryonnaire, devient clairement repérable à la naissance et sa taille augmente durant la période périnatale. Cette augmentation de taille résulte d'une prolifération des cellules de ce tissu mais aussi de l'augmentation de la taille de chacune des cellules qui le constituent par accumulation de lipides. La période de prolifération est particulièrement importante durant la deuxième semaine postnatale pour devenir quasi inexistante par la suite. Cependant cette prolifération peut être réactivée chez l'adulte, lors d'une exposition au froid prolongée. Cela augmente la quantité de tissu donc la capacité de l'animal à produire de la chaleur, lui permettant de maintenir sa température. La nature du signal qui déclenche le développement important du tissu adipeux brun observé durant la période postnatale reste inconnue.

Le but de ce projet est d'étudier si cette croissance importante représente une réponse d'exposition au froid de façon similaire à ce qui a été décrit chez l'adulte. En effet lors de la mise bas, les nouveaux nés subissent un changement brusque de la température de leur environnement.

Pour cela nous utilisons des souris gestantes maintenues à 30°C ou à 23°C, pendant toute la durée de la gestation mais aussi après mise bas pendant 30 jours. 30°C représente la thermoneutralité chez la souris, c'est-à-dire une température qui ne nécessite pas de mécanisme particulier pour maintenir la température corporelle. 23°C au contraire constitue un léger stress thermique, s'accompagnant chez la souris adulte, d'une activation du tissu adipeux brun et de production de chaleur. Deux types d'expériences seront menés dans les portées nées aux deux températures, dans 2 procédures différentes. Dans la première, nous étudierons l'impact de la température sur la capacité du tissu adipeux brun à proliférer, en injectant à des animaux de 8 jours un produit permettant d'identifier les cellules en prolifération. Dans la seconde nous étudierons à quinze jours et à un mois, l'influence de la température sur le poids et la composition du tissu adipeux brun.

Aucun modèle *in vitro* ne peut se substituer au modèle animal pour ce type d'études physiologiques qui impliquent des effets au cours du temps et des communications entre plusieurs organes, potentiellement le cerveau pour détecter la température et le tissu adipeux brun en développement. Les mécanismes sont complexes et doivent être envisagés à l'échelle de l'organisme entier.

Un suivi adapté à chaque procédure a été mis en place et des points limites suffisamment prédictifs ont été fixés pour éviter toute souffrance des animaux et au-delà desquels la procédure est arrêtée. Le maintien en groupes sociaux et l'utilisation d'anesthésiques permettent aussi d'éviter le stress et de limiter tout risque de souffrance. Le nombre minimal d'individus nécessaires a été calculé au plus juste pour permettre l'obtention de résultats statistiquement significatifs

L'ensemble de ce projet utilisera au maximum 96 souriceaux âgés de 30 jours au plus.

19410 La protéine ATP7B est un transporteur du cuivre présent dans les cellules de l'organisme qui sert à éliminer le cuivre excédentaire des cellules, en particulier hépatiques. Des mutations de cette protéine entraînent la survenue de maladies dont la maladie de Wilson, responsable d'hépatites sévères, sous des formes aiguës fulminantes ou chroniques menant à terme à la cirrhose et au carcinome hépatocellulaire, et/ou de troubles neurologiques et psychiatriques en lien avec une surcharge en cuivre libre dans l'organisme par défaut d'élimination biliaire. Depuis plus de trente ans, il est communément admis qu'en cas de surcharge en cuivre, la protéine ATP7B va se localiser dans le réticulum endoplasmique et intégrer le cuivre excédentaire dans des vésicules d'exocytose. Or, des expériences récentes ont montré qu'en fait, la protéine ATP7B se localiserait préférentiellement dans la paroi apicale des hépatocytes, pour une élimination directe du cuivre dans les canalicules biliaires. Cette découverte pourrait ouvrir la voie à la recherche de nouveaux co-effecteurs de la protéine ATP7B impliqués dans cette voie d'excrétion du cuivre, qui pourraient constituer des cibles potentielle de traitements, médicamenteux ou par thérapie génique.

Les expériences sur différents types de souches cellulaires hépatocytaires rendent des résultats contradictoires, rendant l'expérimentation sur l'animal indispensable pour conclure. Une expérience préliminaire a été menée par cette équipe chez le rat Sprague-dawley, mais nécessite d'être reproduite et confirmée à plus grande échelle. Notre animalerie est actuellement la seule à posséder en élevage la souche de rat Long Evans Cinnamon, mutant spontané du gène ATP7B, qui servira de contrôle ultime pour confirmer les voies d'action de la protéine ATP7B dans le foie.

Nous avons donc entamé une collaboration avec l'équipe espagnole pour finaliser ce projet de recherche. L'expérimentation consistera à recueillir les selles et les urines de rats LEC et Sprague-Dawley durant 5 jours pour y quantifier la présence du cuivre, puis à leur injecter une solution de cuivre ou de placebo (sérum physiologique), avant de réaliser à nouveau les mêmes mesures. Au 5ème jour, les animaux seront sacrifiés, et leur foie et leur intestin seront prélevés pour analyses du contenu en cuivre, et de la localisation de la protéine ATP7B en microscopie électronique.

Durant toute l'expérimentation, qui se déroulera en cages métaboliques, les animaux y seront hébergés en binômes pour diminuer leur stress, et le nombre d'animal par groupe a été calculé au plus juste afin d'éviter un emploi injustifié d'animaux. Au total, 18 animaux (6 rats LEC et 12 rats Sprague-Dawley) seront utilisés. L'injection de cuivre se fera sous anesthésie générale et après injection sous-cutanée d'une dose adaptée de buprénorphine. Une surveillance bi-quotidienne des

animaux permettra de rechercher des signes de souffrance, et une antalgie adaptée sera mise en place au besoin.

19411 La néphronophtise est une maladie rénale héréditaire rare affectant l'enfant et l'adolescent. Cette affection est responsable de 10% des cas d'insuffisance rénale terminale chez l'enfant et nécessite le recours à la dialyse ou à la transplantation rénale, deux procédures lourdes et coûteuses. Actuellement, aucun traitement ne permet d'éviter aux patients d'évoluer vers l'insuffisance rénale terminale.

La maladie se révèle par une augmentation du volume des urines et une soif excessive. En parallèle, le rein subit de nombreuses modifications qui aboutissent au développement de petits kystes, associés à une inflammation du rein aboutissant à sa transformation en un tissu fibreux non fonctionnel. Malgré les progrès considérables faits dans la compréhension de la génétique de la maladie (plus de 25 gènes ont été identifiés), les mécanismes moléculaires et cellulaires entraînant la destruction du rein sont encore mal compris. L'un des facteurs importants expliquant cet échec est le peu de modèles animaux reproduisant la pathologie rénale observée chez les patients.

L'étude proposée ici a pour but de générer et caractériser un nouveau modèle murin de néphronophtise afin d'élucider les mécanismes moléculaires et cellulaires à l'origine de la destruction du tissu rénal. Le développement de la néphronophtise met en jeu des phénomènes complexes faisant intervenir différents types cellulaires ainsi que des modifications structurales du tissu rénal. A l'heure actuelle, il n'existe pas de modèle *in vitro* pertinent permettant de reproduire ces interactions cellulaires complexes à l'échelle de l'organisme entier. A cette fin, nous générerons une lignée de souris génétiquement modifiées permettant d'invalider un des gènes mutés dans la néphronophtise spécifiquement dans le rein. Cette invalidation sera obtenue par gavage sur des souris adultes ou des souriceaux afin d'évaluer l'impact d'une délétion tardive ou précoce de ce gène. Le phénotype rénal sera observé à différents temps après le gavage (1, 2, 5 et 11 mois).

Ces expériences utiliseront un maximum de 320 souris sur 5 ans.

La souris a été choisie car elle présente l'avantage de facilité d'élevage et de reproduction et elle permet l'étude d'animaux génétiquement modifiés particulièrement informatifs pour la compréhension des mécanismes physiopathologiques et que de nombreux outils d'analyses ont été développés et bien caractérisés dans cette espèce animale.

Divers examens d'immunomarquages et de biologie moléculaire seront réalisés sur les reins après leur prélèvement à différents temps. La fonction principale du rein étant la production d'urine, les urines de ces animaux seront récoltées. Les animaux seront sacrifiés à l'issue des protocoles et les organes seront prélevés en post mortem pour les analyses histologiques et moléculaires.

La règle des « 3R » sera appliquée au cours de cette étude.

Pour remplacer : La maladie rénale chronique met en jeu des phénomènes complexes faisant intervenir différents types cellulaires ainsi que des modifications structurales du tissu rénal. A l'heure actuelle, il n'existe pas de modèle *in vitro* pertinent permettant de reproduire ces interactions cellulaires complexes à l'échelle de l'organisme entier. Compte tenu de l'absence de modèle cellulaire permettant l'étude d'un rein *in vitro*, il n'est pas possible de substituer des approches *in vitro* aux modèles murins impliqués dans ce projet.

Pour réduire : Nous avons estimé la taille des échantillons permettant une analyse statistique efficace.

Pour raffiner : Afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux souris, les conditions d'élevage et d'expérimentation ont été raffinées :

- Les procédures seront raffinées par l'emploi de points limites précoces spécifiques entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.
- Les souris seront hébergées par 5 en cage ventilée et leur environnement sera enrichi par du coton, maisonnettes et tunnels ainsi que des bâtonnets de bois à ronger.

Pour conclure, les résultats obtenus devraient apporter une meilleure compréhension de la physiopathologie de la néphronophtise.

19412 La malnutrition chronique chez l'enfant est un problème majeur de santé publique dans les pays en développement, touchant aujourd'hui plus de 150 millions d'enfants dans le monde. Les conséquences à long terme sont particulièrement délétères, notamment marquées par un retard de croissance ainsi que des déficits neurocognitifs qui persistent à l'âge adulte. De nombreuses études suggèrent que les macronutriments critiques dans cette période de la vie sont les protéines. Une alimentation appauvrie en protéines induit notamment un retard de croissance chez le rongeur. Des études récentes suggèrent un lien fort entre composition du microbiote intestinal et régime nutritionnel. En particulier, une intervention probiotique chez le rongeur dans un contexte de malnutrition permet de compenser partiellement le retard de croissance chez le juvénile. Un probiotique se définit comme un micro-organisme vivant qui, lorsqu'il est ingéré en quantité suffisante, exerce des effets positifs sur la santé, au-delà des effets nutritionnels traditionnels.

L'objectif de cette étude est d'étudier l'effet d'un probiotique sur le développement du système nerveux entérique, c'est à dire la partie du système nerveux qui contrôle le système digestif, dans un contexte de malnutrition protéique. Afin de comprendre l'effet de la malnutrition sur le système nerveux entérique, les souriceaux seront alimentés avec un aliment appauvri en protéines ou un aliment contrôle et nourris à la pipette avec une solution placebo ou une solution probiotique, depuis le sevrage et pendant 5 semaines. Cette étude permettra donc l'établissement d'un modèle préclinique ouvrant la porte à de possibles visés thérapeutiques chez l'Homme. Le projet a été conçu pour respecter la règle des 3R: raffiner, réduire, remplacer. En effet, le nombre d'animaux et de groupes a été réduit au maximum sans toutefois mettre en péril une interprétation statistique des résultats. Cette étude implique une réponse intégrée au niveau de l'organisme (interactions nutrition/microbiote), ce qui justifie une étude chez l'animal. Des points limites bien définis et suffisamment précoces et prédictifs pour prévenir tout stress et toute douleur de l'animal ont été mis en place. Différentes mesures de raffinement sont prises pour améliorer le bien être de l'animal : les mesures de taille sont réalisées sous anesthésie gazeuse légère pour limiter le stress de l'animal, le probiotique est délivré à la pipette et non par gavage, la nourriture appauvrie en protéine est caloriquement équivalente à la nourriture contrôle de manière à éviter toute sensation de faim chez l'animal. Les conditions d'hébergement, les soins et les procédures seront réalisées par du personnel qualifié.

Cette étude se fera sur 80 souris.

19413 Contexte : Le cancer est la 6ème cause de mortalité dans le monde et nécessite une prise en charge clinique complexe. Outre le développement tumoral à l'origine de la maladie, le cancer est associé à une dysfonction musculaire, une fatigue chronique et une diminution importante de la qualité de vie des patients. Les inhibiteurs des points de contrôle immunitaire (ICIs) ou immunothérapie, figurent parmi les découvertes récentes les plus importantes en oncologie. En effet, il a récemment montré dans plusieurs modèles murins de cancers que la combinaison ICIs + chimiothérapie réduisait fortement le développement tumoral. De plus, chez les patients, ces traitements combinés ont montré une meilleure efficacité comparée à des traitements classiques sur la survie. En cancérologie, l'exercice physique est aujourd'hui reconnu pour ses bénéfices sur la qualité de vie et sur la diminution des effets secondaires des traitements conduisant les professionnels de santé à l'intégrer dans la prise en charge clinique des patients. Du point de vue physiologique, l'exercice physique aigu est associé à une augmentation de la perfusion sanguine dans la tumeur et une activation des cellules immunitaires antitumorales. Par conséquent, il est possible de faire l'hypothèse que la réalisation d'un exercice physique aigu pré-injection de l'immuno-chimiothérapie pourrait améliorer l'infiltration des traitements et des cellules immunitaires dans la tumeur et ainsi diminuer son volume. D'autre part, l'exercice physique permet également de limiter les altérations musculaires liées au cancer et à la chimiothérapie, sauvegardant ainsi sa fonction et, par conséquent, l'aptitude physique des patients.

Objectifs : Ainsi, l'objectif de cette étude est d'examiner l'effet de l'exercice physique réalisé juste avant l'administration des traitements sur le développement tumoral et le muscle squelettique dans le cancer colorectal.

Méthodologie : Aujourd'hui pour des questions de réduction de technique invasive chez les patients, de moins en moins de biopsie de la tumeur sont réalisées ainsi il est nécessaire d'utiliser un modèle murin à visée scientifique pour comprendre l'interaction biologique et moléculaire entre un exercice physique réalisé juste avec l'injection des traitements et le microenvironnement tumoral. Par conséquent, un modèle de murin (C57BL/6) de greffe de cellules tumorales de cancer colorectal MC 38 (modèle de souris C57BL/6 injectées en cellules MC38) sera utilisé. Pour cela, une étude sur 80 souris dont l'intervention durera environ 30 jours sera menée. Les souris seront réparties dans 4 groupes recevant soit le traitement combiné, soit faisant de l'exercice physique, soit une combinaison des deux. Seules les souris des groupes exercice bénéficieront du protocole de course du tapis pendant 30 jours, 5 fois par semaine d'une durée de 50min par session à 60% de la vitesse maximale aérobie (VMA). L'intensité des sessions sera individualisée en fonction des résultats du test de VMA pour chaque souris.

Perspectives : Les modifications physiologiques associées à l'exercice pourrait interagir avec les traitements anti-cancéreux néanmoins la nature de ces interactions, positives ou négatives, est encore peu connue. Ainsi dans ce contexte où la prise en charge clinique associant thérapies innovantes par immuno-chimiothérapie et exercice physique, il semble nécessaire de comprendre les mécanismes d'interactions. Pour répondre à ces question l'acquisition de tissus biologiques tumoral est nécessaire et donc l'utilisation du modèle animal à des fins scientifiques est indispensable.

Au cours de ce projet, 80 souris divisées en 4 groupes de 20 souris seront utilisées. Les groupes seront divisés de la façon suivante : un groupe témoin, un groupe recevant le traitement combiné immuno-chimiothérapie, un groupe faisant de l'exercice physique et enfin un groupe recevant les deux interventions.

Ce protocole préclinique a été pensé en suivant la règle des 3R « Remplacer, Réduire, Raffiner ». Le but est de permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal. Le nombre d'animaux utilisés est réduit au minimum après analyses statistiques des expériences passées de nos équipes et des données de la littérature. Le protocole d'exercice physique et la mesure du développement tumoral sont non invasifs et permettent ainsi un suivi longitudinal des animaux, permettant de réduire de manière drastique le nombre d'animaux utilisés. L'étude a été raffinée en développant un suivi rigoureux des souris tout au long du protocole. Des anesthésiques et des analgésiques sont utilisés pendant et au décours des expérimentations afin de réduire au maximum le stress et la souffrance des animaux. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie. Des mesures sont prises pour améliorer les conditions d'élevage afin d'enrichir l'environnement des souris. Aussi, le suivi de critères précis permet de mettre à mort rapidement les animaux présentant un phénotype dommageable. De plus, le personnel impliqué dans ce projet dispose des qualifications requises sur le plan technique et formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale. Une veille scientifique est assurée en continue afin de ne pas reproduire des expérimentations déjà rapporté dans la littérature.

19414 L'ambition scientifique du projet est, d'une part d'optimiser l'aspect nutritionnel afin d'améliorer la croissance et de maintenir la qualité du produit final, d'autre part de maintenir les défenses et le bien-être des animaux à un niveau satisfaisant pour assurer une bonne croissance.

Le développement d'additifs alimentaires comme les enzymes a pour objectif l'amélioration de la nutrition des porcelets. Les enzyme phytasiques ont pour but d'améliorer la valeur nutritive des ingrédients utilisés dans les aliments pour animaux d'élevage en termes d'apport phosphoré. Le phosphore (P) est déterminant pour la croissance des animaux monogastriques et se trouve au cœur des enjeux de productivité. Dans les matières premières d'origine végétale utilisées en alimentation animale, le P est essentiellement présent sous forme de phosphore phytique (phytates). Or, cette forme de P est mal absorbée par les porcelets et la majeure partie est éliminée via les excréta sans être utilisée. La démarche la plus efficace pour réduire l'excrétion de P consiste, d'une part à améliorer la digestibilité du P phytique de la ration alimentaire par l'ajout de phytase d'origine microbienne pour réduire les apports de P minéral dans la ration alimentaire, et d'autre

part à mieux ajuster les besoins en P des porcelets à différents âges et stades physiologiques afin de maximiser les performances et/ou la minéralisation osseuse. Une meilleure utilisation des aliments contribuera ainsi à réduire l'impact environnemental de la production animale, en assurant une meilleure rétention des nutriments réduisant le besoin de supplémentation en P. Le développement d'additifs alimentaires passe nécessairement par une étape d'enregistrement des dits additifs auprès des autorités compétentes. A cet effet, certains types d'études doivent donc être menées, selon des modalités propres à chaque organisme d'autorisation, par exemple l'EFSA en Europe ou CVM/FDA aux Etats-Unis d'Amérique. Malgré des différences notoires dans les attentes des différents organes de régulation, il est possible de séparer les essais en deux grandes catégories, des essais d'efficacité visant à démontrer l'utilité d'un produit d'une part, et les essais de tolérance visant à démontrer son innocuité à la dose recommandée ou à des surdoses d'autre part.

Le présent projet a pour objectifs principaux :

- de contribuer à la découverte de nouvelles phytases comme additif alimentaire.
- de réaliser des études d'efficacité et de tolérance pour l'enregistrement de ces additifs.
- de rechercher de nouvelles applications pour les additifs déjà enregistrés.
- de comparer l'efficacité des additifs développés par notre établissement avec ceux du marché.
- d'identifier les modes d'action et effets annexes des phytases.

Les études d'efficacité sont réalisées en utilisant des molécules ou mélanges de molécules le plus souvent précédemment identifiées lors d'un criblage in vitro. Il convient de noter que le criblage in vitro mentionnés ci-dessus peut avoir été réalisé en interne, au sein du centre de recherche, mais peut également avoir eu lieu en partenariat avec des universités ou des instituts de recherche tiers, publiques ou privés.

Les études in vivo vont mettre en œuvre diverses approches scientifiques, et faire appel à des procédures entraînant notamment une carence nutritive réalisée en alimentant les animaux avec un régime déficient en phosphore et autres minéraux. Ces études vont permettre d'évaluer les effets des additifs sur la croissance, la digestibilité des nutriments et des minéraux, le bilan nutritionnel. Ces études peuvent être réalisées en amont de celles visant à démontrer l'innocuité du produit.

L'évaluation de différents candidats ayant un potentiel de mise sur le marché se fera au niveau du laboratoire et par des études en expérimentation animale au sein du centre de recherche en nutrition animale, selon des protocoles établis et suivant des procédures expérimentales définies en fonction de l'objectif à atteindre au sein du projet.

La comparaison avec d'autres additifs déjà présents sur le marché ou en développement est réalisée lors de tests d'efficacité similaires à ceux utilisés dans le cadre de la découverte de nouveaux additifs.

Le projet s'étend sur 5 années dans le but d'évaluer, de tester et de développer différentes conditions d'optimisation de l'efficacité de la phytase destinée aux porcs et prévoit l'utilisation de 4500 porcs. Lors du processus de développement et d'enregistrement de cet additif, il est indispensable de tester son efficacité sur l'animal auquel il est destiné, cela afin d'en démontrer l'efficacité et l'innocuité auprès des autorités habilitées à délivrer une autorisation de mise sur le marché. Le projet est conduit dans le respect de la règle des 3R avec comme mesure de raffinement le suivi quotidien de l'état de santé des animaux avec l'observation de points limites adaptés et attendus, des conditions d'hébergement des animaux définies de telle sorte que l'enrichissement des cages (balles, ballons, croix, jouets en caoutchouc, chaîne, tuyau ...), la densité des animaux par cage, ou encore les paramètres environnementaux (température et hygrométrie...) procurent le maximum de confort aux animaux, et restent supérieurs ou égaux à la législation en vigueur (Arrêté du 01/02/2013). Au suivi quotidien de l'état de santé des animaux sera pris en compte l'observation de points limites adaptés et attendus, notamment d'éventuels signes de perte de poids, de mobilité, et de troubles locomoteurs. Aucun animal ne reste isolé en cage individuelle sans contact olfactif, auditif et visuel avec ses congénères, ceci afin de réduire au minimum l'angoisse et le stress des animaux.

19415 Le sepsis est un syndrome inflammatoire systémique lié à l'activation incontrôlée de l'inflammation et de la coagulation. Le sepsis peut être provoqué par une infection ou un traumatisme. C'est la première cause de mortalité dans les unités de soins intensifs (3 cas pour 1000 personnes dans les pays développés).

Malgré une antibiothérapie adéquate et l'utilisation de traitements lourds, le pronostic vital des patients atteints de ce syndrome n'a été que marginalement amélioré au cours de ces dernières années. Rien qu'aux Etats-Unis, le sepsis cause la mort d'un demi-million de personnes. La complexité de la pathologie explique l'échec de plus de 30 essais cliniques de phase III. Les anticorps (Ac) jouent un rôle important dans la défense contre les agents pathogènes. Une proportion d'Ac présents chez les individus sains, a la capacité de se lier à différentes petites molécules pro-inflammatoire et pro-oxydantes. La capacité de ces Ac d'interagir avec ce type de molécules pourrait jouer un rôle régulateur dans l'homéostasie de l'organisme.

Des travaux précédents ont montré que la liaison de certaines molécules pro-inflammatoires ou pro-oxydantes aux Ac confère à ces derniers de nouvelles spécificités de liaisons aux antigènes. Cette liaison leur permet d'accroître leur potentiel de reconnaissance antigénique et semble leur conférer un fort potentiel anti-inflammatoire. Les anticorps sont en effet bien connus pour leur capacité à réguler la réponse immunitaire. La signification biologique des Ac ayant la capacité de lier ces petites molécules n'est pas bien élucidée.

Fait important, la libération par la cellule de certaines petites molécules pro-inflammatoires se produit uniquement à la suite d'états pathologiques accompagnés de lésion cellulaire / tissulaire étendue et d'une inflammation sévère comme dans le cas du sepsis.

Nous émettons l'hypothèse que l'administration d'anticorps capables de lier ces molécules pourrait réduire la sévérité du sepsis et améliorer la survie. Nos données préliminaires in vitro, sur des cellules immunitaires

humaines, montrent que certains Ac ont un effet anti-inflammatoire et peuvent neutraliser des petites molécules, médiatrices de l'inflammation.

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

Pour ce projet de 5 ans, nous aurons besoin de 320 souris C57Bl/6. Nous avons strictement suivi le principe des 3 R durant la conception de ce protocole.

Remplacement: Un criblage in vitro sera réalisé pour sélectionner les Ac monoclonaux les plus efficaces et qui seront ensuite utilisés pour les expériences in vivo.

Réduction: Ceci correspond au nombre minimal d'animaux qui nous permettra d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. Les procédures expérimentales sont optimisées pour d'abord évaluer l'effet thérapeutique des Ac candidats afin de réduire le nombre de souris pour les expériences comparatives de dose.

Raffinement: L'ensemble des procédures a été mis au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification et de tunnels en cartons). Une surveillance régulière des animaux ainsi qu'un traitement antalgique régulier sera mis en place afin de réduire les souffrances. En cas de souffrance importante constatée malgré l'utilisation d'antalgique, les souris seront euthanasiées.

19416 L'ascite de souris sarcome TG 180 est utilisée dans la production de 12 références de tests de diagnostic in vitro de pathologies humaines à forte mortalité ou graves conséquences parmi lesquelles nous retrouvons la toxoplasmose, les troubles thyroïdiens, différents cancers, l'anémie

(dosage de la Ferritine, marqueur par exemple associé au suivi des complications COVID-19), les troubles de l'hémostase, des bilans hormonaux, des marqueurs d'allergies respiratoires...

Tous les réactifs concernés sont marqués CE conformes à la directive européenne.

Un faux résultat (faux positif, faux négatif ou erreur de dosage) rendu par un test de diagnostic dans un laboratoire clinique peut avoir un impact grave sur la santé, le suivi médical et la prise en charge des patients testés avec ces méthodes.

Ces kits de diagnostics sont basés sur la capacité d'un anticorps à reconnaître et à se lier spécifiquement à un antigène. Dans le cas des tests ici évoqués, l'anticorps spécifique est d'origine murine.

Certaines personnes développent des anticorps anti-souris (HAMA), par exemple dans le cadre d'un traitement utilisant des anticorps monoclonaux. Ces HAMA peuvent alors perturber les résultats des dosages en interagissant avec l'anticorps d'origine souris présent dans le test. Cette interférence viendrait fausser le résultat du diagnostic.

L'ascite TG 180, lui-même d'origine souris, contient une concentration élevée d'anticorps spécifiques de l'espèce souris. Ajouté dans le test, il permet de neutraliser les HAMA, permettant d'assurer les performances essentielles des tests, à savoir leur spécificité, en réduisant le taux de faux positifs et le risque de surdosage.

Des essais de modification du test par une méthode *in vitro* afin de réduire le nombre d'animaux utilisés ont été menés pendant 2 ans. Ils ont donné des résultats non satisfaisants car cette méthode de production alternative n'apporte pas les mêmes performances en terme de sensibilité/spécificité. La capacité de neutralisation des HAMA est liée au caractère natif et à la diversité des protéines potentiellement neutralisantes obtenues par la production sur souris.

Les souris ne reçoivent pas au préalable d'injection de primer type pristane, mais uniquement 1 inoculation intrapéritonéale d'ascite TG 180 provenant d'autres souris. Cette méthode ne nécessite pas de recours à l'analgésie. Après un temps d'incubation, l'ascite des souris est récoltée en un prélèvement unique. Cette méthode entraîne la production d'un volume moyen de 10mL d'ascite par souris de 30g, provoquant un ballonnement de l'animal similaire à une gestation. En cas d'apparition de signe de souffrance lors du protocole, des points limites prédictifs adaptés sont définis et appliqués afin de limiter toute souffrance animale.

La procédure expérimentale est classée en modéré car aucun signe clinique fréquent de douleur apparente n'est relevé sur les animaux, mais plutôt un inconfort lié au gonflement de l'abdomen. Pendant le protocole les souris continuent à se déplacer, s'alimenter, s'abreuver et à faire leur toilette normalement. Les animaux entrent en production pour 14 jours après une période d'acclimatation de 14 jours et sont hébergés sur litière sciure/lanières de carton assurant l'enrichissement du milieu. Un tunnel PVC est introduit dans la cage permettant aux souris de se cacher.

La souris est le modèle le plus adapté pour cette production, car la spécificité d'espèce est requise pour neutraliser les interférences anti souris présentes dans les échantillons humains. 115 000 souris seront nécessaires sur les 5 années de durée du projet. Sur les 5 dernières années écoulées, le travail de raffinement du protocole a permis de réduire de 15 % ce nombre d'animaux nécessaire pour produire et mettre à disposition 125 millions de tests de diagnostic à travers le monde, au service de la santé publique.

19417 L'arrêt de la castration chirurgicale des porcelets mâles permet d'éviter une intervention douloureuse mais peut poser des problèmes de qualité de viande (présence d'odeurs indésirables dites « odeurs sexuelles » à la cuisson, viande trop maigre, gras mous inadaptés pour la transformation en charcuteries) ou de comportements sources de mal-être lors de la phase d'engraissement (montes excessives, agressivité). Cette expérience vise à explorer l'influence de la réduction du poids à l'abattage pour réduire le risque d'odeurs sexuelles et de comportements délétères, ainsi que la voie génétique pour améliorer les autres propriétés de qualité de la viande (technologique, texture...). Pour cela, nous comparerons deux types génétiques et nous effectuerons des mesures sur les animaux vivants aux alentours de 80, 100 et 120 kg de poids vif

pour simuler les effets d'un abattage plus ou moins précoce. Les animaux seront ensuite abattus aux alentours de 120 kg de poids vif (stade usuel d'abattage) dans un abattoir commercial, et des mesures de qualité de la carcasse et de la viande seront réalisées.

L'essai sera conduit sur un total de 120 porcs mâles non castrés de type génétique Large White (LW), croisés Piétrain ou LW croisés Duroc dans une station expérimentale porcine certifiée biologique. Les porcs seront conduits en deux répétitions identiques décalées de 6 semaines. Dans chaque répétition, 30 porcs de chaque type génétique seront élevés dans une même loge. A trois stades au cours de la phase d'engraissement (vers 80, 100 et 120 kg de poids vif), nous réaliserons (1) des prises de sang pour évaluer le risque d'odeurs sexuelles grâce à la mesure de la concentration de molécules présentes dans le plasma, (2) des mesures d'épaisseur de gras dorsal et de muscle (longe) par ultra-sons pour évaluer la composition de la carcasse et (3) des observations comportementales et lésionnelles pour évaluer le bien-être des animaux. A ces mesures s'ajouteront des pesées individuelles régulières au cours de la phase d'élevage et des enregistrements de la consommation d'aliment afin d'estimer les effets de la réduction du poids à l'abattage sur les performances zootechniques. Des mesures complémentaires de qualité de viande seront réalisées après l'abattage des animaux.

Le respect de la règle des 3 Rs a été pris en compte :

- Remplacer : le projet concernant les performances zootechniques, la qualité de la viande et le bien-être des porcs mâles non castrés, il n'existe pas de méthode substitutive,
- Réduire : le nombre de porcs est limité à 30 par type génétique et par répétition avec deux répétitions successives (120 porcs au total) afin d'obtenir une puissance statistique satisfaisante et vérifier que les effets obtenus sont répétables d'une répétition à l'autre. Afin de prédire les effets d'une réduction du poids à l'abattage sur le risque d'odeurs sexuelles, nous réaliserons des prélèvements de sang à trois stades de la croissance : au stade usuel d'abattage (vers 120 kg de poids vif), à un stade considéré comme « plancher » pour l'abattage en termes de poids des pièces issues de la carcasse (vers 80 kg de poids vif) et à un stade intermédiaire (vers 100 kg de poids vif),
- Raffiner : la douleur liée aux prises de sang est réduite en limitant la durée de la contention à 2 minutes au maximum (en pratique la durée moyenne est de 30 secondes) grâce à une manipulation appropriée des animaux avant et pendant la prise de sang, réalisée dans un local confortable et suffisamment grand pour faciliter les manipulations. Par ailleurs, la taille des aiguilles est adaptée au gabarit des animaux. Après les prises de sang, les animaux retournent très rapidement dans leur loge habituelle.

19418 Ce projet se résume à l'administration d'un composé ou de plusieurs composés non radiomarqués ou radiomarqués par différentes routes d'administration à des primates non-humains afin de décrire le comportement et le devenir du produit dans un organisme vivant. Classiquement il s'agit de modéliser son absorption, sa distribution dans l'organisme, son métabolisme c'est à dire comment l'organisme procède à sa transformation et enfin à son élimination. La réalisation de ce projet fait partie des dossiers présentés aux autorités réglementaires.

L'évaluation de l'absorption, de la distribution, du métabolisme et de l'élimination d'un produit dans un organisme vivant ne peut pas être réalisée in vitro. Il n'y a pas de méthodes alternatives. Seule l'observation sur un organisme vivant dans son ensemble permet d'évaluer les différentes phases d'absorption, de métabolisme, de distribution et d'élimination du composé, de définir les relations et/ou interactions entre ces différentes phases et permet aussi de déterminer les niveaux du composé ou des composés administrés, de leurs métabolites et de marqueurs pharmacologiques au cours du temps dans l'organisme.

Le primate est choisi en fonction des résultats des essais préliminaires in vitro et in vivo (métabolisme) et de sa proximité génétique avec l'homme (cibles thérapeutiques génétiquement similaires). Le singe est pour certains composés l'espèce permettant la meilleure prédiction pour simuler les paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques avant de réaliser la première

administration chez l'homme. Le singe est couramment utilisé pour ce type de procédure et est accepté par les autorités réglementaires.

Le nombre d'animaux est optimisé en utilisant si possible un seul sexe, le minimum d'animaux pour obtenir des résultats statistiquement fiables et pour répondre aux objectifs du projet. Les doses utilisées sont en général faibles car aucun effet toxique indésirable n'est recherché ce qui permet une réutilisation des animaux. Dans tous les cas les études de ce projet respectent les règles des 3R. Le nombre d'animaux utilisés dans le cadre de ce projet peut être estimé à un total de 280 sur 3 ans.

Par défaut, l'hébergement des animaux est réalisé en groupe dans des cages conformes à la Directive 2010/63 avec des enrichissements. L'état de santé des animaux est contrôlé tous les jours et évalué par rapport à des points limites définis de façon à éviter un inconfort/souffrance prolongé. Si nécessaire, des analgésiques/anesthésiques peuvent être utilisés pour éviter l'inconfort et minimiser la douleur éventuelle, et un vétérinaire peut intervenir, mais si la souffrance d'un animal est jugée trop importante et si aucun soin ne peut lui être apporté, il sera euthanasié selon une procédure éthiquement acceptée.

19419 Objectif du projet: Évaluer l'efficacité de molécules en développement après administration par voie systémique (voie intraveineuse), dans des modèles de choc hémorragique associés ou non à un polytraumatisme induit chez le rat ou le mini-porc.

Avantages: Ce projet a pour but de démontrer l'efficacité de molécules en développement sur la régulation et la stabilisation de la pression artérielle après un choc hémorragique, associé ou non à un polytraumatisme, et permettant de stopper les effets induits par ces états cliniques d'urgence et entraînant la mort de l'animal. Ces molécules permettraient ainsi de prolonger la durée de vie d'un individu qui serait dans un état critique suite à un accident/trauma, afin qu'il ait le temps d'être pris en charge par les services médicaux. Les données obtenues contribueront de ce fait à la sélection de molécules en développement, au choix de doses et de véhicules utilisés par la suite chez l'homme dans ces états physiopathologiques.

Domages escomptés: Le modèle de choc hémorragique a pour dommage d'entraîner une baisse conséquente mais contrôlée du volume sanguin. Ce choc sera réalisé suite à des actes chirurgicaux. Le polytraumatisme entraînera de plus des écrasements d'organes et fracture d'os. Pour pallier aux douleurs, souffrances et angoisses induites dans ces modèles, les animaux seront anesthésiés et analgésiés. Un protocole médicamenteux adapté et validé par un vétérinaire sera pour cela mis en place avant chaque expérimentation.

La pression artérielle sera monitorée en continue afin de contrôler l'hémorragie induite. La température corporelle, maintenue par tapis chauffant, et le rythme cardiaque seront également contrôlés permettant de suivre l'état général et la souffrance de l'animal.

Le mini-porc sera de plus intubé à l'aide d'une sonde adaptée au poids de l'animal et ventilé. Sa fréquence respiratoire et sa saturation en oxygène dans le sang seront également suivies.

Le bien-être des animaux sera attentivement suivi durant toute la durée de la phase expérimentale (induction du modèle et phase de traitement). Des points limites adaptés, préalablement définis, permettront d'assurer un suivi de l'état général des animaux et de mettre en place des interventions précoces et adaptées en cas de souffrance animale.

Compte tenu du choc volumétrique et des blessures engendrées, les procédures se feront sans réveil des animaux afin d'éviter toute souffrance et douleurs post-expérimentation.

Méthodes alternatives (principe de remplacement): Il n'existe aucune méthode in vitro validée scientifiquement reconnu qui offrirait une alternative à l'expérimentation animale pour répondre aux questions de pharmacologie adressées dans ce projet.

Nombre et type d'animaux; conditions d'hébergement et de soins (principe de réduction et principe de raffinement):

Choix des espèces: Le rat sera l'espèce utilisée en première intention en raison de l'abondance de littérature sur ce modèle et de l'existence d'outils spécifiques permettant l'analyse des biomarqueurs modulés dans ces modèles.

Le mini-porc est choisi comme espèce non rongeur permettant d'étudier et d'évaluer l'efficacité des molécules testées chez le mammifère afin de prédire leur efficacité clinique. Le mini-porc est une espèce largement utilisée en étude de pharmacologie du fait de ses nombreuses similitudes physiologiques et morphologiques avec l'Homme.

Nombre d'animaux: Selon les méthodes d'analyses utilisées (biochimie, biologie moléculaire, réponse clinique, etc...) et compte-tenu des variations inter-individuelles anticipées, le nombre d'animaux utilisés dans ce projet a été réduit à son minimum sans compromettre les objectifs du projet.

Ce projet comporte 2 procédures expérimentales. Un maximum de 12 rats ou 6 mini-porcs (mâle et femelle) par groupe expérimental sera utilisé pour permettre une analyse statistique robuste des résultats générés.

Il est estimé à 40 le nombre de conditions (molécules, doses, véhicules ou groupe contrôle non traité) testées par espèce et par an soit un total de 2400 rats et 1200 mini-porcs sur une période de 5 ans.

Sur cette même période des animaux surnuméraires pourront être nécessaires pour anticiper le remplacement d'un animal en mauvaise état de santé ou problème survenant lors de la réalisation de la chirurgie ou durant l'étude. De plus afin de maintenir les compétences techniques du personnel impliqué et notamment pour le geste complexe de chirurgie, des animaux de training seront nécessaires. Un maximum de 10% de rats et 5% de mini-porcs surnuméraires sur 5 ans sont donc comptabilisés pour ce projet.

Au total, toutes espèces confondues, un maximum de 3900 animaux pourront être utilisés pour la réalisation de ce projet sur 5 ans.

Conditions d'hébergement et de soins:

Les conditions d'hébergement et de soins utilisés ont été choisies et conçues de manière à réduire au maximum toute douleur, souffrance, angoisse ou dommages durables que pourraient ressentir les animaux, en conformité avec les législations françaises et européennes.

Les animaux seront hébergés de façon collective pour les rats et de façon individuelle pour les mini-porc. En cas d'hostilité, mal être ou blessure entre rats, les individus concernés pourront être isolés en cage individuelle.

Dans tous les cas, les boxes et cages d'hébergement permettent de garder un contact visuel, auditif et olfactif avec les autres congénères. Ces hébergements sont adaptés au poids de l'animal (ex : minimum de 2m² pour les mini-porcs) et comporte de la litière.

L'hébergement est enrichi par la mise en œuvre de techniques d'enrichissement adaptées aux besoins spécifiques et individuels de chaque espèce animale leur permettant de reproduire au mieux leur comportement naturel (ex : tunnel, fibres compressés, jouet, musique...). La stratégie d'enrichissement est régulièrement revue et mise à jour.

Le suivi des animaux sera assuré quotidiennement par du personnel compétent et des points limites spécifiques ont été établis afin de suivre durant la phase d'hébergement toute dégradation de l'état de santé général des animaux et durant la phase expérimentale (réalisation des modèles de choc hémorragique et polytraumatisme) toute douleur ou souffrance de l'animal malgré le protocole d'anesthésie/analgésie mis en place.

19420 Le SARS-CoV-2 (acronyme anglais de severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) est le virus responsable de la Covid-19. Ce coronavirus hautement pathogène a été découvert en décembre 2019 dans la ville de Wuhan (province de Hubei, en Chine). Le SARS-CoV-2 est principalement transmis par les microgouttelettes et aérosols. Elle a comme cible principale le système respiratoire supérieur (nez, trachée) et inférieur (bronches, poumons). De nombreuses personnes porteuses du virus ne présentent pas de symptômes, ou présentent des symptômes

légers (petite toux, fièvre) sans détresse respiratoire. Certaines cependant développent des symptômes graves ou sévères qui impliquent une prise en charge hospitalière. Une pathologie de détresse respiratoire se met alors en place due, notamment, à la production de cytokines inflammatoires et la migration de cellules immunitaires en quantité massive dans les poumons. Cette réaction exagérée va conduire à la destruction du tissu pulmonaire et, dans certains cas, à la mort du patient.

À l'heure actuelle, le vaccin contre le Covid-19 représente la meilleure chance de contrôler l'épidémie. Le principe de la vaccination est d'entraîner et préparer le système immunitaire à reconnaître et à combattre le coronavirus SARS-CoV-2, notamment en induisant la production d'une immunité muqueuse humorale (anticorps) ou cellulaire (lymphocyte T). Différentes approches technologiques ont été explorées. Tous les vaccins utilisés chez l'homme à l'heure actuelle reposent sur une ou deux injections par voie intramusculaire. Il a été démontré que cette voie n'entraîne le développement d'une immunité protectrice à long terme au niveau des muqueuses que de faible intensité et à court terme.

La mise au point d'un vaccin approprié capable de protéger durablement contre le SARS-CoV-2 s'avère être un défi technologique qui nécessite de faire appel aux modèles animaux.

Notre hypothèse est qu'une vaccination anti-SARS-CoV2 reposant sur une primo-vaccination par voie muqueuse et un rappel par voie musculaire est supérieur en terme d'amplitude mais aussi de durée de la réponse immunitaire comparativement à une vaccination qui fait appel à deux injections par voie musculaire.

L'objectif de ce projet sera donc de comparer l'efficacité d'une vaccination par voie intranasale (administration dans les narines) ou sublinguale (administration sous la langue) suivie d'un rappel par voie intramusculaire à celle consistant de deux injections intramusculaires.

Pour cela nous comparerons deux vaccins actuellement utilisés chez l'homme (ARN messagers et Spoutnik V) et un en cours de développement pour une forme d'administration intranasale (Altimmune) :

- la vaccination par ARN messagers (intranasale ou sublinguale + intramusculaire vs 2 injections intramusculaires) ;
- la vaccination par Adenovirus Spoutnik V (intranasale ou sublinguale + intramusculaire vs 2 injections intramusculaires) ;
- la vaccination par Adenovirus Altimmune V (intranasale ou sublinguale+ intramusculaire vs 2 injections intramusculaires) ;

La comparaison des taux d'anticorps ainsi que des lymphocytes T anti-SARS-CoV-2 induits dans les muqueuses (pulmonaires, digestives) permettra de déterminer quelle est la stratégie la plus performante pour l'induction d'une immunité muqueuse. Par ailleurs, la durée de cette réponse sera également évaluée après sacrifice à différents temps post-vaccination.

Le nombre total de souris utilisés pour ce projet est de 486. Il n'est pas attendu de souffrance particulière des animaux si ce n'est le stress lié à la contention et à l'inflammation modérée associée à la vaccination. Une étude statistique permettra de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Par ailleurs, des raffinements sont proposés notamment via l'enrichissement des cages et par un suivi post vaccinal comprenant la mise en place des points limites précoces et adaptés (cf annexe 1). Enfin, l'utilisation de l'animal est indispensable à la conduite de cette étude car elle nécessite la préservation de l'intégrité du système respiratoire et immunitaire.

19421 Le mélanome est une tumeur maligne qui se développe à partir des cellules de la peau. C'est la forme la plus agressive des cancers cutanés chez l'humain. Son incidence s'accroît régulièrement. De plus sa résistance aux traitements actuels (chimiothérapie, radiothérapie et immunothérapies) ne laisse qu'une faible espérance de survie aux patients présentant un stade avancé de la maladie. Il demeure nécessaire de développer des travaux visant à mieux comprendre les mécanismes de prolifération et d'invasion des cellules de mélanome afin de mettre au point de nouvelles thérapies. Les mini-porcs de souche MeLiM ont la particularité de développer des mélanomes héréditaires qui régressent totalement et spontanément indépendamment de tous facteurs externes. Bien que ce

phénomène de régression spontanée du mélanome est rare chez l'homme, il existe de fortes similitudes physiologiques et morphologiques entre la peau humaine et celle des porcins. Ces animaux permettent donc d'étudier les mécanismes complexes de développement et de régression du mélanome avec l'objectif de la mise au point d'outils pronostiques ou thérapeutiques.

Ce projet vise à maintenir et développer une cohorte d'animaux présentant des particularités génétiques de développement et de régression spontanée de mélanome cutané. Il s'inscrit dans une démarche translationnelle en appui aux études visant à rechercher des gènes de susceptibilité, à valider dans les familles humaines de prédisposition au mélanome. Il vise également à définir les facteurs de régression tumorale qui s'établissent sans effets secondaires néfastes dans ce modèle.

Le développement d'une tumeur est un phénomène complexe faisant intervenir différents acteurs cellulaires et différents événements génétiques. Ces interactions nécessitent l'utilisation de modèles *in vivo* qui ne peuvent être remplacés par des modèles *in vitro*.

Les portées de porcs MeLiM sont en moyenne de 5-6 porcelets, et tous ne sont pas porteurs de mélanome. S'agissant d'un élevage qui doit répondre aux besoins des différentes expérimentations à venir, le nombre d'animaux a été estimé en fonction de ce paramètre et fixé à 150 sur 5 ans. Il sera réduit au strict nécessaire des besoins expérimentaux. Les protocoles intègrent en premier lieu la nécessité d'éviter toute souffrance pendant le développement métastatique du mélanome et lors des interventions sur animaux. Le suivi quotidien des animaux avec l'élaboration d'une grille individuelle de suivi permet de garantir le bien-être des animaux. Dès l'apparition de troubles du comportement, le vétérinaire de l'installation est alerté et met en place le traitement adapté à la douleur (analgésique et/ou morphinique). Tous les prélèvements seront effectués en salle d'opération et sous anesthésie générale. Les tumeurs seront prélevées pour analyse et serviront à la constitution d'une banque. Les animaux sont élevés dans des porcheries conventionnelles comprenant une maternité avec deux loges de mise bas, des loges d'élevage destinées à la reproduction et des loges d'élevage destinées à la croissance. Concernant l'enrichissement du milieu, les petits ont des chaînes et un mordillot (jouet pour mordre, adapté aux jeunes) et les porcs adultes un ballon et un paillason grattoir.

19422 Le cerveau est constitué de neurones et d'un autre type de cellules, les cellules gliales, auxquelles appartiennent les astrocytes. Alors que le rôle des neurones dans le fonctionnement cérébral est largement reconnu et étudié, le rôle des astrocytes et leurs interactions avec les neurones reste très largement méconnu. Les astrocytes ont longtemps été essentiellement considérés comme support métabolique des neurones mais de plus en plus d'études montrent que ces cellules sont également impliquées dans la régulation de l'activité neuronale. Le but de ce projet est précisément d'étudier les relations neurones-astrocytes lors d'interactions sociales, un processus cognitif complexe impliquant les circuits neuronaux du décodage de l'environnement et des émotions ainsi que de la prise de décision. Ces interactions seront analysées chez les femelles adultes lors de conditions physiologiques et pathologiques avec des modèles de syndromes autistiques connus pour présenter des altérations du comportement social. Au cours de ce projet nous étudierons également les effets de l'ocytocine, une hormone pro-sociale synthétisée par les neurones de l'hypothalamus, sur les relations neurogliales au cours de ces événements.

Pour mesurer l'impact des astrocytes et de l'ocytocine sur les interactions sociales, nous mettrons en place différentes méthodes sur un modèle murin. Ce projet nécessite des expériences chez l'animal entier car nous nous intéressons à l'activité des cellules lors de comportements sociaux entre individus vivants. Ces expériences mobilisent différentes aires cérébrales et requièrent l'intégrité des réseaux neuronaux et gliaux qui ne peuvent être remplacés par des modélisations informatiques ou *in vitro* avec des cellules en culture.

Ce projet de recherche fondamentale se déroulera sur 5 ans et nécessitera 1283 souris. Parmi ces 1283 souris, 496 seront réutilisées dans le cadre d'autres projets de recherche ou maintenues en vie pour le maintien des lignées. Nous effectuerons des enregistrements chroniques des activités neuronales et astrocytaires sur l'animal éveillé lors de tâches comportementales.

Nous tendrons vers les objectifs préconisés de réduction du nombre d'animaux utilisés et du raffinement de la méthodologie utilisée de la manière suivante. Le nombre d'animaux utilisés sera minimisé autant que possible grâce à l'étude de plusieurs paramètres chez le même animal. Nous réduirons au maximum la douleur et le stress générés par l'expérimentation en utilisant de façon adaptée des produits anesthésiques et analgésiques. Les animaux seront logés dans les meilleures conditions possibles avec des milieux enrichis lors d'isolement. Chaque animal sera suivi tout au long de l'expérience, en particulier après les procédures chirurgicales, afin de détecter tout indicateur de souffrance et y pallier. Des points limites au-delà desquels toute expérimentation sur les animaux cessera ont été définis

19423 L'anxiété est un trouble psychique qui touche une grande partie de la population mondiale. Différents traitements médicamenteux sont actuellement disponibles pour lutter contre l'anxiété. Cependant, comme toutes stratégies médicamenteuses, ces dernières présentent des effets secondaires. Le but de ce projet est de tester sur des rongeurs les effets anxiolytiques de 4 nouvelles molécules d'origines naturelles (à base d'algues).

Ainsi, au cours de cette étude, nous évaluerons *in vivo*, chez le rat, 4 nouvelles molécules, en administration aiguë, dans le test d'enfouissement défensif conditionné. Les rongeurs sont les espèces animales les plus étudiées dans le domaine de la recherche biomédicale. Sur la base des connaissances et des acquis du laboratoire, ainsi que des analyses statistiques préliminaires, le nombre de rats par groupe a été fixé à 15 maximum, ce qui permet de donner une puissance statistique suffisante aux résultats obtenus. Les animaux seront répartis dans 15 groupes pour le test comportemental. Au total, 225 rats seront requis pour la réalisation de cette étude, puisqu'aucun modèle alternatif ne permet d'obtenir les informations nécessaires à ce projet.

A la suite de la partie comportementale, une étude biochimique sera réalisée sur un échantillon de plasma récolté après passage des animaux au test comportemental. Cette étude permettra le dosage sanguin des hormones du stress, telles que l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) et de la corticostérone.

Tout au long de ce projet, les animaux seront hébergés dans des cages standards aux normes européennes. Les principes éthiques et les standards de raffinement sont utilisés de la naissance à la mort de l'animal. Le bien-être des animaux sera suivi par du personnel formé, bi-quotidiennement pendant la semaine ouvrée 5j/7 et quotidiennement durant les week-ends et jours fériés. Cette étude comportementale nécessite d'être réalisée sur des animaux car aucun modèle alternatif ne pourrait satisfaire l'objectif scientifique de ce projet. En effet, la mesure des comportements de type anxieux est impossible chez des modèles *in vitro* ou *in silico*, donc cette étude ne peut être réalisée que chez des modèles vivants. Ainsi, notre demande de projet prend en compte le bien-être animal, les pratiques éthiques et répond à la règle des 3R.

19424 La prédation constitue un mécanisme important de régulation des populations animales et une très importante pression de sélection sur les caractéristiques des proies, comme les lézards qui sont consommés par de nombreux prédateurs généralistes et spécialistes de sommet de chaîne trophique. La prédation par les chasseurs visuels exerce une pression de sélection importante sur la coloration corporelle des proies. Cependant, les expériences manipulant la présence de prédateurs en conditions naturelles et testant son impact sur la mortalité différentielle d'individus naturellement plus ou moins cryptiques sont extrêmement rares. Nous proposons ici de tester par une approche expérimentale l'impact de la prédation naturelle sur les traits d'histoire de vie, incluant les effets sub-létaux sur la croissance et la reproduction et les effets létaux sur la survie annuelle, ainsi que sur le différentiel de sélection naturelle de lézards plus ou moins colorés. Nous nous focaliserons sur les prédateurs aviens généralistes et étudierons la conséquence de l'exposition ou non à ces prédateurs sur des populations semi-naturelles du lézard vivipare (*Zootoca vivipara* Jacquin). Cette espèce abondante dans certains milieux humides ouverts en France est consommée par des espèces d'oiseaux comme les rapaces, les pies, les corneilles, ou les pies grièches. On évaluera les effets de la prédation dans deux contextes écologiques différents en fonction de l'humidité de l'habitat qui sera manipulée par addition d'eau pendant l'été (simulant des

pluies abondantes) ou non (simulant une situation sèche). L'humidité représente un paramètre environnemental critique puisque les précipitations, la présence d'eau libre et les habitats associés sont favorables à l'espèce. Les expériences seront conduites dans de grands enclos expérimentaux et impliqueront un minimum de protocoles expérimentaux nécessaires pour le marquage des individus et pour des évaluations de leur condition physiologique via des prélèvements sanguins. Les effectifs manipulés seront choisis pour refléter la densité et les structures proches de celles en conditions naturelles. Au total, nous relâcherons des lézards dans quatre types d'enclos semi-naturels selon un plan factoriel croisé (traitement de protection des filets et traitement d'arrosage) avec 25 enclos et 1625 lézards environ (20 sub-adultes et adultes et 45 juvéniles par enclos). Nous effectuerons un suivi des populations sur une année en quantifiant la survie annuelle, la croissance morphologique annuelle, la reproduction annuelle (prévisionnel de 1300 nouveaux-nés de la première génération) en mettant les femelles gestantes en captivité et en mesurant leurs nouveaux-nés, et la condition physiologique des animaux (état d'hydratation).

Dans les conditions de cette étude, il est impossible de remplacer le modèle biologique par un équivalent cellulaire ou in silico. Par ailleurs, un échantillon important d'animaux sera utilisé pour quantifier la sélection naturelle (1625 lézards en 2022 et 1300 nouveaux-nés de première génération en 2023) car celle-ci est généralement faible, son étude nécessite des approches en populations réelles avec des structures démographiques complexes et réalistes, et la modélisation de la sélection doit prendre en compte la forte hétérogénéité entre individus. L'échantillon a cependant été réduit au minimum en choisissant un nombre de populations limité par traitement (entre 4-6 enclos par groupe expérimental) et en utilisant un nombre d'animaux correspondant à la structure démographique autour de l'équilibre pour chaque enclos. Afin de raffiner les conditions de cette expérience, les animaux seront manipulés dans des conditions semi-naturelles proches de leur environnement sauvage pendant la quasi-totalité de l'expérience. En élevage au laboratoire, on raffinerait aussi les conditions de captivité grâce à un enrichissement des cages et à l'utilisation de conditions climatiques optimales.

19425 La sclérose latérale amyotrophique (SLA) ou maladie de Charcot est une maladie neurodégénérative fatale et incurable caractérisée par la perte sélective des neurones moteurs de la moelle épinière et du cerveau. Les neurones moteurs contrôlant l'activité de l'ensemble des muscles volontaires, leur perte conduit irrévocablement à une paralysie générale et à la mort du patient dans les 2 à 5 ans. La SLA se déclare généralement entre 40 et 70 ans et touche environ 7000 personnes en France. Des lignées de souris montrent les principales caractéristiques de la maladie humaine. Ces souris ont joué un rôle fondamental dans la compréhension des mécanismes conduisant à cette pathologie et l'exploration de nouvelles pistes thérapeutiques.

Bien que les neurones moteurs soient sélectivement atteints dans la maladie, le système immunitaire se retrouve également impliqué dans cette maladie. En effet, des lymphocytes T dits régulateurs (Treg), une population de globules blancs dont la fonction est de supprimer les réponses immunitaires potentiellement dangereuses, voient leur nombre et leur propriétés régulatrices fortement diminuées chez les patients et les souris. L'hypothèse de départ est que les altérations métaboliques présentes dans la SLA contribuent au dysfonctionnement des lymphocytes T régulateurs dont la fonction est directement gouvernée par l'environnement métabolique. Notre projet consiste donc à étudier le métabolisme des lymphocytes T régulateurs dans la maladie et d'évaluer le potentiel thérapeutique d'une correction métabolique de ces cellules dans un modèle de SLA.

Notre projet s'inscrit dans la règle des 3Rs de la façon suivante :

Remplacement : Notre projet propose une approche thérapeutique ciblant l'interaction entre système nerveux et système immunitaire. L'utilisation de souris mimant la pathologie humaine est le seul système intégrant la complexité des interactions des deux systèmes. Le modèle souris est le seul capable de pouvoir fournir une validation thérapeutique de notre approche. Le modèle vivant demeure donc une étape requise pour tout transfert thérapeutique potentiel vers la clinique.

Réduction : Nous avons donc déterminé pour une durée du projet de 3 années, un nombre total de 375 souris. Ce nombre est basé sur nos études antérieures et les recommandations internationales

vidant à définir les tailles optimales des cohortes de souris modèle de la maladie. Des étapes in vitro sont particulièrement développées afin de réduire le nombre d'animaux utilisés.

Raffinement : Une connaissance extensive de ce modèle de SLA, décrit en 1994, permet de connaître et donc anticiper les différentes étapes de la maladie et donc d'optimiser l'expérimentation. Une surveillance régulière est mise en place et assurée par les expérimentateurs et nous travaillons étroitement avec la structure du bien-être animal. L'enrichissement du milieu avec des copeaux dans les litières, igloo, PVC et du coton vierge pour faire un nid végétal contribue à fournir un environnement enrichi. Les points limites sont définis par le suivi régulier du poids des souris et leur capacité à effectuer une tâche motrice réflexe simple.

19426 Le diabète est un trouble de l'assimilation, de l'utilisation et du stockage des sucres apportés par l'alimentation.

On distingue principalement deux types de diabète : le diabète de type 1 qui touche environ 10% des diabétiques en France, et le diabète de type 2 qui en touche env. 90 %. Il existe d'autres types de diabètes, mais plus rares (origine génétique, diabète de type 1 "lent" (LADA) ou diabète secondaire à certaines maladies ou prises de médicaments...).

Le diabète de type 1 est dû à une défaillance du système immunitaire qui pour une raison encore inconnue, se retourne brutalement contre ses propres cellules.

Dans le diabète de type 1, ce sont les cellules du pancréas qui sont visées. La destruction des cellules pancréatiques au niveau des îlots de Langerhans induit une diminution de la production d'insuline. Or l'insuline est l'hormone qui permet aux cellules de stocker le glucose. Ce glucose, non pris en charge, se retrouve en excès dans le sang et provoque une hyperglycémie.

A l'heure actuelle, le traitement du diabète de type 1 consiste en l'administration quotidienne d'insuline, soit par injections avec un stylo à insuline, soit à l'aide d'une pompe à insuline.

La thérapie cellulaire est une autre piste thérapeutique qui consiste à greffer des cellules Bêta productrices d'insuline.

Notre projet vise à étudier diverses modalités de prélèvements, isolement et transplantation d'îlots de Langerhans, chez le Rat et la Souris.

L'objectif est la mise au point de techniques / substrats permettant des avancées thérapeutiques chez l'Homme, et d'améliorer ainsi la qualité de vie des patients diabétiques.

Pour cela, nous utiliserons 1000 rats et 1000 souris au maximum pour 5ans, pour toutes les étapes du projet (formation aux techniques, prélèvements et préparations d'îlots, greffes d'îlots/essais thérapeutiques).

Ce nombre est un maximum estimé à partir des quantité de cellules nécessaires (max. 10 animaux/session de prélèvement) pour les travaux in vitro, et à partir des chirurgies envisagées. Un nombre inférieur pourra être utilisé en fonction des résultats obtenus et dans tous les cas nous veillerons à n'utiliser que les animaux strictement nécessaires. (REDUCTION)

Ce projet est développé dans le respect de la règle des 3 R : les premiers essais et formations auront lieu sur pièces anatomiques, avant de passer sur animal vivant (RAFFINEMENT)

Une partie des expérimentations pourront avoir lieu in vitro sur îlots de Langerhans, mais il n'est pas possible de s'affranchir totalement de l'utilisation d'animaux, à la fois pour l'obtention des îlots et ensuite pour la réalisation des greffes, ces dernières nécessitant un organisme entier et fonctionnel. (REPLACEMENT).

Les procédures chirurgicales pouvant générer du stress et de la douleur seront systématiquement réalisées sous anesthésies générale, par du personnel habilité.

Les animaux feront l'objet de soins post-opératoires conformes aux bonnes pratiques vétérinaires, notamment en ce qui concerne la prise en charge de la douleur (administration d'antalgiques). Un suivi clinique adapté avec des pesées régulières sera mis en place de façon à suivre au mieux l'état de santé des animaux.

Durant l'ensemble des procédures, les animaux seront maintenus autant que possible en groupes d'individus compatibles, dans un environnement enrichi adapté à leurs besoins éthologiques (matériel de nidification, cachettes...).

Des points limites suffisamment prédictifs sont définis et permettent à tout moment d'arrêter le protocole pour un ou des animaux si leur état de santé le justifie.

La finalité du projet est de pouvoir développer des thérapies apportant de meilleures conditions de vie aux patients diabétique, en tentant de restaurer durablement la sécrétion d'insuline naturelle dans l'organisme.

19427 Nous proposons de tester l'effet de peptides induisant l'autophagie (peptides pro-autophagiques) dans un contexte d'infection à *Mycobacterium tuberculosis*, agent étiologique de la tuberculose humaine qui cause la mort de 1,5 millions de personnes par an. L'effet bénéfique supposé de l'induction de l'autophagie permettrait de diminuer la dose et/ou la durée du traitement des patients améliorant ainsi le pronostic d'évolution de la maladie et atténuerait les risques d'apparition de résistance aux antibiotiques des bactéries. L'autophagie est un processus physiologique permettant la dégradation des constituants cellulaires par les lysosomes. Dans le cas d'infection à *Mycobacterium tuberculosis*, l'activation de l'autophagie par différents composés pharmacologiques ou immunologiques permet de tuer, ex-vivo, la bactérie résidant dans des macrophages. L'effet de l'activation de l'autophagie dans un modèle murin d'infection à *Mycobacterium tuberculosis* reste débattu car les composés testés (carbamazépine par exemple) jusqu'à présent ne sont pas spécifiques de l'autophagie et peuvent activer d'autres processus cellulaires. Récemment, des peptides ont été élaborés afin de permettre l'activation spécifique de l'autophagie. Ces peptides ont été testés avec succès chez la souris dans un contexte d'infection virale. Le but du protocole est d'évaluer l'impact de l'induction de l'autophagie sur l'évolution de l'infection mycobactérienne dans un modèle murin. Nous disposons d'une lignée de souris transgéniques C57Bl/6 (GFP-LC3#53) qui exprime un marqueur de l'autophagie la protéine LC3 couplée à une protéine fluorescente, la GFP. En absence d'autophagie, la protéine GFP-LC3 se trouve dans le cytosol sous forme diffuse. L'activation de l'autophagie induit la lipidation de GFP-LC3 et la formation de vacuoles, les autophagosomes. La GFP-LC3 apparait alors sous forme de puncta qui peuvent être quantifiés afin de déterminer le niveau d'autophagie. L'effet de ces peptides sera comparé à la carbamazépine qui est utilisé comme médicament anti-convulsivant et thymorégulateur mais qui est également doué de propriétés pro-autophagique in vitro. Cependant les nombreux effets secondaires sur la sphère neuro-psychique limitent son utilisation en thérapie anti-infectieuse.

Nous envisageons de réaliser deux procédures :

Une procédure dans un contexte non-infectieux afin de déterminer la cinétique d'apparition de l'autophagie dans les poumons, choisir le meilleur peptide et définir sa dose optimale. Cette procédure est de gravité légère. En nous appuyant sur les données de la littérature, nous avons réduit au maximum le nombre de souris et, ainsi, les expériences seront réalisées sur 2 souris par condition. Cette procédure nécessitera 142 souris.

Une procédure dans un contexte infectieux afin de déterminer l'effet d'un peptide pro-autophagique sur l'évolution de l'infection des souris par *Mycobacterium tuberculosis*. Cette procédure est de gravité modérée. Nous avons limité le nombre d'animaux à 5 par lot afin d'obtenir des données suffisantes pour évaluer l'effet du peptide tout en restant compatible avec l'utilisation de tests statistiques adaptés aux petits effectifs. De plus, dans ce modèle expérimental, comme dans la plupart des modèles d'investigation in vivo, la variabilité inter individuelle en réponse à un stimulus est importante et ne nous permet pas de diminuer le nombre d'animaux par groupe en dessous de 5. Cette procédure nécessitera 65 souris.

Au total le nombre de souris nécessaire à la réalisation de ce projet est de 207 souris.

Mise en œuvre des 3Rs :

Remplacement : Etant donné la complexité de l'établissement et du maintien des réponses immunitaires aucune méthode alternative à l'utilisation d'animaux vivants n'est susceptible de répondre aux objectifs du projet.

Réduction : le nombre d'animaux a été rationalisé à partir des données de la littérature et de résultats obtenus précédemment.

Raffinement : Les animaux sont hébergés en groupe dans des cages contenant de l'enrichissement, dans des locaux conformes à la réglementation et suivis par un personnel spécifiquement formé afin que les besoins physiologiques des animaux soient respectés. L'état général des animaux (poil hérissé, hypo- ou hyperactivité...), le comportement alimentaire seront observés quotidiennement, la physiologie (rythme respiratoire, température corporelle), ainsi que la prise de poids des animaux seront suivis régulièrement (Une fois par semaine ou plus, si l'état des animaux le nécessite). Ces différents critères permettront d'appréhender au mieux l'effet des produits testés et/ou la douleur que cette dernière pourrait engendrer. Tous signes et comportements anormaux et/ou perte de poids de plus de 20 % des animaux par rapport à leur poids initial entraîneront l'exclusion de ces derniers qui seront ensuite euthanasiés si leur état est jugé irréversible.

19428 Le mannitol est une molécule de la famille des polyols utilisée comme substitut du sucre par l'industrie agroalimentaire. Il présente aussi de multiples applications en médecine du fait de ses propriétés d'osmorégulation, c'est-à-dire de régulation de la pression osmotique exercée par les fluides de part et d'autre des membranes cellulaires. Il est administré aux patients dans certains cas de défaillance rénale afin d'améliorer la diurèse (élimination de l'urine). Il est aussi utilisé dans le traitement de certaines tumeurs cérébrales afin de faciliter le passage des molécules anticancéreuses à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE) protégeant le cerveau. Il permet aussi de réduire la pression intracrânienne survenant dans un contexte d'oedème cérébral c'est-à-dire d'accumulation anormale d'eau dans le tissu cérébral, en favorisant l'élimination d'eau. Le passage de molécules à travers la BHE ainsi que la résorption des oedèmes cérébraux résulteraient de l'action du mannitol sur les cellules de l'endothélium vasculaire. Il est admis que l'administration de mannitol favorise la déshydratation de ces cellules ce qui entraînerait l'ouverture de pores entre les cellules laissant passer les agents thérapeutiques et sortir l'eau. De nouveaux agents d'imagerie cérébrale permettant la reconnaissance spécifique de certaines populations cellulaires ou de lésions (exemple : cellules tumorales, cicatrice gliale...), ou l'imagerie et la destruction sélective de ces cellules par des agents d'imagerie dits théranostiques sont en cours de développement. L'étude préclinique de la spécificité et de l'efficacité de ces agents ne peut se faire sans recourir à une méthode de vectorisation (les agents d'imagerie sont chimiquement associés à des peptides dits « vecteurs » favorisant le passage à travers la BHE) ou d'ouverture mécanique temporaire de la BHE (application d'ultrasons focalisés ou injection de mannitol). L'injection de mannitol présente l'avantage d'avoir fait ses preuves en clinique depuis de nombreuses années, ce qui serait susceptible d'accélérer l'évaluation en recherche clinique d'agents ayant démontré une efficacité dans les études précliniques.

Toutefois, bien que l'utilisation du mannitol chez l'homme soit relativement bien documentée, son emploi chez l'animal est peu décrit. De plus, il n'existe pas de consensus sur la voie d'administration (ex : intra-artérielle, intraveineuse, intrapéritonéale...), ni sur les doses administrées. Les doses mentionnées dans la littérature sont généralement peu physiologiques et souvent incompatibles avec la survie des animaux car entraînant une déshydratation sévère et sont donc inadaptées aux études longitudinales. Enfin, la dynamique du processus d'ouverture est inconnue, notamment en termes de délai d'attente post-injection et de durée de la fenêtre d'ouverture. Ces informations sont indispensables pour l'administration efficace d'agents d'imagerie et/ou thérapeutiques en recherche préclinique. Le but de ce projet de recherche est d'optimiser l'administration de mannitol chez la souris en privilégiant si possible la méthode la moins invasive. Nous déterminerons la dose permettant l'ouverture de la BHE sans compromettre la survie de l'animal et nous étudierons la dynamique de l'ouverture de la BHE par Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) cérébrale sous anesthésie avec injection d'un agent de contraste (Gd-DOTA). Il sera ainsi possible de suivre les changements de perméabilité de la BHE et de cartographier à la fois temporellement et spatialement son ouverture et sa fermeture. Ce projet nécessitera l'utilisation de 77 souris adultes au maximum sur 12 mois. Les animaux seront explorés sur un spectromètre imageur préclinique opérant à 7T dédié à la souris. Cette étude sera conduite dans le respect du principe éthique des 3 R.

L'optimisation de l'administration de mannitol et l'étude de l'ouverture spatiale et temporelle de la barrière hémato-encéphalique nécessitent toutes deux le recours à l'animal. Il n'existe en effet aucune méthode alternative permettant d'étudier la dynamique de l'ouverture d'une barrière hémato-encéphalique complète et fonctionnelle en fonction du mode d'administration du mannitol (intrapéritonéale ou intraveineuse). Cette information ne peut être obtenue que sur le cerveau d'un animal vivant ayant une fonction cardiovasculaire préservée. Par ailleurs, l'identification d'une dose sans effets secondaires délétères requiert l'expérimentation sur l'animal. Nous réduirons le nombre d'animaux grâce à l'utilisation de l'IRM, une méthode non invasive permettant le suivi longitudinal d'un même animal, et l'emploi de tests statistiques pour le calcul de la taille des effectifs. Le raffinement concernera la diminution du stress et de la douleur. L'anesthésie sera utilisée pour les injections et les explorations par IRM. Les points limites préalablement définis seront strictement respectés. Un délai d'acclimatation minimum de 10 jours et une habitude à l'expérimentateur seront assurés. Les animaux seront hébergés en groupes sociaux (3 à 5 animaux par cage), avec cycle jour/nuit, nourriture et boisson ad libitum et enrichissement environnemental. Les cages contiendront des rondins de bois à ronger, du coton pour la nidification, un refuge en plastique, et une roue fast-track avec igloo afin de diminuer les comportements agressifs et réduire l'ennui, et favoriser l'expression d'un maximum de comportements naturels (interactions sociales, locomotion, élimination, marquage, repos, fabrication d'un nid, recherche de cachette. . .).

19429 Chez les mammifères, le foie est caractérisé par ses capacités de régénération après perte de la masse hépatique. Cependant, les déterminants de ce phénomène, en particulier en situation pathologique, ne sont pas bien connus.

Lors des premières étapes de la régénération hépatique, les hépatocytes stockent une grande quantité de lipide, en particulier du cholestérol. Il a été montré que le récepteur hépatocytaire permettant l'intégration du cholestérol circulant au sein des lipoprotéines de faible densité (LDL, dont le récepteur est le LDLR), ainsi qu'une protéine régulant l'expression de ce récepteur, la protéine convertase subtilisine/kexine de type 9 (PCSK9), jouent un rôle central dans la régénération hépatique.

Ce projet se donne pour objectif l'étude du rôle que jouent ces deux protéines sur la régénération hépatique. Pour cela, un modèle murin d'hépatectomie partielle sera utilisé. La régénération hépatique sera étudiée à différents temps, et le rôle du LDLR et de PCSK9 pourra être précisé par l'utilisation de souris exprimant une déficience pour ces protéines. Enfin, les conséquences de l'administration d'un anti-PCSK9, médicament utilisé pour le traitement de dyslipidémies, seront étudiées.

On estime à 212 le nombre de souris utilisées en 5 ans.

Afin de suivre la règle de 3R :

Réduire :

Ce projet a été construit avec la volonté de mettre en place et de respecter « la règle des 3 R ». Seules les expériences absolument indispensables au succès du projet seront mises en œuvre. Nous avons pris soin d'optimiser au mieux nos expérimentations en choisissant les lignées murines les plus adaptées à l'étude. Les procédures ont été réfléchies afin de réduire au maximum le stress et les souffrances des animaux soumis aux expérimentations. Les tests statistiques que nous utiliserons le plus fréquemment seront le test non paramétrique de Mann-Whitney ou paramétrique de Student. Dans le cas de plusieurs variables explicatives catégorielles, nous opterons pour une analyse de variance ANOVA.

Remplacer :

Enfin, il n'existe pas à l'heure de méthodes ex vivo / in vitro de remplacement à l'expérimentation animale dans le domaine de la chirurgie hépatique.

Raffiner :

Le protocole 1 est classé sévère. Un protocole pré-et post-opératoire a été mis en place afin de limiter la douleur et la souffrance de l'animal. Les animaux reçoivent avant la chirurgie et pendant

une durée de 3 jours de la buprenorphine, de l'amoxicilline du métacam. Les souris seront placées en couveuse à 30°C pendant 5 jours post-chirurgie et leur cage sera enrichie par des frisottis ou une petite maison en carton.

19430 L'âge est un paramètre primordial affectant l'interaction entre hôtes et parasites. Ainsi, chez l'homme, on constate que la relation entre âge et morbidité est souvent non linéaire, avec les jeunes enfants et les classes d'âge plus avancées qui souffrent des conséquences de l'infection. Ce pattern est souvent interprété comme étant le résultat de changements qui s'opèrent au niveau de la réponse immunitaire au cours de la vie de l'hôte. Cependant, nous savons également que le microbiote intestinal change au cours de la vie de l'hôte, en terme de diversité, composition et fonction. Il est donc possible que les variations du microbiote intestinal puissent contribuer à expliquer le pattern de susceptibilité aux infections en fonction de l'âge. Dans ce projet nous souhaitons étudier cette hypothèse en utilisant des souris C57BL/6 et le nématode intestinal *Heligmosomoides polygyrus*. Nous utiliserons des souris à des âges différents, couvrant le spectre de longévité (de 1 à 24 mois). Le nématode *H. polygyrus* se prête bien à ce type d'étude car il n'altère pas l'état de santé des souris (les souris tolèrent l'infection sans qu'aucun symptôme ne se manifeste), mais il est possible de suivre la dynamique de l'infection et de relier cette dynamique à l'âge des souris et aux modifications du microbiote intestinal.

Ce projet suit scrupuleusement la règle des 3R. Etant donné la complexité des interactions qui existent entre les centaines d'espèces de bactéries qui constituent le microbiote intestinal, il n'est pas possible de réaliser ce type d'étude *in vitro*. Le nombre de souris utilisées est minimisé, tout en garantissant la puissance statistique nécessaire à l'interprétation des résultats. Pour ce faire, nous utiliserons 10 souris infectées et 5 souris contrôles (non-infectées) pour chaque classe d'âge (5 classes d'âge). Ceci fait un total de 75 souris C57BL/6. Afin d'assurer le bien-être des animaux, ils seront hébergés en groupe (5 souris par cage), ce qui permet les interactions sociales. Les cages seront également enrichies, afin d'améliorer le bien-être. Enfin, même si le nématode ne produit qu'une infection bénigne, les souris seront surveillées quotidiennement afin de vérifier leur état de santé. Toutes les manipulations des souris sont effectuées par du personnel expérimenté. Aucun stress ou souffrance ne sont attendus lors de cette étude.

19431 La nouvelle pandémie mondiale de la maladie à Coronavirus 2019 (Covid-19), induite par le Coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV2), a causé plus de 3,5 millions de morts dans le monde depuis 2019. Mener des recherches pour le développement d'un vaccin ADN efficace et durable contre ce virus afin de contrôler un problème majeur de santé publique à l'échelle mondiale est donc indispensable.

L'objectif de notre étude est d'évaluer, chez la souris, l'efficacité de 4 prototypes vaccins ADN contre la Covid-19 induite par le corona virus SARS-CoV2 en étudiant les réponses immunitaires stimulées par ces prototypes vaccins.

Nos prototypes vaccins, composés d'acides nucléiques ADN, sont des plasmides portant les gènes des principales protéines structurales du SARS-CoV2. Par conséquent l'injection de différentes combinaisons de ces ADN permet l'expression des protéines Spike (S), Membrane (M), Nucléocapside (N) et/ou de l'Enveloppe (E) du SARS-CoV2 qui vont induire des réponses immunes pouvant protéger efficacement contre le SARS-CoV-2 pathogénique.

Pour cela, les souris seront immunisées en une injection unique en Intradermale (I. D.) puis euthanasiées 2, 4 et 8 semaines post-immunisation. Le sang ainsi que la rate seront récoltés afin de doser les anticorps et les cellules T tueuses spécifiques de ce vaccin ADN. Des souris non immunisées ou immunisées avec le SARS-CoV2 tué seront utilisées comme témoins négatifs et positifs respectivement.

REMPACEMENT : A l'heure actuelle il n'existe pas de modèle *in vitro* fiable permettant d'obtenir et de doser des réponses immunes de type anticorps ou cellules T cytotoxiques rendant nécessaires et obligatoires des tests *in vivo*. Le modèle murin est le petit animal le plus adéquat et le plus utilisé pour l'évaluation de l'immunogénicité des vaccins.

REDUCTION : Nous utiliserons un total de 120 souris BALB/c qui seront réparties en 6 groupes :

- un groupe "Prototype 1" de 24 animaux (3 conditions de 8 souris).
- un groupe "Prototype 2" de 24 animaux (3 conditions de 8 souris).
- un groupe "Prototype 3" de 24 animaux (3 conditions de 8 souris).
- un groupe "Prototype 4" de 24 animaux (3 conditions de 8 souris).

L'utilisation de groupes de 8 souris par condition permet d'obtenir des résultats statistiquement fiables mêmes en cas de réduction accidentelle d'une souris de l'effectif initial et ce, sans être obligé de recommencer l'expérimentation.

- un groupe "Contrôle Négatif" réduit à 12 animaux (3 conditions de 4 souris), commun aux différents prototypes, car nous n'attendons aucune réponse immunitaire.

- un groupe "Contrôle Positif" réduit à 12 animaux (3 conditions de 4 souris), commun aux différents prototypes, dont une réponse immune de référence est attendue.

RAFFINEMENT : La méthodologie et les techniques utilisées ont déjà été employées avec succès pour d'autres prototypes vaccins : la douleur de l'immunisation par injection intra-dermique est légère (comparable à celle appliquée chez l'homme) et en règle générale ne nécessite pas d'anesthésie préalable. Toutefois afin de mieux maîtriser cette voie d'immunisation et éviter des traumatismes chez la souris vaillante en effectuant des geste brusques les souris seront anesthésiées à l'isoflurane. Le processus inflammatoire au point d'injection reste limité étant donné l'absence d'adjuvant, aucune ulcération n'est observée suite à la vaccination ADN.

Les prélèvements (sang et rate) sont uniques et sont réalisés à la fin de chaque procédure sur les animaux profondément anesthésiés.

L'entretien des animaux et l'observation de leur état sanitaire sont réalisés quotidiennement par le personnel qualifié.

19432 La nouvelle pandémie mondiale de la Covid-19, causée par le SARS-CoV2, nécessite de nouvelles approches et à se focaliser vers le développement de prototypes de vaccins qui induiraient une immunité efficace et durable contre ce virus.

Dans ce contexte visant à développer des vaccins à base d'ADN conférant une immunité multi-souches et durable contre le SARS-CoV-2 et ses variants, l'objectif du présent projet est d'évaluer l'efficacité de 5 préparations vaccinales de type protéines recombinantes comportant les protéines structurales S (domaine RBD), M et E du SARS-CoV-2, chez la souris.

Après injection à des souris BALB/c, nous doserons le taux d'anticorps et la proportion de cellules T (productrices d'IFN-gamma) spécifiques de chaque antigène après 2, 4 et 8 semaines post immunisation avec une seule injection de ces préparations vaccinales. Les souris seront euthanasiées pour récolter le sang total afin d'isoler le plasma et la rate pour isoler les splénocytes qui seront utilisés pour doser les anticorps et les cellules T tueuses, respectivement. Des souris BALB/C non injectées seront utilisées comme témoins négatifs, et d'autres injectées avec un vaccin composé du SARS-CoV2 tué seront utilisées comme témoins positifs.

A l'issue de ces travaux, nous disposerons d'une meilleure connaissance des réponses Ac et cellules T induites par les protéines RBD, M et E du SARS-CoV-2. Il sera également envisagé, en fonction des résultats obtenus, de combiner dans une autre expérimentation nos vaccins ADN (testés dans un projet autre projet) avec une préparation protéique en rappel d'immunisation (boost) pour provoquer une réponse immunitaire plus efficace chez le vacciné.

REMPACEMENT : A l'heure actuelle il n'existe pas de modèle in vitro fiable permettant d'obtenir et de doser des réponses immunes de type anticorps ou cellules T rendant nécessaires et obligatoires des tests in vivo. Le modèle murin est le petit animal le plus adéquat, le moins couteux et le plus utilisé pour l'évaluation de l'immunogénicité. Les souris ne sont pas une espèce dont l'existence est en danger et permettent de remplacer dans un premier temps l'utilisation d'autres animaux telles que les macaques.

REDUCTION : Dans le cadre de cette expérimentation, nous utiliserons pour les 5 préparations vaccinales à tester un total de 120 souris BALB/c qui seront réparties en 2 groupes :

- Trois conditions pour chaque préparation vaccinale seront utilisées avec 8 souris par conditions (soit $8 \times 3 = 24$). Pour les 5 préparations vaccinales nous utiliserons donc un total de 120 souris.

Les trois conditions correspondent aux trois temps d'euthanasie à 2, 4 et 8 semaines post immunisation. L'utilisation de groupes de 8 souris par condition permet d'obtenir des résultats statistiquement fiables même en cas de réduction accidentelle d'un animal de l'effectif initial et ce, sans être obligé de recommencer la totalité de l'expérimentation

- Dans un souci de réduction les groupes contrôles négatifs et positifs seront les mêmes que ceux d'un second projet déposé en parallèle.

RAFFINEMENT : La méthodologie et les techniques utilisées ont déjà été employées avec succès pour d'autres prototypes de vaccins : la douleur de l'immunisation par injection intra-musculaire est légère (comparable à celle appliquée chez l'homme) et ne nécessite pas d'anesthésie préalable, le processus inflammatoire au point d'injection reste limité étant donné l'absence d'adjuvant, aucune ulcération n'est observée suite à la vaccination protéique. Les prélèvements (sang et rate) sont uniques et sont réalisés en toute fin de procédure sur les animaux profondément anesthésiés.

L'entretien des animaux et l'observation de leur état sanitaire sont réalisés quotidiennement par le personnel qualifié.

19433 L'omniprésence du glyphosate dans les aliments et l'eau représente un problème de santé publique important et sa toxicité chez les mammifères fait l'objet de nombreuses controverses, notamment sur une possible incidence sur le nombre croissant d'enfants diagnostiqués autistes.

Le glyphosate agit comme un herbicide en inhibant une enzyme présente dans les plantes, mais cette enzyme est également présente dans tous les micro-organismes, y compris la flore intestinale animale et humaine. Alors que la flore intestinale fournit des avantages importants pour son hôte, en particulier dans le métabolisme, le développement du cerveau et du système immunitaire, sa forme altérée est associée à de nombreuses inflammations chroniques. Ici, nous émettons l'hypothèse que l'exposition alimentaire à long terme au glyphosate (administré par incorporation dans la nourriture à la dose d'exposition maximale sans effet nocif observable de 50 mg/kg/jour autorisée en Europe) modifie la composition et / ou l'activité de cette flore intestinale. Dans la partie de ce projet impliquant cette saisine, nous étudierons l'impact secondaire potentiel au niveau cérébral et sa possible incidence sur l'autisme par étude du comportement sur des souris transgéniques. Ces souris présentent un modèle génétique de troubles de la transmission synaptique qui induisent des symptômes d'autisme. Cette étude sera corrélée avec une étude clinique statistique sur les cas d'autisme par rapport à l'utilisation des pesticides en fonction des zones géographiques. Dans l'affirmative, cette étude apportera des éléments en faveur d'une limitation de l'utilisation du Glyphosate.

Nous appliquerons la règle des 3R de la façon suivante :

Remplacer : L'étude globale de comportement proposée chez la souris ne peut être remplacée par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants.

Réduire : Nous avons limité le nombre d'animaux au strict minimum permis par les tests statistiques. Les protocoles de comportement choisis, déjà utilisés en routine, n'induisent pas de morbidité. Le suivi longitudinal réalisé en amont (mesure de paramètres physiologiques) et en aval (électro-encéphalographie) permet de réduire le nombre de groupes d'animaux utilisés, sans compromettre les objectifs du projet.

Raffiner : le projet s'appuie sur des méthodologies respectueuses du bien-être des animaux mises en oeuvre uniquement par du personnel technique et de recherche formé et qualifié. Le bien-être des animaux est un facteur clé de la réussite du projet et des points limites en adéquation avec les besoins expérimentaux ont été déterminés afin d'éviter toute souffrance ou détresse des animaux.

Ce projet nécessite dans son ensemble 288 souris sur une durée maximum de 5 ans.

19434 La maladie de Parkinson est la seconde pathologie neurodégénérative liée à l'âge la plus répandue à travers le monde. Elle débute habituellement entre 45 et 70 ans. Les symptômes de la maladie de Parkinson commencent généralement à apparaître après environ 70 à 80% de perte de neurones dopaminergiques dans la substance noire du cerveau.

Malgré un nombre considérable d'études cliniques et expérimentales, les traitements de cette maladie, pharmacologiques (principalement la L-Dopa) ou chirurgicaux (par exemple, la stimulation du noyau sous-thalamique) n'agissent, jusqu'à preuve du contraire, que sur les symptômes et non pas sur l'évolution du processus dégénératif. Cela s'explique principalement par notre large méconnaissance des mécanismes intimes de la mort cellulaire impliqués dans la perte neuronale associée à la maladie de Parkinson et dont une meilleure compréhension devrait mener à la découverte de traitements neuroprotecteurs pharmacologiques ou géniques.

Le modèle de rat de la maladie de Parkinson associé à une lésion unilatérale de 6-hydroxydopamine (6-OHDA) s'est révélé inestimable pour faire progresser notre compréhension des mécanismes sous-jacents aux symptômes parkinsoniens.

Le but de cette étude est de mettre en œuvre le modèle 6-OHDA de la maladie de Parkinson chez les rats (Sprague-Dawley et Wistar) et ainsi permettre le développement de différentes molécules.

La lésion des neurones dopaminergiques (DA) nigraux est effectuée par injection intracérébrale de 6-OHDA soit directement dans la substance noire pars compacta (SNcp) soit dans le faisceau basal (MFB, medial forebrain bundle). L'injection de 6-OHDA dans la SNcp ou dans le MFB entraîne la destruction rapide et durable des neurones DA.

21 jours après la chirurgie de la 6-OHDA, un comportement de rotation induit par une lésion unilatérale peut être induit par administration d'amphétamine ou d'apomorphine afin d'estimer l'intensité de la lésion DA.

L'apomorphine, agoniste DA direct, va se fixer en post-synaptique sur les récepteurs DA, surexprimés après lésion DA afin de compenser la perte en DA, et ainsi induire des rotations du côté controlatéral à la lésion DA.

L'amphétamine, quant à elle, va agir en pré-synaptique sur les neurones DA en favorisant la libération de DA à partir des terminaisons du striatum, et induire la rotation des animaux du côté ipsilatéral à la lésion. L'amphétamine peut provoquer un comportement de rotation après une lésion DA modérée tandis que l'apomorphine induit une rotation des animaux que si la perte des neurones DA est massive.

Ce comportement rotatoire transitoire chez les animaux ayant une lésion unilatérale est pris pour index du degré de dégénérescence neuronale. Les animaux présentant le plus grand nombre de rotations seront hébergés jusqu'à 12 mois minimum après la chirurgie.

Pour chaque étude, le nombre d'animaux est défini de façon à obtenir un nombre suffisant d'animaux lésés.

Une étude standard comportera 60 rats mâles (Sprague-Dawley ou Wistar), divisés en 3 groupes :

1) un groupe contrôle sans lésion (injection d'acide ascorbique 0.02% dans NaCl 0.9%, qui est le véhicule de la 6-OHDA) dans le MFB ou SNcp (n= 15) : « Groupe SHAM »

2) un groupe avec une lésion unilatérale de 6-OHDA dans le MFB ou SNcp (n= 15) : « Groupe 6-OHDA »

3) un groupe avec une lésion unilatérale de 6-OHDA dans le MFB ou SNcp (n= 30) : « Groupe 6-OHDA + produit à testés à 2 doses »

Le nombre maximum de produits testés par an est de 10.

Le nombre total maximum d'animaux utilisées sur 5 ans est de $3\ 000 = 60 \text{ animaux/étude} \times 10 \text{ études/an} \times 5 \text{ ans}$

Bien-être animal, application des 3 R et observations cliniques :

- A ce jour, il n'existe pas de méthodes alternatives pour évaluer la maladie de Parkinson. Le recours à l'animal de laboratoire s'avère donc nécessaire pour comprendre les mécanismes sous-jacents des symptômes parkinsoniens.

- Le nombre total d'animaux utilisés pour une étude est fonction du nombre de groupes et du nombre d'animaux par groupe nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Il correspond à ce qui est classiquement utilisé en expérimentation animale.
- Les animaux seront hébergés individuellement pendant une semaine (après la chirurgie puis par 2. Les cages comporteront une litière de sciure et des enrichissements conformément aux standards réglementaire.
- Les animaux seront observés quotidiennement après la chirurgie et toutes les dispositions seront prises pour limiter un maximum l'inconfort ou la douleur des animaux en établissant des points limites appropriés. Leur état général est évalué quotidiennement selon notre grille de surveillance pour détecter des signes éventuels de douleurs. Les données issues de ce suivi individuel seront enregistrées dans un tableau définissant les points limites expérimentaux et aussitôt analysées. De ce fait, si un animal atteint à un moment donné de l'expérience, un de ces points limites définis, il sera immédiatement mis à mort.

19435 Depuis plusieurs années, la production et la consommation mondiale de volailles de chair et d'œufs ne cesse d'augmenter. La production et la consommation mondiale de viande volaille ont augmenté de 2,7 % entre 2018 et 2020 et une augmentation de 7,5% est prévue d'ici 2026. Cette croissance s'accompagne d'une modification et d'une intensification des pratiques agricoles depuis quelques années. Cette recherche de productivité s'accompagne malheureusement d'une fragilité accrue des animaux face aux infections et aux divers agents pathogènes. A ceci s'ajoute également une pression sanitaire qui croit en même temps que les élevages avicoles s'intensifient.

Parmi les agents pathogènes les plus fréquents en élevages avicoles on trouve les bactéries de genre Salmonella. La salmonellose est l'une des principales maladies d'origine alimentaire auxquelles l'industrie avicole est confrontée. C'est un problème plurifactoriel, qui a amené l'industrie à développer des programmes de prévention et de contrôle de la fourche à la fourchette. Si les efforts de la filière ont permis des réductions de la prévalence de cette zoonose, nous sommes encore loin de son éradication.

Notre projet s'insère dans une démarche de prévention. Il vise à utiliser le concept d'exclusion compétitive pour coloniser le tube digestif de poulet de chair de 1 jour et prévenir ainsi sa colonisation par les salmonelles. Pour ce faire, nous disposons de 2 flores de barrières dont nous souhaitons mesurer l'efficacité. Elles ont été mises au point en collaboration avec l'U. S. Department of Agriculture (USDA).

Cette expérimentation nécessite l'utilisation de 180 poussins de chair ROSS 308 maximum pour pouvoir caractériser l'efficacité des flores de barrière contre le portage asymptomatique de S. Typhimurium.

Réduction : Le nombre d'animaux est calculé au plus juste à l'aide d'outils statistiques garantissant une puissance de test de 80% minimum en s'appuyant sur les données de la littérature et les premières données expérimentales obtenues sur le modèle infectieux dans de précédents projets.

Remplacement : il n'existe aucune méthode alternative pour évaluer le portage asymptomatique de Salmonella Typhimurium et ne peut être évalué in fine que sur l'espèce cible.

Raffinement : il y aura un enrichissement social et de structure. Les enrichissements du milieu consisteront à mettre des petites pelotes de laine, des petites plaques métalliques suspendues à un fil et des petits perchoirs et les poulets seront hébergés au sol avec de la paille broyée. Aucun symptôme clinique n'est attendu, c'est du portage asymptomatique. Les animaux seront euthanasiés si leur état clinique ne laisse aucun doute sur leur souffrance et/ou une issue fatale. Les points limites sont : l'association d'au moins trois signes cliniques majeurs tels que : plumes ébouriffées, prostration, anorexie pendant au plus 24h, conduira de fait à l'euthanasie des animaux. Les animaux atteignant le point limite expérimental seront euthanasiés par électronarcose suivi d'une élévation cervicale en fonction de l'âge des animaux.

19436 La cirrhose hépatique est une pathologie caractérisée par une détérioration du tissu hépatique (fibrose) et une perturbation sévère des flux sanguins évoluant vers une insuffisance hépatique. La

cirrhose a classiquement été catégorisée en deux états : compensée et décompensée. Une fois que la cirrhose passe du stade compensé au stade décompensé, la survie à court terme est estimée de 3 à 5 ans, et la transplantation hépatique doit être envisagée. Si la cirrhose provient d'une cause traitable (par exemple, hépatite virale chronique, consommation continue d'alcool, obésité, etc.), les patients peuvent alors repasser d'une phase décompensée à une phase compensée.

Il y a deux catégories de décompensation aiguë : la première dite traditionnelle, dont le pronostic à court terme est bon et la seconde, est donc un syndrome fulminant appelée ACLF (acute-on-chronic liver failure), plus complexe, associée à des défaillances multiples d'organe dont le pronostic est souvent très mauvais.

Notre projet vise donc à établir un modèle qui puisse reproduire la phase aiguë qui survient lors d'un épisode d'ACLF chez le patient en situation de cirrhose décompensée, avec pour but ultime d'évaluer la capacité de molécules innovantes à atténuer la gravité de cet événement et à protéger l'organisme des défaillances multiples.

Le modèle d'induction d'atteinte hépatique qui subira le déclenchement de l'ACLF qui est retenu dans ce programme de recherche est un modèle chirurgical de ligature du canal biliaire commun (BDL pour « bile duct ligation »). La ligature constitue une obstruction du canal biliaire qui permet naturellement de déverser la bile produite par le foie dans l'intestin. L'obstruction produit une accumulation de sels biliaires dans le foie où ils sont cytotoxiques, des phénomènes de nécroses surviennent et produisent des lésions hépatique. La fibrose s'installe dans le foie de ces animaux opérés de cette manière.

Différents moyens déclenchants de l'ACLF peuvent être envisagés, notre choix se porte sur l'administration de LPS, un des ligands reconnus par les récepteurs cellulaires qui sont activés lors des infections microbiennes. Son administration produit une réponse inflammatoire et immunitaire, semblable à un épisode infectieux présent lors de l'ACLF chez les patients.

Le développement et la caractérisation de ce modèle chirurgical expérimental s'inscrit donc dans un programme plus vaste qui vise à établir un modèle qui puisse reproduire la phase aiguë qui survient lors d'un épisode d'ACLF chez le patient en situation de cirrhose décompensée.

Notre but ultime est de pouvoir évaluer la capacité de molécules innovantes à atténuer la gravité de cet événement et à protéger l'organisme des défaillances multiples.

Ce projet se décompose en deux phases.

La première consistera à implémenter au laboratoire la méthode d'induction de la pathologie chez les animaux par voie chirurgicale par obstruction des voies biliaires ainsi que la caractérisation du modèle, et aussi de proposer des alternatives aux méthodes habituelles de la gestion de la douleur. En effet nous estimons que le recours aux dispositifs implantables de diffusion continue d'agent anti-douleur permet une meilleure efficacité et une moindre gêne pour les animaux.

En effet la chirurgie réalisée dans l'abdomen de l'animal est douloureuse. Les effets perdurent au cours des jours post op alors que les animaux sont très affaiblis par l'insuffisance hépatique produite par l'occlusion des voies biliaires. Il est alors très important de mettre en œuvre tous les moyens dont on dispose pour gérer au mieux la douleur. L'utilisation des produits analgésiques tels que la buprénorphine peut être d'une grande aide mais présente l'inconvénient d'avoir une durée d'action très limitée dans le temps (environ 6 à 8 heures maxi). Dans les conditions expérimentales avec les animaux, l'organisation des suivis de soins au cours des heures qui suivent la chirurgie pose des problèmes opérationnels (injections répétées toutes les 6h). Nous envisageons donc de raffiner la méthode d'administration de la buprénorphine par la pose lors de la chirurgie (donc sans ajout d'un geste invasif supplémentaire), d'un dispositif implantable de diffusion continue de la buprénorphine : les pompes osmotiques Alzet, qui permettent de maintenir une exposition continue de l'animal à une dose constante et d'éviter les contraintes des injections répétées. Nous ferons une évaluation précise entre bénéfices apportés par la buprénorphine et les troubles que peut présenter ce modèle chez lequel l'élimination normale des produits du métabolisme de la buprénorphine se fait par la bile, ce qui devient impossible après l'intervention chirurgicale opérée chez ces rats.

Dans cette phase, un effort tout particulier est porté sur le raffinement de la procédure.

Au cours de la période post opératoire, l'anorexie et la déshydratation représentent des risques majeurs pour les animaux, pour les limiter, nous utiliserons des aliments hydratés et appétents, et si cela s'avérait nécessaire nous ferons des injections de liquide physiologique glucosé.

La seconde phase détaille les procédures expérimentales mise en place à l'aide de ce modèle de rats « Bile Duct Ligation BDL » permettant l'évaluation de l'efficacité de produits dans le contexte de la défaillance hépatique aigue.

Ces procédures d'évaluation d'efficacité des composés qui constituent ce projet seront basées sur le principe des études de survie, et seront d'une gravité sévère.

Le nombre d'animaux utilisés au cours des procédures expérimentales de la première partie de mise au point sera réduit mais suffisant pour acquérir la technique et pour évaluer la reproductibilité du modèle établi.

Dans ce projet et afin de répondre à la règle des 3 R, nous avons calculé le nombre d'animaux nécessaires pour chaque procédure pour avoir une réponse statistiquement analysable afin de réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaires dans les expériences. Les procédures utilisées se feront dans le cadre adapté d'un hébergement agréé avec des personnes habilitées, respectant au maximum le bien-être des animaux avec un enrichissement du milieu (morceaux de bois à ronger, filaments de papier kraft pour faire un nid), en limitant la souffrance par le respect des méthodes anesthésiques et analgésiques afin de raffiner au maximum les procédures.

Afin de prévenir des souffrances non nécessaires et de ne pas altérer les résultats de l'étude, des points limites seront définis, au-delà desquels les animaux seront retirés de l'étude et mis à mort de façon éthique. Compte tenu que le choc septique implique un dysfonctionnement de plusieurs organes, il nous est impossible de remplacer cette expérimentation par des expériences in vitro. Cependant, une première phase de sélection des meilleurs composés est effectuée sur des modèles acellulaires ou cellulaires, contribuant ainsi à l'utilisation de méthodes alternatives visant à remplacer partiellement l'utilisation des animaux.

Ainsi le nombre total de rats prévu est de 2060 pour une durée de 5 ans.

19437 L'élevage laitier doit actuellement répondre à des enjeux sociétaux, environnementaux et sanitaires, particulièrement prégnants pour les élevages engagés dans la production de fromage au lait cru. La mise en œuvre de pratiques agroécologiques se présente comme une des voies de renforcement des services écosystémiques rendus par les systèmes laitiers, ainsi que de leur durabilité et leur résilience. Ces pratiques modifient le fonctionnement technico-économique des exploitations, le travail qui s'y déploie ainsi que l'écologie et le fonctionnement des formes de vie co-existantes, dont dépend la production de fromages de qualité et différenciés. Elles influencent un ensemble d'écosystèmes interconnectés depuis le sol jusqu'au produit, impliquant une grande diversité d'holobiontes (biocénose prairiale, ruminant, consommateur) et de microbiotes environnementaux. Or, holobiontes et microbiotes renouvellent aujourd'hui la manière d'appréhender le statut des vivants dans le travail en élevage, questionnant la perception qu'ont les éleveurs de « ces formes de vie » et les relations et signes par lesquels ils interagissent. Dans ce contexte, l'ambition de l'expérimentation TANDEM est de caractériser les impacts de changements de pratiques agricoles en comparant des systèmes intensifs et agroécologiques, et les effets de perturbation au sein de ces systèmes.

Pour tester l'hypothèse selon laquelle l'intensification des modes d'élevage modifie à la fois le degré de transfert microbien entre les compartiments du système et la stabilité des transferts microbiens en réponse à une perturbation du système, une expérimentation de 4 mois sera mise en place pendant la saison de pâturage 2021 dans un système laitier de montagne, dont le but sera de comparer les effets de deux modes de conduite (intensif vs extensif) sur 4 lots de 10 vaches laitières (soit 40 animaux au total), et des perturbations visant à simuler un déficit fourrager esival qui seront appliquées à 2 de ces lots (1 intensif et un extensif). Le microbiote de plusieurs compartiments le long de la chaîne alimentaire sera caractérisé pendant l'expérience : sol, végétation, zones de couchage des animaux, trayons, lisier, fèces, liquide ruminal, lait et air. Des analyses à échelle fine

sont essentielles pour une compréhension mécaniste de la performance du système dans son ensemble et pour la quantification des liens dynamiques entre les compartiments du système.

Cette expérimentation sera menée dans le respect de la règle des 3R. Il n'est pas envisageable de remplacer l'utilisation de vaches laitières pour cette expérimentation. Toutefois, le nombre d'animaux est réduit (10 par lot) au maximum, de manière à obtenir des données fiables et interprétables. Enfin, les conditions de logement des animaux, notamment en stabulation, répondent aux exigences réglementaires et vont même au-delà grâce à des équipements permettant un confort optimum des vaches (matelas, brosses. . .) et un suivi fin de leur santé et de leur bien-être (outils d'élevage de précision). Il a par ailleurs été choisi de les faire pâturer la journée l'été et de ne pas les laisser en bâtiment pour des raisons de bien-être. Les procédures non-invasives ont été privilégiées, de réduire la durée de l'étude et d'appliquer les points limites établis pour réduire la douleur et l'anxiété des animaux.

19438 L'exposition au mercure est une menace mondiale pour l'homme et la faune sauvage. Des travaux récents sur les oiseaux de mer nichant en milieu insulaire en Guyane française, ont montré que la concentration de mercure dans le sang des frégates (*Fregata magnificens*) adultes et de nombreux poussins dépasse le seuil au-delà duquel des effets sur la santé individuelle apparaissent. Fait intrigant, les frégates superbes connaissent chaque année de graves épidémies d'une maladie associée à la réplication de l'herpèsvirus (FmagHV). L'objectif de ce projet est d'élucider les mécanismes par lesquels l'exposition au mercure affecte l'état physiologique des oiseaux de mer, et comment cela est associé à la sensibilité aux maladies virales. Il vise également à déterminer si l'investissement parental a un effet sur la susceptibilité aux maladies des poussins. Le projet prévoit de réaliser une expérimentation directement en nature pour réduire la toxicité du mercure. Il est fondamental de mener les expériences proposées dans la nature, car des expériences similaires sur des animaux captifs ne refléteraient pas les conditions réelles auxquelles les animaux sont exposés dans la nature. Pour obtenir ce résultat, on administrera: un puissant agent chélateur du mercure pour réduire ses effets toxiques (N-acétylcystéine); de la nourriture (quantité de poissons proportionnelle à la masse corporelle) pour limiter la contribution potentielle de la malnutrition à l'état de santé; N-acétylcystéine et poisson simultanément pour évaluer leur effet combiné (administration par prise spontanée; la NAC sera administrée sous forme de pilules, plongées dans de l'huile de poisson pour faciliter la déglutition). Avant l'expérimentation, 2 mL de sang veineux sera collectée après nettoyage et désinfection de la veine brachiale (soit < à 0. 5 et 0. 25% de leurs masses corporelles respectives, inférieur au seuil maximal de 1% par prise) par phlébotomie sur 110 poussins et 40 adultes, qui sera utilisé pour analyser les concentrations de mercure. Deux prélèvements sanguins auront lieu à 5 semaines d'intervalle pour les poussins, et à 2 mois d'intervalle pour les adultes. 4-5 plumes du ventre et du dos pour chaque oiseau seront également prélevées pour évaluer le niveau de stress (en quantifiant le corticostérone, l'hormone du stress chez les oiseaux). Les plumes qui seront prélevées à la fin de l'expérience sont les plumes qui ont grandi pendant l'expérience.

Bien que les oisillons traités puissent éprouver certaines formes de détresse en raison de la manipulation et de l'administration répétées des molécules susmentionnées, nous pensons nous être assurés que ce projet respecte au mieux les principes éthiques:

1) principe de Remplacement : une expérimentation similaire n'a jamais été réalisée auparavant et ne pourrait pas être menée sur des animaux de laboratoire;

2) principe de Réduction : le nombre d'oiseaux utilisés pour chaque groupe expérimental (20 poussins) a été réduit afin d'obtenir une puissance statistique suffisante avec le nombre minimum d'animaux utilisés.

3) principe de Compensation: Les oiseaux touchés par la maladie (estimé de 55% à 65% de la population) ont une faible probabilité de survie (moins de 10 %), ce qui réduit considérablement le succès reproducteur annuel de la population. Sans notre intervention, la plupart des oisillons tombent malades et meurent chaque année. Si les traitements expérimentaux ont les effets positifs escomptés, nous allons améliorer la croissance et accroître la survie d'une partie d'entre eux.

4) principe de Raffinement. Des études sur d'autres espèces, ainsi que notre études antérieures dans les frégates, permettent de limiter au maximum les effets secondaires (par exemple liés à la concentration à administrer ; cf. principe de Raffinement).

Enfin, de petits appareils GPS seront fixés aux adultes (20 nids, donc 20 mâles et 20 femelles) pour enregistrer les mouvements/investissement parental des animaux sur de longues périodes, et s'ils sont affectés par une exposition au mercure.

Comprendre les facteurs qui favorisent l'activité des maladies infectieuses est une priorité absolue pour la conservation de cette population.

19439 Les chats, en particulier les chatons, sont sujet à des maladies virales contagieuses et parfois graves, telle que le coryza.

Afin de les protéger, la mise au point de nouveaux vaccins est nécessaire.

Notre projet a pour objectif de choisir de nouvelles souches virales destinées à être intégrées dans des vaccins, notamment contre un des virus provoquant le coryza.

Pour cela, nous prévoyons l'utilisation maximum de 30 chats sur 5 ans, qui permettront des essais d'immunisation (production d'anticorps) contre 15 souches virales, ce qui permettra ensuite des tests de neutralisation in vitro (sans animal) contre au minimum 400 échantillons viraux différents collectés sur le terrain.

Ce projet est développé dans le respect de la règle des 3 R : la sélection des souches virales utilisées a été faite selon des critères très stricts afin d'optimiser les résultats obtenus tout en provoquant le moins de symptômes possibles chez les animaux inoculés, et ne nécessitera l'utilisation que de deux animaux par souche virale pour laquelle il est nécessaire d'obtenir un immunosérum. (REDUCTION)

L'obtention d'anticorps polyclonaux ne peut se faire qu'à partir d'un organisme complet et fonctionnel, et le recours à l'animal est donc indispensable. (REMPACEMENT)

Durant toute l'étude, les animaux seront hébergés en groupe, dans de grandes salles équipées de jeux, cachettes et perchoirs. Les actes stressants seront réalisés sous sédation ou anesthésie, ou sur animal vigile après une habituation progressive systématiquement associée à des récompenses. (RAFFINEMENT)

L'inoculation des souches virales est susceptible d'entraîner l'apparition de symptômes de la maladie chez les animaux, sous une forme légère, telle qu'une stomatite ou une infection respiratoire bénigne. Afin d'éviter de compromettre leur bien-être pendant le test, les chats seront évalués quotidiennement par du personnel qualifié, afin de vérifier leur état clinique. Si le bien-être des animaux semble compromis, des mesures correctives seront appliquées: une exploration vétérinaire sera effectuée afin de déterminer l'origine de la douleur, de la détresse ou de la souffrance et d'évaluer la nécessité d'appliquer un traitement ou de sortir l'animal de l'étude.

La finalité du projet d'obtenir des vaccins plus efficaces contre les souches virales actuellement en circulation et donc de mieux protéger les chats et chatons vaccinés.

19440 Les formations spécifiques en expérimentation animale constituent une obligation réglementaire à laquelle doivent se soumettre tous les acteurs de la recherche in vivo afin d'acquérir les outils nécessaires à la mise en place d'une démarche éthique prenant en considération la sensibilité de l'animal. Elles ont pour objectif d'initier les acteurs de la recherche aux gestes de base (en terme de contention, gavage, anesthésie, prélèvement, injection et mise à mort) tout en respectant le bien-être animal. Au cours de cet enseignement pratique, les étudiants devront appréhender sur animal vigile, les méthodes de contention, de marquage, et sur animal anesthésié les méthodes de prélèvement et d'injection les plus utilisées. Enfin, ils seront également confrontés aux méthodes de mise à mort selon la réglementation en vigueur. En terme de 3R, la réduction viendra du fait que ces enseignements pratiques seront réalisés en binôme (un animal pour deux) encadrés par des enseignants référents pour ces gestes : ces enseignants feront une démonstration et encadreront la réalisation du geste avec un tutorat de un encadrant pour 3 binômes. De plus, le nombre

d'animaux utilisés pour la démonstration a été diminué par 4 grâce à l'utilisation d'une visionneuse reliée à un vidéoprojecteur. L'objectif étant de leur montrer au mieux la réalisation de ces gestes afin de les sensibiliser aux variations expérimentales et aux biais induits par des gestes mal préparés et mal réalisés. Pour le raffinement, une gestion de l'anesthésie/analgésie et une réflexion sur l'adéquation volumétrie/méthode seront enseignées. D'autre part, l'utilisation d'animaux surnuméraires issus d'élevages de l'animalerie sera favorisée au maximum. Des animaux en peluches sont également utilisés quand cela est possible pour montrer certains gestes (par exemple les différents types de préhension du rat) dès que cela est possible. En 5 ans, 725 rats et 725 souris seront utilisés au maximum (250 étudiants maximum /an soit 1250 étudiants au maximum sur 5 ans). Le projet soumis s'inscrit dans le cadre de formations qui auront reçu un agrément du ministère de l'agriculture.

19441 1) Titre du projet : Perception sensorielle et adaptation comportementale chez le macaque

2) Durée du projet : 60 mois

3) Mots clefs : primate, adaptation, cortex cérébral, perception, neuroimagerie (max 5)

4) Finalité du projet : Recherche fondamentale

5) Objectif du projet et bénéfices escomptés du projet :

Une caractéristique de notre survie dans le monde réel est notre capacité à faire preuve d'adaptation comportementale. Les primates en général et les humains en particulier sont très efficaces pour extraire rapidement les signaux informatifs de l'environnement, de leur propre corps et de leurs actions, pour maintenir ou modifier leurs décisions. Cette capacité d'adaptation est dysfonctionnelle dans de nombreux troubles neuropsychiatriques tels que la dépression, les troubles obsessionnels compulsifs et les troubles autistiques. La littérature suggère que ces pathologies sont étroitement liées au déséquilibre fonctionnel entre deux structures cérébrales, l'amygdale et le cortex préfrontal. Bien que l'identification des fonctions respectives des structures de ce réseau fasse l'objet d'intenses recherches, ces recherches n'étudient pas leur fonctionnement intégré dans ce réseau. Ce projet vise à identifier comment le fonctionnement intégré de ce réseau produit des comportements complexes.

6) Nuisances prévues : ce projet repose sur l'utilisation de 5 macaques rhésus (*macaca mulatta*), seul modèle animal démontrant des capacités d'adaptation proche de ceux de l'humain et une homologie des structures cérébrales étudiées, et sur une combinaison unique de méthodes modérément invasives de neuroimagerie et de perturbations locales transitoires de l'activité cérébrale. Les données produites pourront permettre d'identifier le rôle causal de chaque région constituant le réseau cortex préfrontal-amygdale sur le fonctionnement intégré de ce réseau et ainsi le développement d'applications cliniques pour soulager les difficultés d'adaptation inhérentes aux troubles neuropsychiatriques cités ci-dessus. Trois des animaux inclus dans cette étude sont déjà habitués aux examens de neuroimagerie. Ce groupe sera complété par 2 animaux. Les animaux seront soumis à la pose d'un implant crânien pour limiter les mouvements qui rendent impossible l'examen du cerveau par neuroimagerie. Des perturbations transitoires de l'activité cérébrale seront pratiquées par l'application de faibles neurostimulations ultrasonores transcrâniennes (méthode non-invasive) et/ou par injections d'agents pharmacologiques (après réalisation d'une craniotomie). Cette procédure est classée comme modérée. A l'issue de la procédure, l'implant est retiré. Il n'y aura que peu de séquelles hormis la craniotomie sous la peau et une cicatrice. Les animaux seront soit réutilisés s'ils ne sont pas trop âgés, soit proposés au placement dans des structures capables d'accueillir la faune sauvage.

7) Application de la règle des «trois R» :

(1) Remplacement. Dans notre cas, le remplacement des macaques par d'autres espèces vertébrées ou non vertébrées, voire par de plus petites espèces de primates n'est pas encore possible. Bien que des équivalents des méthodes expérimentales modérément invasives utilisées dans le projet existent pour les humains, elles ne sont pas applicables à des volontaires sains. Elles sont réservées chez l'homme à certains cas graves de maladie neurologique résistants aux traitements pharmacologiques comme la maladie de Parkinson ou l'épilepsie.

2) Réduction. La taille estimée de la cohorte pour cette étude a été définie par une analyse de puissance afin d'utiliser le moins d'animaux possible pour obtenir des résultats significatifs et généralisables. Le recours à l'imagerie permet de diminuer le nombre total d'animaux en comparant chaque animal à lui-même. Les données de neuroimagerie collectées sont mises à la disposition de la communauté internationale afin de réduire le nombre de macaques utilisés dans le monde en permettant à d'autres scientifiques d'exploiter les données sans nouvelle expérimentation chez l'animal.

(3) Raffinement. Chaque animal reçoit un long pré-entraînement par renforcement positif pour l'habituer à la vie au laboratoire (nettoyage des volières, pesées régulières, etc.). Pendant l'expérience, plusieurs éléments de raffinement sont mis en œuvre pour diminuer le stress en permettant à l'animal d'anticiper ses activités. Par exemple, s'il doit participer à une expérience dans la journée, l'animal est prévenu le matin par un signal sur sa volière (une balle de couleur contenant des friandises) et une jauge est affichée sur un écran tout au long de la session de travail pour l'informer de sa progression vers la fin de la session. Un raffinement continu est également pratiqué pour développer des implants moins invasifs et moins sensibles aux infections, réalisés sur mesure pour chaque animal.

19442 La dopathérapie permet pendant des années de traiter les symptômes de la maladie de Parkinson : l'administration au patient de L-DOPA, un précurseur de la dopamine, permet de compenser la perte graduelle des neurones dopaminergiques. Mais progressivement, la prise de L-DOPA induit des mouvements involontaires appelés dyskinésies, qui, à terme, obligent les patients à arrêter le traitement. Ces dyskinésies résultent de l'activité excessive d'une partie des neurones du striatum, qui deviennent hyperactifs lors du traitement par la L-DOPA : au fil du traitement, ces neurones deviennent de plus en plus susceptibles de s'activer. En utilisant une méthode d'imagerie qui permet d'enregistrer les neurones de souris rendues parkinsoniennes, nous avons identifié un mécanisme par lequel nous pourrions modérer spécifiquement l'activité excessive de ces neurones, sans pour autant supprimer les effets bénéfiques de la L-DOPA. Nous souhaitons analyser ce nouveau mécanisme d'action et le valider sur des souris, de manière à motiver la création d'un nouveau médicament basé sur ce principe chez l'Homme. A terme, nous espérons que ce nouveau médicament, administré en même temps que la L-DOPA, maintiendra plus longtemps l'efficacité de la L-DOPA sans subir les effets indésirables de cette thérapie.

L'étude de ce nouveau mécanisme d'action se fera sur des souris rendues hémi-parkinsoniennes puis dyskinétiques en respectant la règle des 3R : remplacer, réduire, raffiner. Du point de vue du remplacement, nous effectuons une large part de notre expérimentation par une approche d'imagerie cellulaire combinée à la modélisation numérique des phénomènes cellulaires étudiés. Il reste cependant à démontrer la pertinence de notre hypothèse thérapeutique, et c'est ce que nous devons faire in vivo, sur un nombre aussi limité que possible de souris. A noter qu'une partie des souris utilisées pour la validation in vivo servira également pour l'imagerie cellulaire. Ce modèle de souris est un modèle animal très bien connu et utilisé dans de nombreuses études sur la maladie de Parkinson et les dyskinésies associées au traitement à la L-DOPA. Ce modèle permet notamment d'obtenir des résultats transposables à l'être humain et constitue donc, dans notre cas, une étape importante dans le développement d'un nouveau médicament. Nous utiliserons un total de 100 souris : nous travaillerons avec 4 groupes de 20 souris chacun afin d'obtenir des résultats avec une puissance statistique suffisante, et 20 souris seront utilisées pour la mise au point du protocole expérimental. Nous avons optimisé la méthode d'imagerie afin de pouvoir effectuer plusieurs enregistrements à partir d'une même souris et donc ainsi de réduire le nombre de souris utilisées (réduire). Enfin, nous veillerons à la réduction de la douleur des animaux (raffinement). Nous souhaitons obtenir un modèle hémi-parkinsonien (plutôt que parkinsonien) afin de réduire le taux de mortalité ainsi que la souffrance de l'animal. Lors de l'obtention du modèle de souris hémi-parkinsonienne et dyskinétique par chirurgie, nous utiliserons des analgésiques et anesthésiants afin de prévenir la douleur pendant et après l'opération. Un suivi quotidien sera effectué : toute souris présentant des signes de douleur sera considérée et mise à l'écart de l'étude le temps nécessaire pour soulager cette douleur (utilisation d'anti-inflammatoires non stéroïdien).

19443 Le sepsis est un syndrome inflammatoire systémique causé par l'activation incontrôlée des voies inflammatoires et de la coagulation. Cet état peut être provoqué par une infection ou un traumatisme. Le sepsis est la première cause de mortalité dans les unités de soins intensifs, avec une prévalence élevée dans les pays développés (3 cas pour 1000 personnes). Malgré une antibiothérapie adéquate et l'utilisation de traitements lourds, le pronostic vital des patients atteints de ce syndrome n'a été que marginalement amélioré au cours de ces dernières années. Rien qu'aux Etats- Unis, le sepsis cause la mort d'un demi-million de personnes. La complexité de la pathologie explique l'échec de plus de 30 essais cliniques de phase III.

La destruction des globules rouges, appelée hémolyse, peut survenir précocement et massivement dans différents contextes pathologiques tels que dans le sepsis. Le contenu de la cellule, notamment l'hémoglobine (Hb), se déverse alors dans la circulation sanguine. L'Hb assure le transport de l'oxygène au sein de l'organisme. Elle contient 4 noyaux d'hème qui, en cas d'hémolyse, se retrouvent libres et peuvent réagir avec d'autres éléments circulants ou certains récepteurs cellulaires. L'activation produite par leur rencontre entraîne une réponse cytotoxique, pro-inflammatoire et pro-oxydante, dont les acteurs et les mécanismes sont encore mal déterminés. Les anticorps (Acs), protéines du système immunitaire, sont capables d'interagir avec l'hème. Au contact de l'hème, une fraction des Ac a la capacité de devenir polyréactif et reconnaître de nouveaux Ag. L'acquisition de cette polyspécificité a pu être démontrée in vitro. Les anticorps (Ac) jouent un rôle important dans la défense contre les agents pathogènes. Cette liaison leur permet d'accroître leur potentiel de reconnaissance antigénique. Il est intéressant de noter que l'augmentation de la capacité de liaison des Ac aux antigènes corrèle avec l'acquisition d'un fort potentiel anti-inflammatoire. Les anticorps sont en effet bien connus pour leur capacité à réguler la réponse immunitaire. La signification biologique des Ac ayant la capacité de lier des molécules n'est pas bien élucidée. Fait important, le relargage extracellulaire de certaines molécules pro-inflammatoires se produit uniquement à la suite d'états pathologiques accompagnés par une lésion cellulaire / tissulaire étendue et une inflammation sévère. Il a été démontré que ces molécules, lorsqu'elles sont libérées, ont un potentiel pro-inflammatoire puissant et exacerbent l'inflammation, ce qui contribue à des pathologies, telles que le sepsis. Des études récentes ont montré que certaines molécules pro-inflammatoires jouent un rôle important dans la pathogénèse du sepsis sévère. Nous émettons l'hypothèse que la présence des anticorps étant capable de se lier à l'hème en devenant polyréactif puisse réduire son impact négatif sur la survie. Nos données préliminaires in vitro, sur des cellules immunitaires humaines, montrent que certains Ac ont un effet anti-inflammatoire et peuvent neutraliser des molécules médiatrices de l'inflammation. Le modèle animal le plus fiable et le plus pertinent du sepsis est la septicémie polymicrobienne induite par ligature et ponction cœcale (cecal ligation and puncture – CLP) chez la souris. Ce modèle a été utilisé pendant plus de 30 ans et a contribué à générer une masse considérable d'informations sur les mécanismes pathologiques de la septicémie. Le modèle a également été utilisé comme test pré-clinique essentiel pour l'évaluation de nouvelles thérapies de sepsis sévère.

Conformément à la directive 2010/63/UE et des arrêtés du 1er février 2013, les expériences sont planifiées en accord avec la règle des 3R :

Remplacement : Les expériences menées in vitro nous ont permis de remplacer dans un premier temps le modèle animal. Le projet fera appel à différents modèles expérimentaux chez la souris. En effet, seule une approche expérimentale in vivo permet de rendre compte de la complexité des systèmes biologiques. Toutefois, toute information obtenue par l'expérimentation animale sera immédiatement transposée à des systèmes in vitro pour analyses ultérieures.

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

Raffinement : les souris seront hébergées en accord avec les lois d'éthique françaises. Les animaux seront contrôlés quotidiennement pour évaluer et réduire au maximum tout risque de douleur. En cas de douleur constatée comme une léthargie, un repli sur soi, les poils hérissés, une posture

voutée ou un isolement, les souris seront euthanasiées afin d'éviter toute forme de douleur supplémentaire. Les animaux auront un traitement antalgique afin de limiter au maximum toute forme de souffrance et seront anesthésiés pendant la procédure expérimentale. Les conditions de vie seront améliorées au maximum (5 souris maximum par cage, ajout de nids végétaux et de tunnels en carton).

Pour ce projet de 5 ans, nous aurons besoin de 270 souris. Un criblage in vitro a déjà été réalisé pour la sélection des souris exprimant différents types d'Ac. Ceci correspond au nombre minimal d'animaux qui nous permettra d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. L'ensemble des procédures a été mis au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification et de tunnels en cartons).

19444 L'importance de l'infarctus du myocarde et ses conséquences en termes d'insuffisance cardiaque et de mortalité cardio-vasculaire en font un problème de santé publique majeur dans les pays développés.

La taille de l'infarctus est le facteur majeur du pronostic après infarctus du myocarde aigu. Les interventions visant à réduire la taille finale de la lésion ont donc un intérêt clinique majeur pour améliorer le pronostic des patients pris en charge pour infarctus du myocarde. La prise en charge actuelle de l'infarctus du myocarde vise à ré-alimenter le cœur en sang oxygéné (reperfusion) le plus rapidement possible. Cependant des études expérimentales et cliniques ont montré qu'une reperfusion brutale a trop souvent des effets secondaires sur le myocarde ischémique, induisant des lésions supplémentaires. Ces dommages survenant après reperfusion peuvent participer jusqu'à 40% de la taille finale de l'infarctus.

Dans ce contexte, l'objectif du projet de recherche est de 1) proposer et valider de nouvelles méthodes d'imagerie pour explorer le retentissement de l'infarctus du myocarde au niveau du cœur, notamment au niveau inflammatoire 2) préconiser une chronologie d'exploration post-infarctus et des protocoles d'imagerie optimisés.

Les procédures actuelles de prise en charge des patients atteints d'un infarctus du myocarde, n'utilisent pas d'imagerie IRM. Il est donc impossible par une étude clinique, même rétrospective, de pouvoir évaluer l'imagerie de mise en place de l'infarctus. Aucune approche ne permet actuellement d'étudier en temps réel l'infarctus du myocarde.

En effet, nous avons besoin de comprendre comment l'état inflammatoire du cœur, au moment de la thérapie, peut influencer les résultats thérapeutiques eux-mêmes. Les mesures quantitatives dérivées de l'imagerie (importance de l'œdème, taille de l'infarctus, lien entre les deux etc...) semblent être la piste la plus prometteuse, répétable et directement applicable aux patients car non invasive. Cependant cette hypothèse doit être validée par l'exploration expérimentale de l'infarctus sur un modèle animal le plus proche de l'Homme : le Porc. L'étude préalable dans l'ancien EU sur porc fermier, permet un raffinement supplémentaire par un changement de modèle dans l'espèce porc.

L'étape expérimentale sur modèle porcin et préalable à toute étude clinique ultérieure est cruciale. Elle permettra de suivre chronologiquement la mise en place de la lésion ischémique, puis l'effet de la reperfusion. Cette phase aiguë de la maladie n'est pas explorable chez l'homme compte tenu de l'urgence à reperfusion, ce qui est actuellement la prise en charge classique.

Ce protocole nécessite la mise en place d'un modèle expérimental à thorax ouvert avec un maximum de 30 porcs. Il sera réalisé sur animaux profondément endormis, sous anesthésie générale. Une prise en charge de la douleur due à la chirurgie est prévue. A l'issue de ce protocole l'animal est euthanasié sans réveil.

Après expérimentation, du matériel biologique (organes, tissus) pourra être prélevé. Ces prélèvements pourront éventuellement servir pour les besoins d'autres études non liées à ce protocole, sans utiliser d'animaux supplémentaires.

Les porcs sont hébergés dans les conditions adaptées à leur espèce, logés sur copeaux, en groupe sociaux, avec jeux à leur disposition. Un suivi quotidien leur est apporté. Un vétérinaire assure le suivi sanitaire.

19445 Aujourd'hui, les œufs à couver (qui vont donner des poussins) sont mis en incubation et les poussins éclosent au couvoir dans des enceintes qui permettent de répondre aux mieux aux besoins thermiques des embryons et des poussins. Ensuite les poussins sont triés, parfois sexés, vaccinés, transportés et ces étapes durent de très nombreuses heures avant de rejoindre le poulailler où ils pourront s'alimenter et s'abreuver. Une nouvelle stratégie, plus respectueuse du bien-être animal, commence à émerger. Son principe est de transporter les œufs embryonnés 3 jours avant éclosion. Les poussins naissent à l'élevage, sans intervention humaine et, dès leur éclosion, ils ont accès à l'eau et l'aliment. Seulement, l'éclosion à la ferme n'est pas si simple à mettre en œuvre.

L'enjeu de ce projet est donc de trouver un système de chauffage qui permet d'obtenir à l'élevage, une température de surface de coquille homogène sur tous les œufs, à coût abordable et facile à mettre en œuvre.

Enfin, pour des contraintes logistiques, les œufs inséminés sont en principe stockés durant plusieurs jours à leur arrivée au couvoir avant d'être placés en incubateurs. Sur le terrain, ce laps de temps peut s'étendre de 0 à plus de 20 jours. Le stockage long est souvent plus risqué (mortalité embryonnaire supérieure ainsi que taux d'éclosion et qualité des poussins dégradés).

Aussi cet essai testera :

- l'effet de deux systèmes de chauffage (radiant et aérotherme) disponibles en élevage sur les performances d'éclosion. L'éclosion en couvoir sera réalisée en parallèle et servira de témoin (pratique actuelle).
- l'efficacité de chaque dispositif de chauffage dans une situation favorable (œufs embryonnés stockés 5j avant incubation) et dans une situation plus délicate (œufs embryonnés stockés 15j avant incubation)

Cet essai évaluera l'impact croisé des 3 conditions d'éclosion et de la durée de stockage des œufs, sur la santé et le bien-être des poussins et des poulets, notamment évalués grâce à des marqueurs sanguins, leur performance de croissance et les consommations en énergie. Dans ce projet, 192 poulets domestiques seront élevés.

Règle des 3R :

- Remplacement : nous ne pouvons pas remplacer ce modèle. Le recours aux animaux vivants est nécessaire pour évaluer objectivement et techniquement l'éclosion en conditions d'élevage afin de pouvoir le mettre en œuvre ultérieurement en ferme.
- Réduction : l'effectif des animaux est réduit à son maximum (n=192). Il reste cependant nécessaire pour évaluer 6 modalités expérimentales (3 conditions d'éclosion (radiant, aérotherme, couvoir) x 2 durées de stockage des œufs à couver) et en tirer des conclusions significatives. Ces effectifs ont été définis à l'aide de la formule de Cochran (avec un risque de 5% et une puissance de 80%), et ajustés pour intégrer les risques liés à la procédure expérimentale.
- Raffinement : Les conditions d'élevage des animaux se rapprochent de celles d'un élevage avicole standard. Pour améliorer leur bien-être, les animaux seront élevés au sol sur des copeaux, en groupe afin de créer des relations sociales. Ils seront hébergés dans des parquets de 3 m² selon les normes réglementaires définies par l'arrêté du 28 juin 2010 établissant les normes minimales relatives à la protection des poulets destinés à la production de viande et dans des conditions optimales d'alimentation et de soins.

Des points limites sont déterminés et durant la phase d'élevage, une grille d'évaluation du bien-être des poulets sera complétée quotidiennement par le personnel animalier et permettra de détecter précocement toute altération de leur état de santé ou de leur comportement. Enfin, la surveillance du bon déroulement de l'éclosion sera renforcée à raison de 4 vérifications par jour.

19446 Malgré le développement récent de stratégies de traitements alternatives (immunothérapies, hormonothérapies), les chimiothérapies anticancéreuses restent encore incontournables dans le traitement de nombreux cancers. Malheureusement, la plupart des molécules anticancéreuses sont neurotoxiques, c'est-à-dire qu'elles causent des lésions nerveuses qui se manifestent pour les patients par des sensations déplaisantes aux extrémités des membres, des hypersensibilités au chaud ou au froid et des douleurs spontanées. Ces effets secondaires altèrent la qualité de vie et peuvent conduire à la diminution des doses ou à l'interruption des traitements anti-cancéreux. La prise en charge de ces douleurs repose sur les antidouleurs classiques, à savoir les opioïdes, qui sont utilisés pour les douleurs sévères et sont eux-mêmes associés à des effets secondaires importants; et les antidépresseurs et antiépileptiques utilisés pour le traitement de la douleur mais ayant une efficacité limitée. Une seule molécule est actuellement indiquée pour le traitement spécifique des douleurs neuropathiques chimioinduites (la duloxétine) et aucune n'a été développée pour traiter spécifiquement ce type de douleurs. L'objectif de ce projet est de développer 2 modèles de douleurs chez la souris, chacun causé par un anticancéreux différent, pour permettre de tester des candidats médicaments analgésiques susceptibles de soulager efficacement les douleurs des patients. Nos activités s'inscrivent dans le respect de la règle des « 3R » pour l'expérimentation animale. Les possibilités de remplacement par substitution complète de l'expérimentation animale sont encore limitées dans le domaine de l'étude de la douleur, mais nous les mettons en place dès qu'elles sont scientifiquement validées. Notre activité permet de raffiner les modèles *in vivo* en se rapprochant au mieux des situations cliniques (induction de pathologies, mesures des composantes multiples de la douleur). Un soin particulier est apporté à la réduction de la souffrance et du stress des animaux au strict nécessaire et à l'amélioration de leur bien-être (enrichissement et paramètres environnementaux contrôlés tout au long de l'étude). Des points limites, précoces et spécifiques pour chaque protocole d'étude sont définis et résumés en un arbre décisionnel qui conduit si nécessaire à l'interruption des expérimentations si les critères d'arrêts sont atteints. Enfin, pour chaque étude, le nombre d'animaux utilisés est réduit à un minimum acceptable pour l'obtention d'informations robustes et statistiquement pertinentes. Le nombre maximum d'animaux utilisés pour ce projet est estimé à 1584 souris sur 3 années.

19447 Les maladies neurodégénératives liées à la protéine PRION représentent un réel problème à la fois en santé animale et en santé humaine. En élevage, elles sont responsables de la tremblante chez les ovins, la scrapie chez les caprins, ou la vache folle ou ESB (Encéphalopathie Spongiforme Bovine) chez les bovins. Les animaux atteints présentent des symptômes sévères et il n'existe aucun traitement. En santé humaine, il a été démontré un franchissement de la barrière d'espèce de l'agent pathogène PRION, au moins de l'espèce bovine vers l'espèce humaine. Cet agent pathogène PRION est unique, c'est un repliement anormal de la protéine PRION endogène (codée par le gène PRNP) qui porte la pathogénicité. Mal repliée, la protéine PRION s'accumule dans le cerveau et entraîne la neurodégénérescence.

Depuis les années 1990, période pendant laquelle la crise de la vache folle a considérablement fait évoluer nos connaissances et nos approches concernant ces maladies, une sélection accrue de variants (versions possibles d'un même gène) de moindre sensibilité, dits de résistance, du gène PRNP a été menée dans les espèces ovines et caprines (un variant de résistance code une version de la protéine PRION qui limite, sans abolir, la virulence de la protéine). Si cette sélection a porté ses fruits dans l'espèce ovine où plusieurs allèles de résistance sont présents, il n'en est pas de même dans l'espèce caprine où les rares allèles de résistance sont minoritaires dans la population. Une solution alternative et radicale pour éviter l'apparition des maladies à PRION consiste à sélectionner des animaux dépourvus de cette protéine PRION, suite à des mutations du gène PRNP conduisant à un arrêt de production de cette protéine par l'organisme mutant.

Une mutation naturelle du gène PRNP est survenue dans la population caprine norvégienne où elle a été décrite pour la première fois en 2012. Cette mutation fait disparaître la protéine PRION chez les animaux porteurs des deux copies mutantes du gène (animaux homozygotes PRNP^{-/-}). Depuis 2012, une équipe de chercheurs norvégiens caractérise cette mutation et les effets de l'absence de la protéine PRION dans la population caprine norvégienne. Parmi leurs résultats les plus

significatifs, ils ont pu montrer que les animaux dépourvus de la protéine PRION (i) sont résistants aux Prions ; (ii) ont une immunité différente de celle des animaux possédant la protéine ; et, (iii) présentent une dégénérescence accrue des fibres nerveuses au cours du vieillissement.

Le projet que nous proposons est inscrit dans un projet européen qui débutera en Juin 2021. Dans ce vaste projet visant à améliorer la sélection génétique des ruminants, il est prévu de comparer (via un exemple pratique, objet de la présente demande) l'efficacité de l'introduction d'un caractère (l'absence de protéine PRION) par deux voies différentes. L'une utilise la technique d'élevage classique (nommée : introgression) de croisements entre deux races de chèvre : celle possédant le caractère (Norvégienne = race donneuse), vers l'autre ne le possédant pas (Alpine = race receveuse). L'autre voie va utiliser les nouvelles technologies de modifications ciblées des génomes (« genome editing », GE) afin de reproduire la même mutation « Norvégienne » directement dans le génome des chèvres de race Alpine. La technique d'introgression se déroule sur plusieurs années (minimum 5) afin d'éliminer, du génome de la race receveuse (Alpine), les parties non désirées du génome de la race donneuse (Norvégienne) ; c'est-à-dire tout le génome sauf la mutation ceci afin de préserver au maximum les autres caractères de la race receveuse. En réalité cela n'arrive jamais puisqu'au moins les parties adjacentes du génome de la race donneuse (régions génétiquement liées à la mutation) resteront dans le génome de la race receveuse. La technique de GE permet, au contraire de la technique d'introgression, de reproduire la mutation désirée, et elle seule, dans le génome de la race « cible » (Alpine) en seulement une ou deux générations. La copie par GE de la mutation « Norvégienne » en race Alpine fait l'objet de la présente demande. La copie par GE est réalisée dans l'embryon au stade unicellulaire par coupure de l'ADN de la région ciblée à l'aide des outils CrispR/Cas9.

Pour ce projet, il est impossible de remplacer les animaux pour étudier les effets de la perte d'un gène. En effet, un gène peut intervenir dans plusieurs fonctions biologiques et il est impossible de reconstituer simultanément in vitro ces multiples fonctions. Nous utiliserons un maximum de 110 chèvres dont le devenir était la réforme (fin de protocoles de sélection génétique). Dix expériences indépendantes de GE sont envisagées (contractualisées dans le projet européen). Chaque expérience nécessitera la mobilisation de 11 chèvres (5 donneuses d'œufs et 6 receveuses d'embryons). Ces chiffres ont été optimisés à la baisse en fonction de notre expérience acquise précédemment dans différents projets similaires. A partir du moment où 4 chevreaux porteurs de la mutation du gène PRNP (animaux F0=Fondateurs) sont obtenus, les essais s'arrêtent et les expériences suivantes sont annulées. Il est donc probable que ce projet engage beaucoup moins d'animaux que les 110 annoncés. De plus, nous avons choisi de travailler uniquement en automne qui correspond à la saison sexuelle des caprins, et ceci afin d'optimiser les résultats et donc de réduire le nombre d'animaux utilisés. Lors du transfert chirurgical des embryons, par coelioscopie, chez les chèvres receveuses, nous limiterons au maximum l'inconfort des animaux, en réalisant les interventions sous anesthésie générale précédée d'une analgésie adaptée et d'une antalgie post-opératoire. Les femelles receveuses seront hébergées dans un bâtiment conditionné et agrémenté pour accueillir des animaux génétiquement modifiés. Les animaux seront hébergés par lot d'une dizaine pour favoriser les relations sociales. Ils auront accès à l'eau et à du fourrage sec sans limitation. Un enrichissement du milieu sera proposé. Une surveillance quotidienne des animaux sera effectuée par les responsables du bien-être animal. Si un animal devait présenter des signes de douleur, de stress ou d'inconfort, comme une prostration, une absence de déplacement après une stimulation physique ou tout autre critère défini comme point limite, nous solliciterions le vétérinaire référent pour trouver une solution. Si aucune solution n'était envisageable, l'animal serait euthanasié.

19448 Les traumatismes de la cornée sont un problème de santé majeur dans le monde et un des principaux motifs de consultation aux urgences ophtalmiques. Les opacités cornéennes sont la quatrième cause de cécité dans le monde. La cornée est le tissu transparent en avant de l'oeil finement structuré en trois couches (nommées épithélium, stroma et endothélium) qui en garantissent la transparence, élément crucial pour notre vision.

La transparence de la cornée est altérée lors d'une lésion qui peut avoir des origines multiples : infections, traumatismes physique ou chimique, greffes de cornée, complications de chirurgie réfractive au laser pour corriger les défauts de la vision (myopie, hypermétropie, astigmatisme...) ou dystrophies cornéennes (maladies héréditaires entraînant des malformations de la cornée). L'atteinte des différentes couches de la cornée peut aboutir à des réactions cicatricielles entraînant des opacités cornéennes permanentes.

Malheureusement peu de traitements sont efficaces pour améliorer la cicatrisation en luttant contre l'apparition de la fibrose.

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

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

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

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

Pour ce projet d'une durée de 5 ans, un maximum de 3625 lapins et 3650 rats sur 5 ans, mâles ou femelles, sera inclus dans les études. Les animaux sont de jeunes adultes âgés de 2 à 3 mois pour les lapins et 6 à 10 semaines pour les rats à l'arrivée dans notre animalerie.

Afin de respecter la règle des 3R :

- Réduction : le nombre d'animaux par groupe est limité pour cependant rester adapté à l'analyse des résultats par tests statistiques afin de permettre de conclure sur l'efficacité ou non d'un traitement. Des évaluations non invasives de la pathologie sont utilisées tout au long de l'étude pour éviter la mise à mort de l'animal.

- Raffinement : un suivi quotidien des animaux sera effectué afin de minimiser au maximum l'impact sur le bien-être des animaux. Des points limites adaptés, suffisamment prédictifs et précoces permettent de limiter une éventuelle douleur à son minimum. Les animaux sont hébergés dans des cages contenant un enrichissement adapté à l'espèce pour améliorer le bien-être de l'animal. Les examens non invasifs pour évaluer la pathologie sont semblables à ceux pratiqués chez l'homme en cabinet ophtalmologique ou en cabinet vétérinaire. Les examens de l'œil qui requièrent un immobilisme de l'animal pourront être réalisés sous anesthésie pour son confort. Ce projet a été soumis pour évaluation à un comité d'éthique et sera suivi par la structure en charge du bien-être animal de l'établissement.

- Remplacement : à ce jour, aucune méthode alternative ne permet de mimer l'œil dans son environnement et dans sa globalité fonctionnelle. En effet, l'œil est composé de différents tissus de physiologie différente soumis aux variations environnementales, aux interactions des tissus et organes voisins. Le projet nécessitera donc d'avoir recours à des animaux compte tenu des particularités de l'organe concerné par le projet et l'absence de méthode alternative.

19449 La destruction des globules rouges, appelée hémolyse, peut survenir précocement et massivement dans un contexte pathologique, tel que dans la drépanocytose ou dans le paludisme. Le contenu de la cellule, notamment l'hémoglobine (Hb), se déverse alors dans la circulation sanguine. L'Hb assure le transport de l'oxygène au sein de l'organisme. Elle contient 4 noyaux d'hème qui, en cas d'hémolyse, se retrouvent libres et peuvent réagir avec d'autres éléments circulants ou certains récepteurs cellulaires, à l'origine de mécanismes pro-inflammatoires et pro-oxydants, potentiellement délétères pour l'organisme.

Les anticorps (Acs), protéines du système immunitaire, sont capables d'interagir avec l'hème. La majorité des Acs sont monoclonaux : ils reconnaissent de manière spécifique un motif appelé antigène (Ag). Le complexe Ac-Ag formé est reconnu par des cellules immunes, permettant la neutralisation des agents pathogènes. Cependant, au contact de l'hème, l'Ac peut devenir poly-réactif et reconnaître un panel d'Ags, potentiellement portés par nos propres cellules. L'acquisition de cette nouvelle poly-spécificité a pu être démontrée à partir d'échantillons de sang de patients atteints de drépanocytose. Elle pourrait jouer un rôle dans la dégradation de la fonction de certains organes, notamment le rein.

En effet, en situation d'hémolyse, la fonction rénale est particulièrement atteinte, et on peut retrouver des dépôts d'Acs à la surface des glomérules. De ce fait, l'objectif du projet est de déterminer à partir de modèles animaux reproduisant un contexte hémolytique si ces dépôts sont bien favorisés par l'hémolyse et s'ils sont à l'origine des lésions provoquant l'insuffisance rénale.

La présence de ces Acs au niveau rénal en contexte hémolytique (provoquée par injection de phénylhydrazine (PHZ) - un agent chimique hémolytique), a déjà été rapportée dans un modèle normal C57Bl6. Le rôle des anticorps se liant à l'hème dans le cadre de ce modèle sera étudié. En effet, l'analyse de ces anticorps poly-réactifs en présence d'hème pourraient présenter deux effets, le premier étant le blocage des effets néfastes liés à la libération de l'hème et le second, l'induction de poly-réactivité induisant la formation de complexes immuns. L'utilisation d'un organisme vivant complet est nécessaire pour évaluer l'impact de la poly-réactivité induite des Acs.

L'hémolyse constitue un facteur commun à un large panel de maladies ; la compréhension des mécanismes mis en jeu ici nous permettrait d'apporter des moyens préventifs et curatifs des lésions organiques secondaires, notamment rénales. L'extension de ce domaine de connaissance pourrait permettre l'émergence de nouvelles cibles thérapeutiques.

Conformément à la directive 2010/63/UE et des arrêtés du 1er février 2013, les expériences sont planifiées en accord avec la règle des 3R :

Remplacement : Les expériences menées in vitro nous ont permis de remplacer dans un premier temps le modèle animal. Le projet fera appel à différents modèles expérimentaux chez la souris. En effet, seule une approche expérimentale in vivo permet de rendre compte de la complexité des systèmes biologiques. Toutefois, toute information obtenue par l'expérimentation animale sera immédiatement transposée à des systèmes in vitro pour analyses ultérieures.

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

Raffinement : les souris seront hébergées en accord avec les lois d'éthique françaises. Les animaux seront contrôlés quotidiennement pour évaluer et réduire au maximum tout risque de douleur. En cas de douleur constatée comme une léthargie, un repli sur soi, les poils hérissés, une posture voutée ou un isolement, les souris seront euthanasiées afin d'éviter toute forme de douleur supplémentaire. Les animaux auront un traitement antalgique afin de limiter au maximum toute forme de souffrance et seront anesthésiés pendant la procédure expérimentale. Les conditions de vie seront améliorées au maximum (5 souris maximum par cage, ajout de nids végétaux et de tunnels en carton).

Cependant, afin de valider notre hypothèse et prouver l'efficacité de ces molécules dans nos conditions pathologiques, le nombre requis de souris est de 300.

19450 Un des domaines d'expertise de notre unité de service est centré sur la génétique, l'hébergement et la maintenance de lignées des souris au sein de nos animaleries à statut SOPF (Specific and Opportunistic Pathogen Free) et de sécurité biologique de niveau 2 (A2), permettant la caractérisation et l'étude fonctionnelle des populations du système immunitaire murin en conditions normales, inflammatoires, infectieuses ou cancéreuses. En tant que prestataire de services, nous réalisons ces études pour des laboratoires partenaires publics ou privés.

L'étude des pathologies humaines est souvent limitée par l'absence de modèle animal approprié. La souris est le modèle le plus fréquemment utilisé dans le cadre de ces études. Ces vingt dernières années, la greffe de cellules progénitrices ou de tissus humains chez des souris immunodéficientes a permis de générer des souris dites humanisées. Le qualificatif « humanisées » convient davantage aux souris greffées avec des cellules ou tissus humains. Seules des souris immunodéficientes se prêtent à la reconstitution d'un système hématolymphoïde humain et sont capables de générer des réponses immunitaires innées et adaptatives humaines. La réussite de la prise de greffe des cellules humaines transplantées chez ces souris - et, dans le cas dont il est question ici, de cellules progénitrices hématopoïétiques (CPH) humaines - est conditionnée par l'absence de lymphocytes T et B murins, mais surtout par celle des cellules murines natural killer (NK). L'efficacité de la greffe de ces CPH autorise la mise en place et le développement d'un système immunitaire humain fonctionnel avec une thymopoïèse humaine active. Celle-ci se développe dans le rudiment thymique murin qui est colonisé par des cellules humaines produites de novo dans la moelle osseuse des souris. Il faut noter que les thymocytes humains sont éduqués principalement contre le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) murin avant leur maturation en lymphocytes T. Puis ils sortent du thymus pour coloniser les organes lymphoïdes secondaires. Deux à trois mois plus tard, des lymphocytes T et B humains sont détectés dans le sang périphérique, la moelle osseuse, la rate et les ganglions lymphatiques.

Cependant, la reconstitution de système immunitaire humain dans les animaux immuno-déficients peut induire un phénotype dommageable. La conséquence de ce phénotype peut se manifester par la perte de poids, une posture pâle et voûtée, un pelage rugueux, une léthargie, une perte de poils, signes de la réaction du greffon contre l'hôte. Pour ces raisons, les souris seront observées quotidiennement par les zootechniciens formés et qualifiés sur les points limites préalablement établis. Étant donné que nous étudions la réponse immunitaire et la reconstitution de système immunitaire humain aucun anti-inflammatoire ne pourra être administré aux souris. En effet, ces molécules pourraient interférer avec nos résultats et masquer l'expression des marqueurs d'intérêt. La douleur des animaux sera prise en compte en mettant en place une surveillance accrue par du personnel qualifié et un suivi rigoureux des animaux à l'aide d'une grille de score et d'un suivi pondéral. L'utilisation d'une feuille d'observation clinique permettra de définir les actions à mettre en œuvre aux premiers signes de souffrance et/ou de détresse chez les souris humanisées. Toutes les observations seront enregistrées dans le système de gestion informatisé du laboratoire. En fonction de la grille de scores établie, tous les animaux hors critères (moins de 5%) seront euthanasiés selon une procédure éthique.

Bien que ces modèles demandent encore à être améliorés, ils ont permis de reproduire chez la souris certains aspects des pathologies humaines et laissent ainsi espérer le développement dans un futur proche de thérapies innovantes.

L'objectif de ce projet est l'étude de l'acclimatation, l'hébergement, la maintenance et l'analyse des souris humanisées, provenant de notre partenaire externe, dans notre animalerie de niveau de sécurité biologique 2 (A2) de notre unité. Pour s'assurer de la bonne reconstitution du système immunitaire humain chez son hôte, un prélèvement sanguin unique sera réalisé. Une analyse par immunophénotypage en cytométrie de flux permettra de vérifier la qualité de la greffe. Les cohortes de souris humanisées ainsi qualifiées pourront alors être exportées vers nos partenaires académiques ou industriels en France et en Europe. Notre unité joue ainsi un rôle crucial dans la mesure où elle permet de maintenir un haut statut sanitaire des souris humanisées et de promouvoir la reproductibilité des résultats par les procédures mises en place au sein de nos services. Cette approche permet de développer des projets collaboratifs et de services en immuno-oncologie, infectieux et vaccinaux.

Les cohortes de souris seront de même sexe (femelles). Les animaux réceptionnés seront âgés de 6 à 7 semaines et maintenus dans notre animalerie A2 jusqu'à l'âge de 18 semaines au minimum. Le suivi des indicateurs cliniques du bien-être animal sera réalisé périodiquement afin de s'assurer que les animaux ne souffrent pas et ne sont pas en détresses. Au cours des cinq années de cette demande, un maximum de 6000 animaux seront hébergés et qualifiés (analysés) afin d'être distribué à nos différents partenaires.

Ce travail sera réalisé dans le strict respect de la règle des 3R.

Remplacer : A l'heure actuelle, aucune approche in-vitro ne permet de reproduire de façon satisfaisante l'ensemble des phénomènes impliqués dans l'installation d'un système immunitaire et de sa réponse vis-à-vis de différentes agressions. C'est pourquoi nous avons besoin de travailler avec ces modèles animaux

Réduire : Ces animaux sont destinés à être utilisés comme modèle précliniques auprès d'équipes utilisatrices académiques ou privés. Nous ne sommes pas en mesure de pouvoir proposer une réduction pour l'utilisation de ce modèle puisque notre unité intervient exclusivement pour l'hébergement, la qualification et la distribution de ce modèle.

Raffinement : Les souris humanisées sont élevées avec soin et respect, en présence d'enrichissement (dôme pour se cacher, jouer et fibres de coton pour faire un nid). Les souris seront hébergées par groupe de 5 au maximum (enrichissement social) et manipulées par du personnel formé et expérimenté. Une observation journalière des animaux sera réalisée afin de détecter de manière précoce tout changement anormal du bien-être de chaque animal.

19451 Notre axe de recherche cible les maladies génétiques rares qui touchent les muscles dont les myopathies font partie. Ces maladies neuromusculaires entraînent une dégénérescence du tissu musculaire réduisant drastiquement l'espérance de vie. Par cette étude nous ciblons la myopathie myotubulaire, due à des mutations dans le gène de la myotubularine (MTM1) situé dans le chromosome X, ce qui explique, qu'elle affecte exclusivement les garçons. A ce jour, aucun traitement curatif n'est disponible et dans la majorité des cas, l'évolution est fatale, 50% des enfants meurent avant l'âge de deux ans. Cette pathologie se traduit par un lent et progressif trouble musculaire qui débute dès l'enfance, affectant plus particulièrement les muscles squelettiques.

Cette maladie est causée par un dysfonctionnement de la fonction d'une enzyme appelée myotubularine entraînant une accumulation de phosphates au niveau de la membrane de la cellule. Ainsi, pour réguler le niveau de phosphates, nous souhaitons apporter un traitement thérapeutique par injection d'une molécule dont la spécificité est de bloquer une enzyme responsable de la phosphorylation au niveau de la membrane. Cette molécule a déjà été testée sans danger chez l'homme dans d'autres pathologies. De plus, une étude antérieure portant sur une mutation d'un gène proche de MTM1 (MTMR2) a montré une amélioration chez les animaux traités avec cette molécule. Cependant, aucune étude n'a été réalisée sur le traitement de cette maladie musculaire et tous ces éléments nous indiquent que cette molécule possède des caractéristiques très intéressantes qui méritent d'être évaluées.

La souris étant physiologiquement et structurellement assez proche de l'Homme, ce modèle animal permet d'étudier d'une part la physiopathologie et d'autre part l'amélioration des symptômes apportés par le traitement thérapeutique. De plus, le phénotype de ces animaux mutants est connu et très bien décrit dans la littérature, ce qui est un atout pour l'évaluation des potentiels effets bénéfiques du traitement. Une étude sur culture de cellules mutante ne peut être envisagée car le phénotype lié à la pathologie ne se développe pas et l'évaluation sur le bénéfice de la force musculaire serait impossible à mesurer (REMPACEMENT).

Plusieurs procédures expérimentales seront réalisées avec un test maximum par jour. Le nombre d'animaux sera réduit au maximum pour obtenir une puissance statistique suffisante. De plus, les mâles sauvages seront utilisés comme contrôles. Le nombre de géniteurs sera réduit en créant des cages d'accouplements avec deux femelles pour un mâle. Nos connaissances sur ce modèle animal mutant et les études réalisées sur d'autres thérapies montrent que 15 souris mâles par groupe seront nécessaires pour obtenir une étude concluante. En tenant compte des géniteurs, des animaux d'expérience (exclusivement les mâles) et des femelles qui ne seront pas inclus dans le protocole, nous prévoyons 150 animaux pour cette étude (REDUCTION).

Les myopathies sont des maladies entraînant des difficultés de locomotion, par conséquent de la nourriture sera placée dans la cage afin de soulager l'animal dans ses déplacements. Les souris seront hébergées par groupe de 2 à 4 par cage et la qualité de l'air sera assurée par une ventilation. Des nids seront disposés dans chaque cage avec un accès illimité à la boisson et à la nourriture.

Les cages d'accouplements seront constituées de deux femelles par cage facilitant l'élevage des petits. Le bien-être des animaux sera contrôlé quotidiennement afin de détecter au plus tôt les premiers signes de souffrance comme l'apathie, la prostration, l'abaissement des paupières et l'apparition d'une cyphose. Pour le nouveau-né, la souffrance sera évaluée visuellement : capacité à se retourner, couleur de la peau, capacité à se mouvoir. À partir du sevrage, une perte de poids de 20% en une semaine conduira à l'arrêt du protocole. En cas de douleur intense, un analgésique pourra être administré et l'étude sera prématurément stoppée (RAFFINEMENT).

19452 La dystrophie myotonique (DM1) est la forme la plus courante de dystrophie musculaire. Elle se caractérise par diverses manifestations cliniques multisystémiques, notamment une myotonie avec une faiblesse progressive et une atrophie des muscles squelettiques, des défauts de conduction cardiaque et des symptômes extramusculaires tels qu'une cataracte, une atrophie testiculaire, un dysfonctionnement endocrinien et cognitif. La myotonie est l'une des principales caractéristiques de la DM1, avec une atrophie progressive et la faiblesse de certains muscles du visage et de la mâchoire, du cou et des membres. Une expansion du triplet CTG dans la partie terminale du gène DMPK (pour DM1 Protein Kinase) est responsable de la DM1. La taille de la répétition du triplet CTG, qui augmente de génération en génération avec des expansions parfois très importantes, est généralement corrélée avec l'âge d'apparition de la maladie et sa gravité clinique. L'expansion répétée du triplet CTG dans le gène DMPK rend ce dernier toxique, avec de nombreuses conséquences moléculaires qui peuvent expliquer, indépendamment, les aspects multisystémiques de la DM1.

Au cours des vingt dernières années, plusieurs modèles animaux de la DM1 ont été développés. Si aucun des modèles actuels ne récapitule malheureusement idéalement tous les aspects de la DM1, étant donné sa variabilité clinique, les modèles de souris knock-in se sont révélés utiles pour étudier et comprendre les mécanismes moléculaires pathologiques de la DM1, et évaluer des approches thérapeutiques. Parmi ces modèles, l'un des plus puissants aujourd'hui est le modèle de souris transgénique DMSXL. Ce modèle a été généré par l'insertion de 45 kb de séquence génomique humaine comprenant le gène DMPK humain avec 300 répétitions CTG. Au cours des générations, l'expansion du triplet CTG a ensuite augmenté jusqu'à plus de 1500 répétitions. Les souris DMSXL présentent plusieurs phénotypes associés au DM1, notamment un retard de croissance, des défauts musculaires, des défauts de conduction cardiaque et des troubles cognitifs. En raison de l'expression omniprésente du transgène DMPK muté, les souris DMSXL constituent aujourd'hui un des meilleurs modèles pour étudier le trouble multisystémique de la DM1, et surtout évaluer des approches thérapeutiques.

Notre projet vise à maintenir une colonie de souris DMSXL à partir de mâles et de femelles hétérozygotes. Les souris obtenues (mâles et femelles) générées seront destinées à poursuivre le programme de reproduction, ou à être incluses dans des études futures de thérapie génique pour l'évaluation de produits thérapeutiques visant à traiter la DM1.

L'application de la règle des 3R au cours de ce projet sera effectuée comme suit :

- REDUCTION :

La détermination du nombre total d'animaux à inclure dans ce programme de reproduction a été réalisée par approche statistique et sur la base de l'expérience de précédentes reproductions menées par l'équipe qui a établi ce modèle de souris et avec qui nous sommes en contact régulier. La particularité de cet élevage repose sur le fait que 55% des souriceaux homozygotes meurent subitement avant le sevrage de cause indéterminée (probablement à cause du défaut respiratoire, comme chez les patients). Dans ce projet, afin de générer au maximum 150 souris DMSXL homozygotes par an, nous estimons qu'il sera nécessaire de mettre à la reproduction environ 120 femelles hétérozygotes et 120 mâles hétérozygotes par an, soit un total de 960 animaux reproducteurs utilisés sur 4 ans afin de générer environ 600 souris DMSXL homozygotes maximum. Ce nombre est estimé en fonction de nos connaissances théoriques sur les particularités de reproduction sur ce modèle (portées de taille standard, âges et fréquence de reproduction standards, mais obtention de pas plus de 1 petit homozygote par portée). Cette production de 150 petits par année permettra de générer des futurs reproducteurs hétérozygotes mâles et femelles en

nombre suffisant pour maintenir efficacement la lignée mais surtout de pouvoir intégrer un nombre importants d'animaux homozygotes dans les études pré-cliniques à venir.

- RAFFINEMENT :

Le bien-être animal passera notamment par :

- 1) de bonnes conditions d'hébergement selon la réglementation en vigueur avec un enrichissement du milieu (cages équipées de mezzanine et mise à disposition d'éléments d'enrichissement comme des carrés de coton, des tunnels en carton, des sizzle dry (papier) et des morceaux de bois).
- 2) un suivi régulier des animaux (observations biquotidiennes, pesées régulières, analyse du comportement)
- 3) l'instauration de points limites pertinents et la mise en place de mesures adaptées si nécessaire (anesthésies, traitements analgésiques ou autre, ou euthanasie si pas d'autre alternative)
- 4) Afin d'améliorer la réactivité du personnel animalier, une grille de scoring de la douleur sera mise en place dès que celle-ci s'avère nécessaire afin de pouvoir détecter précocement tout point limite et mettre en place les actions adéquates (Cf. exemple annexe de la saisine).
- 5) la mise en place de mesures adaptées en fonction des interventions éventuelles (anesthésie et analgésie si nécessaire).

- REMPLACEMENT :

Le développement d'une colonie de souris DMSXL permettra notamment d'étudier différentes stratégies de thérapie génique visant soit à réprimer l'expression du gène DMPK muté toxique dans la maladie, soit à faire exprimer une protéine permettant de contrer cette toxicité du gène DMPK muté. La souris DMSXL étant porteuse du gène DMPK humain muté, les approches testées seront spécifiques de l'homme in vivo et permettront donc de générer des résultats qui pourront directement être utilisés pour la translation vers des essais thérapeutiques chez les patients. Le remplacement d'animaux n'est pas encore possible dans ce type d'étude car il n'existe pas aujourd'hui de méthode alternative pour tester l'effet d'un traitement de thérapie génique in vivo. L'animal est le seul organisme vivant permettant d'étudier l'impact d'un transfert de gène dans différents types cellulaires (différents organes) et sur son phénotype, en lien avec le mode d'administration utilisé et la dose administrée.

19453 La cataracte est l'opacification partielle ou totale du cristallin, lentille convergente située à l'intérieur de l'œil. Cette opacification est responsable d'une baisse progressive de la vue, au début accompagnée de gêne à la lumière. La cataracte est la première cause de cécité dans les pays en voie de développement : elle explique près de 40% des 37 millions d'aveugles dans le monde.

Dans les pays développés, la cataracte est majoritairement observée chez la personne âgée, on la dénomme alors « forme sénile » : des petites opacités existent chez 50 % des personnes à l'âge de 60 ans, 70 % des personnes à l'âge de 70 ans. Néanmoins, elle débute généralement en même temps que la presbytie vers 45 ans.

Le seul traitement efficace de la cataracte est la chirurgie. L'intervention consiste à enlever le cristallin opaque, et le remplacer par un cristallin artificiel (implant intraoculaire) qui prend place dans l'« enveloppe » du cristallin (appelée capsule) laissée partiellement en place pendant l'intervention. Cette intervention se fait classiquement sous anesthésie de contact ou locale.

L'intervention se passe sous microscope opératoire. L'extraction extra-capsulaire consiste à retirer seulement le contenu opacifié du cristallin par une petite incision de 2 à 3 millimètres dans la cornée. Une ouverture circulaire (capsulorhexis) est effectuée dans la capsule antérieure à l'aide d'une pince. Le cristallin est fragmenté par des ultrasons puis aspiré. L'implant est ensuite introduit. Cette technique de phacoémulsification par ultrasons est pratiquée par une toute petite incision en général suturée par un seul fil ou sans suture.

Depuis 2010, les incisions dans la cornée, le capsulorhexis et la fragmentation du cristallin peuvent se faire tout ou partie au laser.

Notre projet consiste à développer un système laser innovant, compact, transportable et plus abordable financièrement afin de réaliser le capsulorhexis qui représente le geste le plus sensible de l'intervention chirurgicale. L'intervention sera pratiquée conformément aux recommandations en vigueur et aux bonnes pratiques vétérinaires.

Afin de valider les performances cliniques de notre dispositif, des essais sont préalablement réalisés sur des yeux de cochon issus d'abattoirs. Cependant, les lasers peuvent générer des lésions irréversibles sur la rétine aussi il est important de confirmer l'innocuité de notre dispositif sur celle-ci.

Le modèle validé pour ces tests est le lapin qui possède des yeux aux dimensions comparables à celles de l'homme. Aucune méthode alternative ne permettant actuellement de reproduire les effets du laser au niveau de l'oeil, il est indispensable de recourir à l'animal entier pour démontrer son efficacité et son innocuité.

Nous avons réduit le nombre de lapins au maximum, à celui requis pour obtenir une validation statistique des résultats. Nous aurons besoin de 14 lapins pour valider ces tests. L'un des deux yeux du lapin recevra le rayonnement laser identique à celui qui sert à l'intervention chirurgicale et l'autre œil servira de comparaison. Ce travail permettra de garantir la sécurité oculaire des patients lors des investigations cliniques.

Ce projet englobe deux études, une étude pilote pour laquelle le nombre d'animaux sera égal à 2, et une étude pivot pour laquelle le nombre d'animaux sera égal à 10 + 2 lapins de réserve si besoin. Une évaluation éthique préalable sera faite pour chaque étude. Durant toute la phase expérimentale, les animaux seront hébergés par groupe ou de façon individuelle (s'il y a que des lapins mâles ou si demandé par le protocole) dans des cages comprenant du matériel d'enrichissement adapté (ex: tablette cachette, buchette à ronger,...) et en ayant un contact visuel avec ses congénères. Un suivi quotidien (voir plusieurs fois par jour) sera mis en place pour l'observation générale des animaux et la détection précoce d'éventuels animaux et la détection précoce d'éventuels effets secondaires pour une prise en charge rapide (observation de l'état de santé général, comportement général de l'animal...)

Toute intervention sur l'animal sera effectuée par une personne habilitée et expérimentée afin de réduire au minimum le stress. Au total, moins d'une vingtaine d'animaux (soit 14 animaux) pourront être utilisés en 1 an dans ce projet.

19454 Le maintien de la balance énergétique dépend de l'équilibre entre les apports et les dépenses énergétiques. Il existe des systèmes de régulation de la prise alimentaire qui permettent un équilibre entre les apports énergétiques et les dépenses et le maintien du poids corporel autour d'une constante. Une dérégulation du système peut conduire à l'obésité et aux maladies métaboliques qui lui sont associées. De très nombreuses études ont montré l'association positive entre obésité et diabète de type 2 (DT2).

Le DT2 est la forme la plus fréquente de diabète (90 % des cas). Il se caractérise par une augmentation du taux de sucre dans le sang (hyperglycémie), car le corps utilise mal le glucose (sucre) comme source d'énergie. Cette hyperglycémie chronique entraîne de nombreuses complications tels que des maladies cardiovasculaires, des accidents vasculaires cérébraux, la cécité, l'insuffisance rénale et des lésions nerveuses

De nombreux gènes ont été associés à l'apparition du DT2. Cependant, leur fonction dans la survenue du DT2 est inconnue. La protéine CaMK1D fait partie de ces gènes identifiés dont la fonction est ignorée. Nous avons généré des souris génétiquement modifiées, dont le gène codant pour CaMK1D a été invalidé. Les données de notre laboratoire montrent que les animaux ont un poids et un apport alimentaire diminués par rapport aux animaux témoins après 4 mois de diète riche en gras. Ces diminutions sont associées à une amélioration de la glycémie des souris. Bien que nous ayons découvert le rôle de CaMK1D dans le maintien de la balance énergétique via un contrôle neuronal de l'appétit, les données de la littérature suggèrent que CaMK1D pourrait aussi être impliquée dans une inflammation de bas grade étroitement liées à l'obésité.

Pour tester cette hypothèse, nous utiliserons le même modèle de souris génétiquement modifiées que précédemment, dans lesquels le gène codant pour CaMK1D est invalidé. Par contre, l'invalidation de CaMK1D sera effectuée spécifiquement dans les cellules immunitaires du cerveau. Les souris seront soumises à un régime alimentaire standard ou à une diète enrichie en gras afin d'induire une obésité. Les paramètres métaboliques des souris seront déterminés au cours du temps.

Remplacement : La régulation de la glycémie nécessite la participation de plusieurs organes interdépendants (foie, îlots de Langerhans, muscles, tissus adipeux, cerveau). Ces mécanismes complexes ne sont présents que dans des organismes complexes tels que la souris.

Réduction : Nous utiliserons un total de 204 animaux. Le nombre d'animaux testés dans chaque expérience nous permettra une comparaison statistique adaptée entre les différents groupes tout en tenant compte des impératifs de réduction. Par ailleurs, toujours par souci de réduction, plusieurs procédures expérimentales (avec un temps de récupération adaptée pour les animaux) seront réalisées chez les mêmes cohortes de souris.

Raffinement : Les différentes expériences seront réalisées par du personnel qualifié afin d'éviter le stress lié à la manipulation des animaux. Les volumes de sang prélevés seront réduits au minimum nécessaire pour les analyses biochimiques et les volumes injectés seront adaptés au poids de chaque animal afin de ne pas induire de stress supplémentaire. Le recours aux analgésiques et anesthésiques sera systématique pour éviter toute souffrance ou douleur chez l'animal.

19455 La trisomie 21 est le syndrome génétique le plus fréquent dans la population générale. C'est une maladie provoquée par la présence d'une troisième copie du chromosome 21 caractérisée par une déficience intellectuelle et associée non seulement à des anomalies du système nerveux mais également du système endocrinien. Au cours des dernières décennies, des progrès considérables ont contribué à prolonger l'espérance de vie de ces patients. L'amélioration de l'espérance de vie s'accompagne de la nécessité de travailler sur les complications et comorbidités associées à la trisomie 21, notamment le diabète, afin d'améliorer la qualité de vie des patients. Cette pathologie peut être caractérisée par un axe cerveau / pancréas reliant le dysfonctionnement des cellules bêta, la résistance périphérique à l'insuline et la résistance à l'insuline cérébrale avec une déficience cognitive concomitante. Cependant, à ce jour, cette hypothèse n'a pas été testée de manière approfondie. La compréhension des mécanismes moléculaires communs menant à, ou résultant de la résistance à l'insuline dans la déficience intellectuelle et le diabète, est nécessaire car elle pourrait conduire à l'identification de cibles thérapeutiques communes pour ces deux conditions interconnectées dans le contexte de la trisomie 21.

L'objectif du projet est donc de déchiffrer les mécanismes moléculaires communs menant à, ou résultant de la résistance à l'insuline dans la déficience intellectuelle et le diabète par l'analyse de deux cibles thérapeutiques communes pour ces deux conditions.

Notre projet est un travail de physiologie intégrée et aucun modèle cellulaire ne permet de reproduire cette situation. En effet, il n'est pas possible de créer in vitro la complexité d'un organisme dans son ensemble avec les différents types cellulaires impliqués.

Cette étude nécessitera 320 souris au total : 8 groupes (3 groupes traités et un groupe non traité pour chaque génotype) de 40 souris (20 mâles et 20 femelles) car l'étude statistique utilisée pour chaque expérience nécessite 20 souris et deux séries de prélèvements seront nécessaires afin d'effectuer tous les tests. De plus, les différentes expérimentations pourront être effectuées sur des mêmes groupes de souris dans la mesure où celles-ci se révèlent non invasives, non douloureuses et non stressantes pour l'animal, comme les tests de comportements.

Une attention particulière sera portée au respect de la règle des 3R :

« Réduire » le nombre d'animaux, ce nombre ayant été calculé après avoir établi l'ensemble des procédures expérimentales à l'aide d'un test de puissance statistique en se basant sur la variabilité entre animaux.

« Remplacer », pour atteindre les objectifs du projet basés sur une étude pré-clinique, un modèle intégré est nécessaire, n'ayant pas la possibilité de créer in vitro la complexité d'un organisme avec tous les différents types cellulaires impliqués.

« Raffiner » les approches expérimentales par une surveillance de façon journalière afin de vérifier tout comportement anormal traduisant une souffrance, comme des signes de prostration ou d'agressivité, et s'il n'y a pas de perte de poids au-delà de 15%. Afin de garantir le bien-être des animaux, le milieu sera amélioré par l'ajout d'un nid végétal et d'un rouleau en carton.

19456 Les maladies neurodégénératives liées à la protéine PRION représentent un réel problème à la fois en santé animale et en santé humaine. En élevage, elles sont responsables de la tremblante chez les ovins, la scrapie chez les caprins, ou la vache folle ou ESB (Encéphalopathie Spongiforme Bovine) chez les bovins. Les animaux atteints présentent des symptômes sévères et il n'existe aucun traitement. En santé humaine, il a été démontré un franchissement de la barrière d'espèce de l'agent pathogène PRION, au moins de l'espèce bovine vers l'espèce humaine. Cet agent pathogène PRION est unique, c'est un repliement anormal de la protéine PRION endogène (codée par le gène PRNP) qui porte la pathogénicité. Mal repliée, la protéine PRION s'accumule dans le cerveau et entraîne la neuro dégénérescence.

Depuis les années 1990, période pendant laquelle la crise de la vache folle a considérablement fait évoluer nos connaissances et nos approches concernant ces maladies, une sélection accrue de variant (versions possibles d'un même gène) de moindre sensibilité, dits de résistance, du gène PRNP a été menée dans les espèces ovines et caprines (un variant de résistance code une version de la protéine PRION qui limite, sans abolir, la virulence de la protéine). Si cette sélection a porté ses fruits dans l'espèce ovine où plusieurs allèles de résistance sont présents, il n'en est pas de même dans l'espèce caprine où les rares allèles de résistance sont minoritaires dans la population. Une solution alternative et radicale pour éviter l'apparition des maladies à PRION consiste à sélectionner des animaux dépourvus de cette protéine PRION, suite à des mutations du gène PRNP conduisant à un arrêt de production de cette protéine par l'organisme mutant.

Une mutation naturelle du gène PRNP est survenue dans la population caprine norvégienne où elle a été décrite pour la première fois en 2012. Cette mutation fait disparaître la protéine PRION chez les animaux porteurs des deux copies mutantes du gène (animaux homozygotes PRNP/-/). Depuis 2012, une équipe de chercheurs norvégiens caractérise cette mutation et les effets de l'absence de la protéine PRION dans la population caprine norvégienne. Parmi leurs résultats les plus significatifs, ils ont pu montrer que les animaux dépourvus de la protéine PRION (i) sont résistants aux Prions ; (ii) ont une immunité différente de celle des animaux possédant la protéine ; et, (iii) présentent une dégénérescence accrue des fibres nerveuses au cours du vieillissement.

Le projet que nous proposons est inscrit dans un projet européen qui débutera en Juin 2021. Dans ce vaste projet visant à améliorer la sélection génétique des ruminants, il est prévu de comparer (via un exemple pratique, objet de la présente demande) l'efficacité de l'introduction d'un caractère (l'absence de protéine PRION) par deux voies différentes. L'une utilise la technique d'élevage classique (nommée : introgression) de croisements entre deux races de chèvre : celle possédant le caractère (Norvégienne = race donneuse), vers l'autre ne le possédant pas (Alpine = race receveuse). L'autre voie va utiliser les nouvelles technologies de modifications ciblées des génomes (« genome editing », GE) afin de reproduire la même mutation « Norvégienne » directement dans le génome des chèvres de race Alpine. La technique d'introgression se déroule sur plusieurs années (minimum 5) afin d'éliminer, du génome de la race receveuse (Alpine), les parties non désirées du génome de la race donneuse (Norvégienne) ; c'est-à-dire tout le génome sauf la mutation ceci afin de préserver au maximum les autres caractères de la race receveuse. En réalité cela n'arrive jamais puisqu'au moins les parties adjacentes du génome de la race donneuse (régions génétiquement liées à la mutation) resteront dans le génome de la race receveuse. La technique de GE permet, au contraire de la technique d'introgression, de reproduire la mutation désirée, et elle seule, dans le génome de la race « cible » (Alpine) en seulement une ou deux générations. La copie par GE de la mutation « Norvégienne » en race Alpine fait l'objet de la présente demande. La copie par GE est

réalisée dans l'embryon au stade unicellulaire par coupure de l'ADN de la région ciblée à l'aide des outils CrispR/Cas9.

Pour ce projet, il est impossible de remplacer les animaux pour étudier les effets de la perte d'un gène. En effet, un gène peut intervenir dans plusieurs fonctions biologiques et il est impossible de reconstituer simultanément in vitro ces multiples fonctions. Nous utiliserons un maximum de 110 chèvres dont le devenir était la réforme (fin de protocoles de sélection génétique). Dix expériences indépendantes de GE sont envisagées (contractualisées dans le projet européen). Chaque expérience nécessitera la mobilisation de 11 chèvres (5 donneuses d'œufs et 6 receveuses d'embryons). Ces chiffres ont été optimisés à la baisse en fonction de notre expérience acquise précédemment dans différents projets similaires. A partir du moment où 4 chevreaux porteurs de la mutation du gène PRNP (animaux F0=Fondateurs) sont obtenus, les essais s'arrêtent et les expériences suivantes sont annulées. Il est donc probable que ce projet engage beaucoup moins d'animaux que les 110 annoncés. De plus, nous avons choisi de travailler uniquement en automne qui correspond à la saison sexuelle des caprins, et ceci afin d'optimiser les résultats et donc de réduire le nombre d'animaux utilisés. Lors du transfert chirurgical des embryons, par coelioscopie, chez les chèvres receveuses, nous limiterons au maximum l'inconfort des animaux, en réalisant les interventions sous anesthésie générale précédée d'une analgésie adaptée et d'une antalgie post-opératoire. Les femelles receveuses seront hébergées dans un bâtiment conditionné et agrémenté pour accueillir des animaux génétiquement modifiés. Les animaux seront hébergés par lot d'une dizaine pour favoriser les relations sociales. Ils auront accès à l'eau et à du fourrage sec sans limitation. Un enrichissement du milieu sera proposé. Une surveillance quotidienne des animaux sera effectuée par les responsables du bien-être animal. Si un animal devait présenter des signes de douleur, de stress ou d'inconfort, comme une prostration, une absence de déplacement après une stimulation physique ou tout autre critère défini comme point limite, nous solliciterions le vétérinaire référent pour trouver une solution. Si aucune solution n'était envisageable, l'animal serait euthanasié.

19457 L'alimentation est essentielle à la survie mais est aussi source de plaisir. La libération d'une molécule, qui permet la communication, au niveau du circuit neuronal dit « de la récompense » est un mécanisme clé dans le plaisir pour la nourriture. Ce circuit est aussi la cible par laquelle les drogues exercent leur propriété addictive. Il est maintenant acquis que les nutriments issus de l'alimentation -et en particulier les lipides-influence directement ou indirectement le circuit de la récompense. La détection des nutriments au niveau de la langue, de l'intestin ou directement par les neurones dopaminergiques, fait partie des mécanismes par lesquels les nutriments influencent le circuit de récompense et peuvent conduire à des dérèglements alimentaires du type de la boulimie. Ce projet vise à identifier les composants nutritionnels et les mécanismes par lesquels ces composants conduisent à ces comportements « addictif » par rapport à la nourriture.

L'ambition de ce projet est de développer de nouvelles stratégies pour prévenir ou corriger les troubles alimentaires associés aux nourritures riches en gras et à l'obésité.

Pour cela, nous avons choisi de travailler avec des modèles de souris génétiquement modifiés qui nous permettront de comprendre comment les neurones s'adaptent à des régimes trop riches et comment la manipulation de ces neurones peut permettre de corriger les problèmes métaboliques associés à l'obésité. Les animaux auront de la nourriture enrichie en gras dans leur milieu afin qu'ils développent une obésité. Ils subiront une chirurgie stéréotaxique afin d'injecter des virus et d'y implanter une fibre optique pour faire de l'enregistrement nerveux et un cathéter carotidien ou gastrique pour l'injection de lipides par la suite. Puis après une phase de repos d'un mois environ ils seront suivis au niveau métabolique.

La règle des trois R sera respectée, le nombre d'animaux sera réduit au minimum en optimisant au maximum les groupes expérimentaux (réutilisation des animaux dans différentes procédures n'entraînant pas de douleur ou de stress) et en raffinant les procédures pour réduire au minimum la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux.

Nous effectuerons lorsque nécessaire l'administration d'analgésique lors des procédures de chirurgies, ainsi que d'antalgique en post opératoire, si besoin. Les gestes chirurgicaux seront effectués sous anesthésie générale et analgésie pré, per et postopératoire. Les cages sont agrémentées d'un nid végétal et d'objets pour le confort des animaux.

Un total de 1056 souris sera utilisé pendant les 5 ans d'étude du projet. Le bien-être animal est pour nous primordial vis-à-vis de l'animal mais aussi de nos expérimentations, les résultats de comportement ne peuvent être valable que si l'animal est bien portant.

Des points limites spécifiques d'évaluation de la douleur à chaque procédure sera mise en place. L'atteinte d'un de ces points limites entrainera la mise à mort anticipée de l'animal concerné. Enfin, cette étude ne peut être remplacée par d'autre moyen, comme la culture cellulaire, car nous regardons le comportement, le métabolisme et les réponses neuronales de l'animal.

19458 La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est la première cause de mal voyance chez les personnes de plus de 50 ans dans les pays industrialisés et la troisième cause dans le monde. Sa fréquence augmente avec l'âge et le nombre de patient augmentera compte tenu de l'allongement de l'espérance de vie.

Cette pathologie touche l'oeil dans une zone particulière la macula de la rétine impliquée dans la vision fine et la vision centrale. La maladie est silencieuse pendant plusieurs années, puis la vision et la perception des détails baissent, des tâches sombres apparaissent au centre du champ de la vision. Dans la forme dite exsudative ou « humide » de la DMLA, plus grave qui évolue rapidement vers une perte importante de la vision centrale, de nouveaux vaisseaux sanguins poussent de façon anormale et endommagent la rétine. La stratégie des traitements est de stopper la progression anarchique de ces vaisseaux délétères. La forme dite « sèche », non exsudative ou atrophique de la DMLA est la plus fréquente, elle évolue plus lentement que la forme humide mais il n'existe pas de traitement.

L'objectif de ce projet est de mettre en place dans l'établissement utilisateur, un modèle expérimental de forme humide en induisant la néovascularisation choroïdienne chez les rongeurs et le lapin, et de forme sèche pour participer au développement de substances thérapeutiques limitant la formation de cette maladie de la rétine.

Compte tenu des particularités physiologiques et anatomiques de l'organe concerné, nous devons avoir recours à des animaux pour établir notre modèle. La littérature scientifique décrit très précisément comment induire la pousse de ces nouveaux vaisseaux dans des zones de la rétine.

Lapins et rongeurs (rat souris) sont largement utilisés dans la recherche en ophtalmologie pour la compréhension des mécanismes impliqués dans la pathologie et le test de nouveaux traitements, chaque espèce offrant des possibilités complémentaires d'évaluation de la pathologie, de possibilité de traitement (pose d'implant chez le lapin, spécificité d'espèce pour les traitements à base d'anticorps, outils pour évaluation de la pathologie...). Pour ce projet sur une durée de 5 ans, nous aurons besoin au maximum de 13600 rats, 13600 souris, 13650 lapins.

Les informations bibliographiques, les analyses statistiques et notre expérience, nous permettront de limiter le nombre d'animaux utilisés. Les conditions d'hébergement, le bien être des animaux et leur amélioration, font l'objet d'une surveillance constante au sein de notre société. Ce projet a été soumis au comité d'éthique et sera suivi par la structure en charge du bien-être animal de l'établissement.

Afin de respecter la règle des 3R :

- Réduction : le nombre d'animaux par groupe est limité pour cependant rester adapté à l'analyse des résultats par tests statistiques afin de permettre de conclure sur l'efficacité ou non d'un traitement. Des évaluations non invasives de la pathologie sont utilisées tout au long de l'étude pour éviter la mise à mort de l'animal.

- Raffinement : un suivi quotidien des animaux sera effectué afin de minimiser au maximum l'impact sur le bien-être des animaux. Des points limites adaptés, suffisamment prédictifs et précoces permettent de limiter une éventuelle douleur à son minimum. Les animaux sont hébergés dans des

cages contenant un enrichissement adapté à l'espèce pour améliorer le bien-être de l'animal. Les examens non invasifs pour évaluer la pathologie sont semblables à ceux pratiqués chez l'homme en cabinet ophtalmologique ou en cabinet vétérinaire. Les examens de l'oeil qui requièrent un immobilisme de l'animal pourront être réalisés sous anesthésie pour son confort. Ce projet a été soumis pour évaluation à un comité d'éthique et sera suivi par la structure en charge du bien-être animal de l'établissement.

- Remplacement : à ce jour, aucune méthode alternative ne permet de mimer l'oeil dans son environnement et dans sa globalité fonctionnelle. En effet, l'oeil est composé de différents tissus de physiologie différente soumis aux variations environnementales, aux interactions des tissus et organes voisins. Le projet nécessitera donc d'avoir recours à des animaux compte tenu des particularités de l'organe concerné par le projet et l'absence de méthode alternative.

19459 Le diabète de type II est le fléau du 21^{ème} siècle. Avec une augmentation constante de sa prévalence et déjà un demi-million de personnes atteintes, la maladie est considérée comme la première pandémie non virale. L'apparition de cette maladie, lente et silencieuse, est principalement due à la progression mondiale du mode de vie occidental et sédentaire, mais aussi au vieillissement des populations. Ces facteurs de risque qui favorisent le développement d'une résistance à l'insuline ont des conséquences connues notamment sur la prise de poids, sur l'inflammation des tissus, sur les risques cardiovasculaires et sur les perturbations intestinales du microbiote. En particulier, de plus en plus d'études pointent du doigt le lien causal entre perturbation du microbiote intestinal et résistance à l'insuline. L'objectif de ce projet est de démontrer que le remodelage du microbiote intestinal peut jouer un rôle décisif dans le traitement de la résistance insuline et du diabète de type II. Pour cela, nous allons utiliser ALF-5755, protéine recombinante analogue de la molécule humaine HIP/PAP dont le rôle sur le microbiote intestinal a été démontré.

Le projet consiste en une délivrance entérique quotidienne de la protéine dans un modèle murin de prédiabète pour évaluer les effets 1/ au niveau local en étudiant la flore intestinale et 2/ au niveau systémique en étudiant les bénéfices du traitement sur le métabolisme du glucose et la résistance à l'insuline. En raison de ses propriétés physico-chimiques, ALF-5755 ne peut pas être délivrée par gavage car au passage de l'estomac, la protéine serait totalement dégradée par les enzymes digestives avant même de pouvoir atteindre le colon. Ainsi, nous allons délivrer notre molécule au moyen d'un cathéter placé directement au niveau iléale de l'intestin grêle chez la souris.

Ce projet requiert donc la maîtrise technique de la pose du cathéter chez la souris. Ces gestes techniques ont été validés grâce au projet CEB-02-21 qui a permis d'établir une méthodologie technique visant à minimiser la douleur et le stress de l'animal et à maximiser la récupération post-opératoire. Par ailleurs, ce projet pilote a permis de démontrer qu'un traitement de 21 jours était réalisable.

Notre projet se fera sur un nombre total de 150 souris et respectera la règle des 3R.

Remplacement : Notre projet correspond à un travail de phase préclinique visant à tester l'effet anti-diabétique d'une nouvelle molécule. C'est donc un passage obligé vers la clinique et l'Homme. Il n'existe pas actuellement de modèle *in vitro* permettant de reproduire la complexité d'un organisme vivant.

Réduction : Nous limitons au maximum le nombre d'animaux (n=15) par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables et interprétables. En effet, dans ce domaine de la diabétologie et le type de mesures que nous allons effectuer, un nombre égal à 15 est largement documenté pour donner des résultats fiables et pertinents.

Raffinement : l'ensemble des procédures de ce projet vise à concilier une interprétation fiable des résultats et le respect du bien-être animal. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation. Les chirurgies sont réalisées sous anesthésie générale et la prise en charge de la douleur est prévue avant pendant et après l'opération.

19460 L'incidence des maladies rénales chroniques (MRC) est en progression constante et représente actuellement un problème majeur de santé publique dans les pays industrialisés. Ainsi en France

les maladies rénales d'origine diverses touchent plus de 5,7 millions de personnes avec une progression de 2% par an. La maladie rénale chronique est une maladie longtemps silencieuse, d'évolution progressive et qui ne régresse pas. Son évolution est plus ou moins lente mais peut aller jusqu'à la perte totale de la fonction rénale. On parle alors d'insuffisance rénale terminale, nécessitant un traitement de suppléance par dialyse et/ou greffe de rein qui reste lourd de risques et de complications pour les malades. Un problème majeur pour la prise en charge des patients atteints d'une MRC est le manque de traitements spécifiques capables de ralentir l'évolution de la maladie.

Ce projet vise à mieux comprendre les mécanismes d'évolution de la maladie et à tester des molécules capables de ralentir cette évolution. Parmi les acteurs associés à la progression de la maladie rénale, un récepteur nucléaire a été identifié comme une molécule pouvant protéger de cette atteinte et une famille de protéines mitochondriales comme des molécules aggravant la progression de la maladie.

D'une part, il a été montré que chez le patient transplanté, une diminution de ce facteur nucléaire précède et permet de prédire l'apparition de la MRC et que chez la souris, elle ralentit l'évolution de la MRC. De même, une étude récente a montré qu'un agoniste de ce facteur nucléaire parmi les 3 testés, prévient de manière significative la progression des lésions rénales dans un modèle expérimental de MRC.

D'autre part, des études récentes suggèrent qu'une dis-fonction des mitochondries pourrait jouer un rôle important dans les mécanismes moléculaires conduisant à la destruction du rein lors d'une MRC. Or un inhibiteur de protéines mitochondriales vient d'être développé par une entreprise pharmacologique et nous avons été contacté afin de l'étudier dans notre modèle expérimental de MRC.

Nous allons reproduire expérimentalement chez la souris normale une maladie rénale afin de tester l'efficacité de ces 2 types de molécules sur l'évolution de cette maladie. Ce modèle expérimental, bien maîtrisé dans notre laboratoire, consiste en l'ablation partielle du tissu rénal qui entraîne des lésions modérées dans les différentes parties du rein similaires à celles observées dans la plupart des maladies rénales humaines. Comme chez l'homme, ces maladies restent longtemps silencieuses et les études se dérouleront avant l'apparition de symptômes douloureux.

Ce projet sera réalisé au cours de 2 études, la première avec l'agoniste du facteur nucléaire et la deuxième avec l'inhibiteur de protéines mitochondriales. Dans les 2 cas, nous comparerons l'efficacité de ces molécules avec celui du Losartan, le seul traitement considéré jusqu'à présent comme partiellement bénéfique chez le patient en insuffisance rénale. Les molécules d'intérêt seront administrées par gavage et le Losartan sera introduit dans l'eau de boisson, soit isolément soit en association afin d'identifier un éventuel effet cumulatif. Les traitements commenceront 5 semaines après la chirurgie et dureront 3 semaines. Un premier prélèvement de sang sous anesthésie gazeuse et locale avant le début du traitement et un deuxième sous anesthésie générale à l'échéance de l'étude seront réalisés afin d'estimer la fonction rénale. L'urine, les reins et les foies seront prélevés en post-mortem pour analyses.

Ce projet sur 3 ans utilisera 216 souris en provenance d'un éleveur agréé. La règle des « 3R » sera appliquée au cours de cette étude.

1) Remplacement : La complexité du rein et de la maladie rénale nécessite l'utilisation d'un modèle animal. Les molécules agonistes ont préalablement été testées sur des cultures cellulaires ce qui nous permet d'envisager une gamme d'efficacité sans toxicité pour les animaux.

2) Réduction : nous utiliserons le nombre minimum d'animaux requis pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et atteindre l'objectif scientifique du projet.

3) Raffinement : le modèle de MRC utilisé entraîne une altération progressive du tissu rénal. Comme chez l'homme, ces maladies restent longtemps silencieuses et les animaux seront mis à mort avant l'apparition de symptômes douloureux.

La chirurgie sera effectuée sous anesthésie générale avec une prise en charge antalgique. Les procédures seront raffinées par l'emploi de points limites précoces spécifiques, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire. Ils bénéficieront d'un programme d'enrichissement,

comme des carrés de cellulose, des bâtonnets de bois ou une maisonnette, défini par la cellule de l'établissement chargée de leur bien-être.

Cette étude vise à développer des molécules capables de ralentir la progression de la maladie rénale chronique. Elle représente un enjeu thérapeutique important quant au traitement de l'insuffisance rénale chronique chez l'homme.

19461 Principale voie d'élimination des déchets toxiques sanguins, le rein joue un rôle central dans le maintien de l'homéostasie du milieu intérieur.

Les maladies rénales chroniques sont un ensemble de pathologies génétiques ou acquises caractérisées par une perte de l'homéostasie tissulaire rénale entraînant une détérioration progressive de la fonction et de la structure du rein. Actuellement, aucun traitement ne permet d'éviter aux patients d'évoluer vers l'insuffisance rénale terminale.

Plusieurs études ont montré le rôle délétère d'un facteur de transcription dans l'évolution des lésions rénales dans différents modèles murins. A l'inverse, nous avons récemment montré, in vivo dans un modèle murin et in vitro sur des cellules de patients atteints d'une maladie rénale pédiatrique, la néphronophtise, le rôle bénéfique joué par ce même facteur de transcription dans le contrôle de la fibrose interstitielle et l'inflammation rénale. Ces données suggèrent que ce facteur de transcription peut avoir des effets opposés en fonction du contexte pathologique.

L'étude proposée ici a pour but de comprendre le rôle de ce facteur de transcription, d'une façon plus globale, en analysant l'impact de sa délétion dans un modèle murin chirurgical d'obstruction des voies urinaires connu pour induire très rapidement de la fibrose interstitielle et de l'inflammation rénale sans déclin de la fonction rénale.

Les objectifs de ce travail sont :

1/ d'apprendre le geste chirurgical d'obstruction des voies urinaires.

2/ d'évaluer l'impact de la délétion du facteur de transcription sur la réponse à l'obstruction des voies urinaires.

Pour cela, des souris génétiquement modifiées n'exprimant plus le facteur de transcription dans le rein seront utilisées. Ces expériences utiliseront un maximum de 110 souris sur 3 ans et seront réalisées sur des souris adultes (8-12 semaines).

La souris a été choisie car elle présente l'avantage de facilité d'élevage et de reproduction et elle permet l'étude d'animaux génétiquement modifiés particulièrement informatifs pour la compréhension des mécanismes physiopathologiques et que de nombreux outils d'analyses ont été développés et bien caractérisés dans cette espèce animale.

Divers examens d'immunomarquages et de biologie moléculaire seront réalisés sur les reins après leur prélèvement à différents temps.

La règle des « 3R » sera appliquée au cours de cette étude.

Pour remplacer : La maladie rénale chronique met en jeu des phénomènes complexes faisant intervenir différents types cellulaires ainsi que des modifications structurales du tissu rénal. A l'heure actuelle, il n'existe pas de modèle in vitro pertinent permettant de reproduire ces interactions cellulaires complexes à l'échelle de l'organisme entier. Compte tenu de l'absence de modèle cellulaire permettant l'étude d'un rein in vitro, il n'est pas possible de substituer des approches in vitro aux modèles murins impliqués dans ce projet.

Pour réduire : Nous avons estimé la taille des échantillons permettant une analyse statistique efficace.

Pour raffiner : Afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux souris, les conditions d'élevage et d'expérimentation ont été raffinées :

- La chirurgie sera réalisée sous anesthésie générale profonde, surveillée régulièrement afin de garantir une sédation optimale, et analgésie préalable ; des antalgiques en période pré et post-opératoire

- Les procédures seront raffinées par l'emploi de points limites précoces spécifiques, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

- Les souris seront hébergées par 5 en cage ventilée et leur environnement sera enrichi par du coton, maisonnettes et tunnels ainsi que des bâtonnets de bois à ronger.

Pour conclure, les résultats obtenus devraient apporter une meilleure compréhension du rôle de ce facteur de transcription et d'établir si celui-ci pourrait représenter une cible thérapeutique pour limiter la progression de la fibrose et de l'inflammation dans différentes pathologies rénales.

19462 L'immunociblage avec des anticorps monoclonaux

est une option thérapeutique qui a émergé il y a une trentaine d'année. Actuellement plus de 100 anticorps médicaments sont sur le marché (dont la moitié est utilisée dans le cancer), et de nombreux anticorps sont en essai clinique en oncologie thérapeutique.

Les cancers du sein triple-négatifs (TNBC) ([RE- (récepteur estrogène), RP- (récepteur progestérone), HER2-]) et également ceux résistants aux traitements classiques, nécessitent de nouveaux traitements.

La technologie que nous sommes en train de mettre en place a pour grand objectif le développement d'anticorps innovants entièrement humains pour proposer de nouvelles thérapies ciblées et des alternatives thérapeutiques dans le traitement des cancers du sein.

Les anticorps humains utilisés dans ce projet ciblent deux protéines anormalement présentes dans le microenvironnement des cancers du sein qui présentent des activités pro-tumorale et pro-métastatique : il s'agit de la protéase cathepsine D et de la protéine SPARC.

Les objectifs globaux de ce projet pour les 5 années concerneront l'analyse détaillée de l'efficacité thérapeutique d'anticorps monoclonaux humains ciblant cathepsine D et SPARC.

Pour ce projet, nous grefferons des souris femelles immunodéficientes Nude avec des lignées cellulaires humaines de cancer du sein et les traitements par les anticorps seront administrés en monothérapie puis en combinaison avec des traitements de chimiothérapie ou d'hormonothérapie. Ces modèles de souris nude sont les mieux adaptés pour étudier l'impact anti-tumoral et anti-métastatique de nouveaux anticorps dans la pathologie cancéreuse mammaire humaine.

Le plan expérimental a été conçu pour chacune des deux cibles (cathepsine D et SPARC) en prenant en compte la règle des 3R.

-Remplacement : ce projet sur un système vivant est nécessaire pour valider nos observations sur cultures cellulaires. En effet il n'est pas possible de recréer in vitro la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs rentrant en jeu dans les réponses aux traitements avec des anticorps ou de la chimiothérapie.

-Réduction : Les expériences sur les animaux ont été précédées de nombreuses expériences réalisées sur des lignées cellulaires. Ces mises au point in vitro nous permettent de réduire le nombre d'animaux à utiliser dans les expériences avec les souris. Le nombre d'animaux sera réduit au minimum tout en ayant un nombre suffisant pour obtenir des résultats statistiquement fiables. A cause des variabilités inter-animales et intergroupes, un nombre trop restreint d'animaux risquerait d'engendrer des résultats trop variables et non valides.

-Raffinement : Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures ont été mises au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal. Les points limites ont été établis dans la procédure expérimentale et le suivi clinique des animaux se fera sur la base de la fiche de scoring établie par la SBEA. Les souris seront surveillées quotidiennement y compris les week-ends et jours fériés et ceci dans le but de suivre le développement de la tumeur, celle-ci ne devant pas excéder 20% du poids normal de l'animal, et détecter le moindre signe de souffrance et/ou de détresse de l'animal. L'hébergement est modifié par enrichissement du milieu et le nombre d'animaux par cage sera limité.

Pour l'ensemble du projet nous avons prévu un nombre de souris Nude de 2548 au maximum et de 1924 au minimum pour une durée de 5

ans, ce qui correspond à environ 510 souris Nude par an. Ces souris sont immunodéficientes ce qui permet de réaliser des xénogreffes de tumeurs humaines dans un modèle murin sans rejet par le système immunitaire. Elles constituent donc le meilleur modèle pour des études de croissance tumorale et de formation de métastases à partir de greffes de tumeurs humaines.

19463 Notre projet de recherche vise à mieux comprendre les mécanismes pathophysiologiques responsables du dérèglement de l'activité neuronale et des déficits cognitifs observés dans le Syndrome de Dravet.

Les canaux ioniques sont des protéines de la membrane cellulaire qui permettent les échanges des ions entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Ces échanges sont à la base de l'activité des neurones. Notre projet de recherche concerne plus particulièrement les canaux ioniques sélectifs au sodium et dépendants du potentiel (Nav). Ces derniers sont responsables de la genèse et de la propagation du potentiel d'action. De nombreuses mutations observées sur plusieurs types de canaux ioniques sont responsables des différentes formes génétiques d'épilepsie souvent graves, pharmaco-résistants et présentant des déficits cognitifs parmi lesquelles on trouve le Syndrome de Dravet. Ce syndrome est caractérisé par des symptômes très sévères incluant des crises épileptiques spontanées ou déclenchées par l'hyperthermie, des déficits du comportement social et de la cognition, des troubles de la motricité et un risque très élevé de mortalité.

L'impact fonctionnel de plusieurs mutations sur l'activité des canaux ioniques a jusqu'à présent été étudié surtout dans des cellules non neuronales, ce qui a abouti à des résultats controversés car les conditions expérimentales ne reproduisent pas les conditions pathophysiologiques. Afin de pallier à ce problème, notre groupe s'intéresse à l'effet de ces mutations, dans plusieurs modèles et avec des approches expérimentales variées, reproduisant les conditions physiopathologiques et préservant la diversité et les propriétés des réseaux neuronaux. Afin de réduire au maximum l'utilisation des animaux, nous étudions les courants ioniques à partir de cultures neuronales *in vitro* exprimant les canaux mutés pour comprendre leurs changements de fonctionnalité. Afin de comprendre comment ces mutations modifient la coordination des neurones entre eux, nous réalisons également des études intégrées dans des réseaux neuronaux sur des tranches de cerveau *ex vivo*, ce qui réduit le nombre d'animaux utilisé (plusieurs tranches utilisées pour chaque animal). Cependant, les études des phénotypes générés par les mutations et le développement de stratégies thérapeutiques nécessitent des expérimentations *in vivo*.

Nous proposons dans ce projet d'étudier l'implication d'une sous-population neuronale (les interneurons GABAergiques) dans le développement des symptômes du Syndrome de Dravet à travers deux approches complémentaires : 1) On utilisera une technique d'inhibition ciblée de cette population neuronale (inhibition optogénétique). Cette technique permet d'utiliser la lumière pour activer ou inhiber des populations spécifiques de neurones modifiées génétiquement pour y être sensible. Dans notre cas, l'inhibition des interneurons GABAergiques devrait reproduire les altérations cellulaires typiques du syndrome de Dravet et nous permettra donc de tester si ces altérations sont suffisantes à induire les symptômes typiques de cette pathologie (crises et déficits cognitifs) ; 2) On utilisera la même technique pour re-activer spécifiquement la même population neuronale chez un modèle génétique murin du syndrome de Dravet, pour tester si cette intervention est capable de corriger, au moins partiellement, le phénotype des souris.

Ce projet prendra en compte la règle des 3Rs. En particulier, comme précédemment mentionné, notre équipe utilise des techniques complémentaires (cultures neuronales, enregistrements sur tranches) qui limitent le recours à l'expérimentation animale au cas où elle n'est pas remplaçable. Le nombre d'animaux sera réduit au minimum, en conservant un nombre suffisant pour obtenir des statistiques fiables. A la fin des différentes procédures les animaux seront sacrifiés dès que possible afin de faire des études d'histologie et de limiter les colonies. Toutes procédures expérimentales seront visées à réduire au minimum la souffrance des animaux et améliorer leur qualité de vie. Notamment, en plus des actions préventives comme par exemple la mise en place d'un protocole antalgique péri-chirurgical, pendant les expériences une surveillance quotidienne des souris permettra d'évaluer leur état de santé, détecter tous signes de souffrance et de mettre en place les réactions plus appropriées.

Pour ce projet nous prévoyons l'utilisation d'un nombre maximal de 574 souris sur une période de 5 ans. A terme, ces études vont améliorer notre connaissance des mécanismes impliqués dans l'épilepsie et devraient permettre la mise au point de traitements ciblés et efficaces des crises d'épilepsies qui font actuellement défaut.

19464 Notre technologie basée sur l'infidélité de la transcription permet d'induire des anticorps spécifiques efficaces contre leur cible. Le but de ce projet est double. L'injection de protéines modifiées permet la production d'anticorps fonctionnels très rapidement. Les anticorps ne sont mesurables dans le sérum qu'à partir de 7 jours après injection, mais nous soupçonnons la présence de ces anticorps fonctionnels bien avant leur mesure dans la circulation sanguine. Afin de vérifier leur fonctionnalité nous avons imaginé un modèle de diabète chez la souris. Des protéines d'insuline modifiées vont être produites et purifiées. Ces protéines seront injectées aux souris. Les anticorps produits par la souris en réponse à l'injection de protéines modifiées seront donc dirigés contre l'insuline, ainsi la glycémie sera modifiée, seulement si ces anticorps sont fonctionnels. C'est ce que nous souhaitons montrer. Ce projet servira donc à répondre à deux hypothèses :

1. Les protéines modifiées grâce à cette technologie permettent-elles d'induire des anticorps spécifiques et efficaces très rapidement ? L'augmentation de la glycémie dans cette étude montrera l'efficacité des anticorps à bloquer l'insuline, ainsi nous pourrions suivre l'efficacité de ces anticorps avant de pouvoir les doser dans la circulation. Si ces anticorps sont spécifiques et efficaces, le même procédé pourra être appliqué contre des antigènes du SARS-CoV-2, virus responsable de la pandémie de COVID-19.

2. Un modèle de souris diabétiques peut-il être mis au point en utilisant cette technologie ? Cette technologie pourra alors être approfondie et être utilisée pour créer d'autres modèles utiles à la recherche médicale.

Pour ce projet, les protéines seront injectées aux souris selon deux protocoles. Un protocole long ou des fortes doses de protéines seront injectées tous les 14 jours par voie intrapéritonéale et un protocole court ou de très petites doses de protéines seront injectées 2 fois par jour pendant 7 jours. La glycémie de ces souris sera suivie en prélevant régulièrement une toute petite quantité de sang, comme chez l'homme, à l'aide d'un glucomètre.

Nous projetons d'utiliser 456 souris adultes femelles, ce nombre pourra être revu à la baisse en fonction de la production des différentes protéines et des premiers résultats obtenus (si à la plus forte dose, certaines protéines entraînent pas la production d'anticorps efficaces, ces protéines ne seront pas testées à des doses plus faibles).

Toutes les souris seront identifiées par une bague à l'oreille. Les protéines seront injectées par voie intrapéritonéale, de petits prélèvements sanguins seront effectués afin de doser la glycémie et pour récolter du sérum dans le but de doser les anticorps spécifiques. Les souris seront mises à jeun 6h avant la mesure de la glycémie.

Les souris seront hébergées par groupe de 6 souris dans des cages adaptées, elles auront accès à l'eau et la nourriture. Les cages seront enrichies une semaine avec un tunnel, puis une semaine avec un igloo en plastique rouge transparent. La production et l'efficacité des anticorps ne peuvent pas être étudiées *in vitro* (remplacement), et le nombre de souris prévues pour ce protocole est nécessaire et suffisant pour pouvoir exploiter toutes les pistes (réduction). L'injection de protéines modifiées pour induire des anticorps spécifiques a déjà fait l'objet d'études chez les souris BalbcByJ, et tout sera mis en œuvre pour assurer leur bien-être (raffinement). Les souris seront maintenues dans un cycle jour/nuit de 12h à une température et une hygrométrie comprise entre 20 et 24°C, 35 et 75% humidité. Un contrôle visuel sera effectué tous les jours. En cas de piloérection, ventre rentré, blessure non soignable, perte de poids >15% en 2 jours, perte d'équilibre, déplacement circulaires ou difficiles, tremblements, les souris seront mises à mort par une méthode réglementaire.

19465 Ce projet vise à évaluer s'il est possible de suivre dans le temps les modifications de structure et de fonction du cœur par imagerie après un infarctus du myocarde expérimental induit chirurgicalement chez la souris en ligaturant une artère nourricière appelée artère coronaire.

Pour mener ce projet, nous avons dans un premier temps mis en place dans notre laboratoire un modèle d'infarctus du myocarde chez la souris, et l'imagerie cardiaque chez le petit animal a été développée dans un laboratoire partenaire. Le présent projet vise à caractériser les modifications cardiaques post-infarctus par imagerie en alliant ces deux techniques et les compétences de ces deux laboratoires.

Dans notre laboratoire, les animaux seront soumis à un infarctus du myocarde qui sera induit par ligature d'une artère coronaire, soit permanente soit transitoire (durée 45 min), chez l'animal placé sous anesthésie. Cette ligature entraînera la mort d'une partie ou de la totalité des cellules cardiaques irriguées par cette artère, reproduisant la situation physiopathologique observée chez l'Homme. La procédure expérimentale s'accompagnera d'une couverture analgésique et d'un suivi rigoureux de la récupération des animaux.

Après un certain temps de récupération post-infarctus de 48 h, 7 jours ou 28 jours, les animaux seront transférés dans un autre établissement où l'imagerie cardiaque sera réalisée.

Un maximum de n= 60 souris est prévu selon l'organisation suivante :

Dans une première étape, 3 temps d'imagerie cardiaque post-infarctus sont prévus à 48 h, 7 j et 28 j post-opératoire ce qui requerra l'utilisation de n=12 souris par temps, soit n=36 souris. Si la caractérisation du modèle est validée l'étude s'arrêtera. Si des mesures plus fines à des temps intermédiaires sont requises, 2 temps supplémentaires seront examinés soit n=24 souris supplémentaires (ces temps seront déterminés en fonction des résultats obtenus).

La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R. Tout d'abord, la construction de l'étude en 2 étapes permettra de réduire le nombre d'animaux dans le cas où l'étape 2 ne soit pas nécessaire. Le raffinement a été pris en compte : la procédure est réalisée sous anesthésie générale suivie d'un réveil sous lampe chauffante réduisant l'inconfort potentiel à son minimum. L'utilisation d'analgésiques pendant et après la procédure chirurgicale est également prévue. Les animaux seront placés en cage collective, avec un milieu enrichi pour limiter leur stress. L'étude du fonctionnement cardiaque rend la règle de remplacement difficilement applicable puisqu'il est nécessaire d'étudier le cœur dans son environnement nerveux et hormonal. Pour finir, des points limites sont clairement définis pour favoriser le bien-être animal et limiter d'éventuelles souffrances liées aux expérimentations.

19466 L'ambition scientifique du projet est, d'une part d'optimiser l'aspect nutritionnel afin d'améliorer la croissance des animaux et de maintenir la qualité du produit final, d'autre part de maintenir les défenses et le bien-être des animaux à un niveau satisfaisant pour assurer une bonne croissance.

Le développement d'additifs alimentaires comme les enzymes a pour objectif l'amélioration de la nutrition des volailles. Les enzymes phytasiques ont pour but d'améliorer la valeur nutritive des ingrédients utilisés dans les aliments pour animaux d'élevage en termes d'apport phosphoré. Le phosphore (P) est déterminant pour la croissance des animaux monogastriques et se trouve au cœur des enjeux de productivité. Dans les matières premières d'origine végétale utilisées en alimentation animale, le P est essentiellement présent sous forme de phosphore phytique (phytates). Or, cette forme de P est mal absorbée par les volailles et la majeure partie est éliminée via les excréta sans être utilisée. La démarche la plus efficace pour réduire l'excrétion de P consiste, d'une part à améliorer la digestibilité du P phytique de la ration alimentaire par l'ajout de phytase d'origine microbienne pour réduire les apports de P minéral dans la ration alimentaire, et d'autre part à mieux ajuster les besoins en P des principales espèces de volailles à différents âges et stades physiologiques afin de maximiser les performances et/ou la minéralisation osseuse.

Une meilleure utilisation des aliments contribuera ainsi à réduire l'impact environnemental de la production animale, en assurant une meilleure rétention des nutriments réduisant le besoin de supplémentation en phosphore (P).

Le développement d'additifs alimentaires passe nécessairement par une étape d'enregistrement des dits additifs auprès des autorités compétentes. A cet effet, certains types d'études doivent donc être menés, selon des modalités propres à chaque organisme d'autorisation, par exemple l'EFSA en Europe ou CVM/FDA aux Etats-Unis d'Amérique. Malgré des différences notoires dans les attentes des différents organes de régulation, il est possible de séparer les essais en deux grandes catégories, des essais d'efficacité visant à démontrer l'utilité d'un produit d'une part, et les essais de tolérance visant à démontrer son innocuité à la dose recommandée ou à des surdoses d'autre part.

Le présent projet a pour objectifs principaux :

- de contribuer à la découverte de nouvelles phytases comme additif alimentaire.
- de réaliser des études d'efficacité et de tolérance pour l'enregistrement de ces additifs.
- de rechercher de nouvelles applications pour les additifs déjà enregistrés.
- de comparer l'efficacité des additifs développés par notre établissement avec ceux du marché.
- d'identifier les modes d'action et effets annexes des phytases.

Les études d'efficacité sont réalisées en utilisant des molécules ou mélanges de molécules le plus souvent précédemment identifiées lors d'un criblage in vitro. Il convient de noter que le criblage in vitro peut avoir été réalisé en interne, au sein du centre de recherche, mais peut également avoir eu lieu en partenariat avec des universités ou des instituts de recherche tiers, publiques ou privés.

Les études in vivo vont mettre en œuvre diverses approches scientifiques, et faire appel à des procédures entraînant notamment une carence nutritive réalisée en alimentant les animaux avec un régime déficient en phosphore et autres minéraux. Ces études vont permettre d'évaluer les effets des additifs sur la croissance, la digestibilité des nutriments et des minéraux, le bilan nutritionnel. Ces études peuvent être réalisées en amont de celles visant à démontrer l'innocuité du produit.

L'évaluation de différents candidats ayant un potentiel de mise sur le marché se fera au niveau du laboratoire et par des études en expérimentation animale au sein du centre de recherche en nutrition animale, selon des protocoles établis et suivant des procédures expérimentales définies en fonction de l'objectif à atteindre au sein du projet.

La comparaison avec d'autres additifs déjà présents sur le marché ou en développement est réalisée lors de tests d'efficacité similaires à ceux utilisés dans le cadre de la découverte de nouveaux additifs.

Le projet s'étend sur 5 années, dans le but d'évaluer, de tester et de développer différentes conditions d'optimisation de l'efficacité de la phytase destinée aux volailles et prévoit l'utilisation de 46750 volailles. Lors du processus de développement et d'enregistrement de cet additif, il est indispensable de tester son efficacité sur l'animal auquel il est destiné, cela afin d'en démontrer l'efficacité et l'innocuité auprès des autorités habilitées à délivrer une autorisation de mise sur le marché. Le projet est conduit dans le respect de la règle des 3R avec comme mesure de raffinement le suivi quotidien de l'état de santé des animaux avec l'observation de points limites adaptés et attendus, des conditions d'hébergement des animaux définies de telle sorte que l'enrichissement des cages (clochettes, miroirs, petites balles ...), la densité des animaux par cage, ou encore les paramètres environnementaux (température et hygrométrie...) procurent le maximum de confort aux animaux, et restent supérieurs ou égaux à la législation en vigueur (Arrêté du 01/02/2013).

Au suivi quotidien de l'état de santé des animaux sera pris en compte l'observation de points limites adaptés et attendus, notamment d'éventuels signes de perte de poids, de mobilité, et de troubles locomoteurs. Aucun animal ne reste isolé en cage individuelle sans contact olfactif, auditif et visuel avec ses congénères, ceci afin de réduire au minimum l'angoisse et le stress des animaux.

19467 Les sarcomes regroupent l'ensemble des tumeurs des tissus mous. Ces tumeurs sont hétérogènes sur le plan anatomopathologique, génétique et clinique. De nombreux sarcomes restent difficiles à traiter chez l'homme, et seule la chirurgie précoce peut contrôler leur évolution. Ces tumeurs sont relativement radio résistantes, échappent rapidement aux chimiothérapies et sont souvent peu sensibles à l'immunothérapie. La recherche de gènes associés à la gravité ou la protection vis-à-

vis de ces tumeurs est donc essentielle. Nous avons montré qu'une nouvelle molécule se comportait comme un suppresseur de tumeur dans un modèle murin de sarcome, en modulant l'importance de voies métaboliques mitochondriales. La manipulation pharmacologique de ces voies métaboliques est envisagée comme stratégie thérapeutique complémentaire aux traitements existants. Nous proposons de mettre au point un nouveau protocole thérapeutique dans un modèle de sarcome de souris.

Afin de respecter la règle des 3R et avant de lancer un nouveau projet chez la souris, nous avons mené une approche bioinformatique chez des patients atteints de sarcomes qui a renforcé la valeur prédictive de l'observation faite chez la souris. Des expériences d'analyse métabolique in vitro ont permis de réduire la nature des expérimentations à conduire in vivo. Cependant le retour à un modèle de souris est incontournable car notre hypothèse de travail repose sur une perturbation des interactions métaboliques intervenant au sein du microenvironnement tumoral entre tumeurs et cellules immunitaires, difficilement transférable in vitro. Les souris sont hébergées par cage de 5, en présence de matériaux permettant la fabrication d'un nid. 600 souris seront utilisées dans ce projet. Le temps expérimental est de 4 semaines suite à l'injection de tumeurs par voie sous cutanée, avant la mise à mort pour analyse des tissus. L'anesthésie est utilisée pour toute manipulation des animaux. L'analgésie n'est pas appropriée pendant le temps d'observation. En effet, les tumeurs ont un développement externe, non compressif qui n'affecte pas le comportement des animaux pendant la durée de l'expérience. Nous utiliserons une lignée de sarcome pour tester la synergie entre l'immunothérapie et une stratégie de reconditionnement du métabolisme tumoral dans un sens bénéfique à l'hôte. Nous proposons le repositionnement de médicaments utilisés en pratique clinique dans des indications très différentes mais qui en association pourrait récapituler l'effet biologique observé. Si des résultats encourageants étaient obtenus chez la souris, cela pourrait ouvrir de nouvelles pistes thérapeutiques applicables à des patients.

19468 La pollution atmosphérique est un facteur de risque important pour la santé humaine. Cependant le risque varie en fonction des individus, d'où l'importance d'identifier les sujets les plus vulnérables.

Les données épidémiologiques associent l'exposition à la pollution au risque de développer une obésité, les mécanismes de cette association ne sont pas bien connus mais peuvent être expliqués en partie par des changements comportementaux, notamment moins d'activité physique, moins de marche pour aller au travail ou à l'école, moins de sommeil et plus de consommation de graisses. D'autre part le tissu adipeux est capable de capter et retenir les polluants puis de les relarguer en systémique en cas de régime ce qui pourrait avoir des effets bénéfiques ou délétères sur les autres organes naturellement impactés par la pollution.

Nous concentrerons notre analyse sur le cœur et le muscle squelettique, notre domaine d'expertise, notamment parce que les effets aigus de la pollution atmosphérique se traduisent par des événements cardiovasculaires, tandis que les effets à long terme se manifestent dans d'autres tissus, comme le muscle squelettique. Par ailleurs, des études épidémiologiques et toxicologiques ayant démontré que l'âge peut influencer sur la sensibilité à la pollution, nous conduirons notre analyse chez le sujet juvénile et chez le jeune adulte.

Afin d'étudier ces possibles effets opposés, nous utiliserons un modèle expérimental d'obésité induite qui sera également exposé à la dioxine, un polluant organique, et ce afin d'évaluer les effets protecteurs (capacité de rétention de ce polluant) (procédure 1) ou au contraire les effets néfastes (recirculation systémique du polluant suite à un régime)(procédure 2) de la masse grasse sur le cœur et le muscle. Ceci nous permettra dans un second temps d'identifier les voies de signalisation moléculaire en relation avec les effets observés afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Ce programme de recherche permettra de déterminer si l'obésité et l'âge peuvent exercer un rôle protecteur ou au contraire prédisposer à des anomalies induites par la pollution. Les données issues de cette recherche contribueront à développer des interventions préventives adaptées aux personnes vulnérables.

Cette étude utilisera un maximum de 990 animaux réparties sur 2 procédures expérimentales. Tout au long de nos procédures, la règle des 3R sera respectée :

1) Remplacer : quand l'observation le permet, une approche préalable de remplacement par l'utilisation de cultures cellulaires est employée, ce qui permet par la suite de réduire le nombre d'expériences incontournables réalisées sur l'animal. L'évaluation de l'action combinée du vieillissement et des troubles métaboliques sur le développement d'une cardiomyopathie et l'exploration des phénomènes physiopathologiques conduisant à l'altération de la fonction myocardique nécessite une standardisation précise des conditions pathogéniques, qui est impossible à réaliser *in vitro*. De plus, nous utilisons ici une approche génétique qui permet la manipulation des voies de signalisation directement dans l'environnement physiologique de nos cellules d'intérêt.

2) Réduire : nous utiliserons le nombre minimum nécessaire d'animaux pour avoir une bonne puissance statistique de l'étude et des réponses aux questions posées. En effet, les protocoles expérimentaux chez la souris sont établis afin de pouvoir minimiser le nombre d'animaux soumis à expérimentation tout en conservant une masse suffisante pour assurer la reproductibilité et la cohérence statistique des observations, en s'efforçant d'utiliser tous les animaux issus des croisements, si possible. De plus, nous limiterons notre analyse aux modèles les plus couramment utilisés par la communauté scientifique, en excluant les autres modèles disponibles et nous collaborons avec une autre équipe de notre institut pour étudier différents tissus du même animal en évitant le double emploi des animaux. Enfin, nous ne lancerons la deuxième procédure de l'étude (voies de signalisation moléculaires) que si nous avons de bons résultats suite à la première procédure.

3) Raffiner : afin d'affiner les procédures, nous avons établi des points limites. Un examen clinique des animaux sera effectué quotidiennement ou toute les semaines selon le plan des procédures. Tout signe témoignant d'une mauvaise tolérance au traitement (par exemple perte de poids, souffrance, apathie, déshydratation des animaux) conduira à l'interruption de la procédure. Les animaux sont maintenus en groupes sociaux leur permettant d'exprimer leurs besoins avec leurs congénères et les cages sont enrichies avec une maison en plastique et du papier craft pour leur permettre de nicher.

19469 L'infection urinaire masculine, fréquemment appelée prostatite, est souvent présentée comme l'association d'une fièvre et de symptômes du bas appareil urinaire (brûlures mictionnelles, envie fréquente d'uriner, impossibilité d'uriner). Source d'hospitalisation chez des patients de plus en plus âgés, des difficultés thérapeutiques apparaissent de plus en plus fréquemment par la complexité des bactéries pathogènes rencontrées et notamment l'augmentation des résistances. L'infection urinaire masculine, bien que présentée parfois comme une pathologie « commune » est pourtant fréquemment source d'infections graves et parfois, en l'absence de prise en charge urgente, mortelles si passage de la bactérie dans le sang. Une meilleure efficacité des traitements dans la prise en charge des infections urinaires masculines débute dans un premier temps par une meilleure compréhension de la distribution des antibiotiques au sein du tissu prostatique infecté. La témocilline est un des antibiotiques fréquemment utilisé dans le traitement des infections urinaires compliquées. Dans le domaine différent des chirurgies d'ablation de la prostate (prostatectomie), les recommandations officielles suggèrent un traitement antibiotique préventif (prophylactique) à base de céfazoline afin de limiter le risque infectieux urinaire. L'efficacité des traitements curatifs est traditionnellement évaluée à partir des concentrations plasmatiques des antibiotiques, or les infections sont généralement localisées dans les tissus et les concentrations tissulaires des antibiotiques ne sont pas systématiquement superposables aux concentrations plasmatiques. De plus, pour les traitements prophylactiques, les choix des antibiotiques et des doses administrées sont empiriques. La microdialyse tissulaire, et dans le cas présent prostatique, est une technique permettant d'étudier la distribution tissulaire des antibiotiques administrés aussi bien à titre curatif que préventif. Elle peut être réalisée de manière indifférenciée chez l'animal et chez l'homme afin d'apporter une information essentielle à l'optimisation posologique des traitements.

L'objectif de ce projet est donc de déterminer la distribution prostatique de la céfazoline et de la témocilline par microdialyse chez le rat sain (pour les deux antibiotiques) et infecté par une prostatite à entérobactérie (uniquement pour la témocilline) et de comparer ces concentrations prostatiques aux concentrations de témocilline et céfazoline obtenues après homogénéisation de la prostate (technique empirique mais toujours de référence).

Le nombre d'animaux nécessaire pour ce projet est de 116 au total.

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

-«Remplacer» : La distribution pharmacocinétique systémique et/ou tissulaire d'un médicament ne peut pas être évaluée par des méthodes *in vitro*. Elle peut être cependant évaluée par quelques méthodes *ex-vivo* mais qui nécessite aussi l'utilisation d'animaux pour les prélèvements d'organes.

-«Réduire». La technique de microdialyse est une technique qui peut être utilisée dans plusieurs tissus pour un même animal et qui permet en plus de réaliser de nombreuses mesures de concentration dans un tissu et ceci sur le même animal. L'utilisation de cette technique permet d'obtenir des données pharmacocinétiques très riches en limitant le nombre d'animaux utilisés. De plus, une étude statistique a été utilisée afin de réduire au maximum le nombre d'animaux permettant d'obtenir une puissance statistique suffisante dans le traitement des résultats.

-«Raffiner». Les animaux infectés et leurs contrôles sont respectivement hébergés dans un environnement confiné enrichi (rouleaux de papier, bâtonnets à ronger) pour la témocilline et dans un environnement conventionnel enrichi pour la céfazoline avec accès "ad libitum" à l'eau et à la nourriture. Les techniques chirurgicales sont réalisées sous anesthésie sous une analgésie pré-opératoire et post-opératoire (buprénorphine), avec un contrôle de paramètres vitaux tels que la température corporelle, la fréquence respiratoire. Le suivi des animaux permettant d'identifier des signes de souffrance post infection, caractérisés par l'état du pelage, le comportement du rat, la perte de poids (. . .) sera également réalisé. L'ensemble de ses signes sera collecté dans une grille d'évaluation du bien être animal engendrant des prises de décisions comme l'addition d'une dose d'analgésique supplémentaire si nécessaire.

19470 L'objectif de ce projet est de visualiser en imagerie TEP/TDMX le passage de 5 peptides d'intérêt radiomarqués de la circulation sanguine vers leur cible localisées dans le cerveau, chez la souris MRL/lpr, modèle murin du lupus. Le lupus est une maladie auto-immune complexe et au diagnostic difficile. Inflammatoire, chronique, c'est une affection qui touche majoritairement les femmes et dont les symptômes et leur gravité varient beaucoup d'une personne à l'autre. Les atteintes peuvent être dermatologiques, rhumatologiques, rénales, mais également cérébrales (chez au moins 75% des patients). Cette forme délicate de la maladie, encore très mal connue, constitue le lupus neuropsychiatrique ou neurolupus. Des anomalies structurelles au niveau cérébral sont observées chez les patients et pourraient être à l'origine des perturbations cognitives observées. 5 peptides seront testés au cours de ce protocole de recherche. L'un d'entre eux est déjà en phase clinique mais des études approfondies sont encore nécessaires pour comprendre son mécanisme d'action.

Nous désirons poursuivre ces recherches en complétant les études précédentes déjà réalisées sur ce modèle, en regardant si les 5 peptides peuvent pénétrer dans le cerveau par le biais de ruptures de l'intégrité de la membrane qui isole le cerveau de la circulation sanguine. Cette maladie étant évolutive, nous étudierons les effets des peptides à 2 âges différents des souris, à savoir 11 et 17 semaines. En effet, ce passage pourrait être différent selon l'âge des animaux et donc de l'évolution de cette maladie. Nous tenterons de localiser cette accumulation grâce à l'utilisation de l'imagerie fonctionnelle nucléaire (TEP) couplée à l'imagerie anatomique (TDMX).

Chaque peptide sera testé sur les souris MRL/lpr, MRL +/- (souris contrôles) et sur un groupe témoin de souris saines BALB/c à raison de 10 souris par groupe et à 2 âges différents, ce qui fait un total de 300 souris sur 5 ans.

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

-Réduire: Nous n'utiliserons que 10 animaux par groupe, 10 étant le minimum pour pouvoir faire des études statistiques dans ce modèle qui présente une grande variabilité inter-individuelle. De

plus, l'imagerie TEP/TDMX nous permet de suivre un même animal plusieurs fois au cours du temps, ce qui réduit le nombre d'animaux à inclure.

-Raffiner: Enrichir l'environnement des animaux avec des tubes en plastique qui servent de refuge aux animaux et permet ainsi de diminuer leur stress. De la ouate de cellulose et de la frisure sont également déposés dans les cages pour favoriser leur motricité et leur permettre de faire des nids. Les souris seront hébergées à 5 par cage afin de respecter les interactions sociales de ces animaux. Durant les séances d'imagerie, les animaux sont maintenus dans une ambiance chauffée, leur fréquence respiratoire et température corporelle suivis en direct pour déceler des signes précoces d'inconfort. Les animaux sont observés quotidiennement par du personnel qualifié à l'aide d'une grille d'observation.

-Remplacement : l'objectif du travail est de visualiser la localisation cérébrale des récepteurs de ces peptides en utilisant des ligands radiomarqués en imagerie fonctionnelle TEP. Ces études ne peuvent être réalisées invitro.

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

19471 Les maladies mitochondriales touchent environ une personne sur 5000 dans le monde et regroupent un ensemble de maladies génétiques en lien avec un dysfonctionnement de la mitochondrie. Cette dernière est l'organite impliquée dans la synthèse d'ATP, permettant de fournir de l'énergie aux cellules de l'organisme. Les maladies mitochondriales peuvent affecter un ou plusieurs organes, et en particulier ceux ayant des besoins énergétiques importants tels que le cerveau ou les muscles.

Les manifestations cliniques de ces maladies surviennent à n'importe quel âge, avec une grande variabilité en fonction de la localisation ou de l'étendue des défauts. Les signes les plus fréquents sont des problèmes neurologiques (retard intellectuel, problèmes de coordination motrice, épilepsie), une faiblesse musculaire, des problèmes cardiaques et hépatiques ainsi qu'une diminution de la vision et de l'audition.

La maladie mitochondriale à laquelle nous nous intéressons est le syndrome de Leigh, affectant environ 1 naissance sur 40 000 et conduisant au décès durant les premières années de vie. Elle se caractérise par la présence de multiples lésions cérébrales qui se manifestent par des signes neurologiques typiques des maladies mitochondriales (convulsions, ataxie, paralysies, ophtalmoplégie, retard intellectuel) et des désordres respiratoires. En plus de l'atteinte prépondérante du système nerveux central, les patients peuvent également présenter des problèmes cardiaques ou musculaires.

La stratégie la plus directe pour traiter les maladies génétiques est de remplacer le gène défectueux par sa version saine. Pour cela, on utilise des particules virales qui transportent le gène dans l'organisme. Cependant, tout comme les médicaments, la plupart des vecteurs viraux, utilisés pour transporter le gène sain dans l'organisme ne peuvent pas passer dans le cerveau à cause d'une barrière naturelle créée par les vaisseaux sanguins. L'expression du gène sain ne peut donc pas être restaurée dans le cerveau ce qui constitue une limite majeure lorsque les maladies génétiques affectent celui-ci.

Des études ont récemment montré sur un modèle murin du syndrome de Leigh, qu'une thérapie génique utilisant un vecteur viral capable de traverser cette barrière et donc de restaurer l'expression du gène défectueux dans une grande partie de l'organisme, et en particulier dans le cerveau, permettait de corriger la pathologie. Cependant, il a récemment été démontré que ce vecteur viral pouvait traverser la barrière chez certaines espèces de souris mais pas chez l'homme.

La recherche de méthodes permettant le passage d'agents thérapeutiques à travers cette barrière, et applicable chez l'humain, constitue donc un vrai challenge et de nouvelles stratégies sont actuellement développées. L'une d'elle, les ultrasons focalisés, consiste à augmenter temporairement la perméabilité de cette barrière afin de permettre à l'agent thérapeutique injecté dans la circulation sanguine de pénétrer dans le cerveau. Cette augmentation de perméabilité est totalement réversible et ne provoque pas de dommages au tissu cérébral. Cette nouvelle technique

a donc un fort potentiel thérapeutique que nous souhaitons exploiter dans le cadre de maladies génétiques.

L'objectif de ce projet est donc d'utiliser cette méthode pour faire passer le vecteur viral dans le cerveau afin de restaurer l'expression du gène défectueux dans un modèle murin du syndrome de Leigh et évaluer l'efficacité thérapeutique.

Le nombre total d'animaux prévu pour cette étude (5 procédures expérimentales) est de 380

Réduction: Ce nombre d'animaux a été déterminé afin d'obtenir des résultats standardisés et reproductibles en réduisant au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées.

Raffinement: Les procédures seront effectuées sous anesthésie générale avec une prise en charge antalgique adéquate. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à des signes cliniques codifiant le niveau de bien-être. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée si des signes de souffrance apparaissent.

Remplacement: Le projet a pour but d'évaluer l'efficacité d'une thérapie génique en suivant l'évolution de marqueurs pathologiques au cours de l'évolution de la maladie et met en oeuvre plusieurs approches comportementales. De ce fait, il est impossible de remplacer notre modèle animal vivant par un modèle cellulaire ou une simulation computationnelle.

19472 Le lait maternel est la référence pour l'alimentation du nouveau-né puisqu'il est parfaitement adapté à ses besoins. Les préparations pour nourrisson (PPN) sont aujourd'hui l'alternative lorsque l'allaitement n'est pas possible ou souhaité. Il est donc essentiel que la qualité des PPN soit optimale afin d'assurer une croissance et un développement adéquat du nouveau-né.

Si la qualité des PPN est en constante progression sur le plan de la composition, leur efficacité nutritionnelle et physiologique doit encore être mieux appréhendée. En effet, il apparaît primordial de se rapprocher des propriétés fonctionnelles du lait maternel pour obtenir les mêmes bénéfices santé, en particulier sur la digestion, la croissance, le développement du système immunitaire ou encore le développement cérébral et moteur du nourrisson.

Au cours de leur fabrication, les PPN sont soumises à des procédés technologiques incluant des procédés spécifiques d'obtention des matrices protéiques selon leur origine et des traitements thermiques garantissant leur bonne conservation et leur sécurité sanitaire. Ces procédés ont dans leur globalité un impact sur la fraction protéique (caséique et sérique) notamment d'un point de vue structurel.

Ce projet a pour objectif d'étudier l'impact des procédés et/ou de la matière première utilisée sur les qualités nutritionnelle et physiologique des fractions protéiques afin d'optimiser la fabrication des PPN.

Ce projet comprend 2 étapes :

- L'objectif de la première étape est d'évaluer l'utilisation digestive des PPN en caractérisant les profils plasmatiques (acides aminés et glucides) post-prandiaux associés à l'ingestion de 4 PPN qui différeront par la nature et le procédé d'obtention des matières premières protéiques utilisées. L'expérimentation reposera sur un effectif de 24 porcelets qui recevront successivement les 4 préparations pour nourrisson.

- La deuxième étape visera à évaluer les effets de la composition et de la structure de la fraction protéique des PPN sur la physiologie digestive. Elle nécessitera un effectif de 56 porcelets (n = 14 animaux par PPN).

Le protocole des interventions in vivo a été élaboré dans le respect de la règle éthique des 3 R : (1) Remplacer : le projet s'intéressant à des réponses biologiques, l'utilisation d'un modèle animal vivant est indispensable. Le porcelet a été choisi de par sa proximité physiologique avec le nourrisson ; (2) Réduire : les effectifs (nombre total = 80) ont été fixés a minima afin de permettre une évaluation statistiquement significative des effets attendus (réponses physiologiques) ; (3) Raffiner : les compétences et expériences des expérimentateurs garantissent le respect du bien-

être animal. Des points limites ont été établis, entraînant la sortie de protocole ou l'euthanasie anticipée de l'animal en cas de nécessité.

19473 L'hidradénite suppurée (HS) est une maladie inflammatoire chronique de la peau qui affecte 1% de la population française. Les lésions se présentent sous forme d'abcès et de fistules très douloureux dans les zones riches en poils notamment les aisselles et la zone périnéale. Il s'agit de la pathologie dermatologique qui présente le retentissement le plus important sur la vie psycho-affective et socio-professionnelle du patient. La physiopathologie de l'HS est mal connue, cependant une atteinte du follicule pileux est à l'origine de la maladie. 10 % des patients HS présentent des mutations dans le gène codant pour la nicastrine (gène impliqué dans la maladie). Les cellules en culture qui ont des mutations dans le gène de la nicastrine présentent des anomalies de la prolifération cellulaire similaires à celles observés chez les patients HS.

Ce projet a pour but de développer un nouveau modèle animal de l'hidradénite suppurée (HS) en ciblant le gène responsable de la maladie chez l'homme, la nicastrine, dans des cellules du follicule pileux. A l'heure actuelle, il n'existe aucun modèle animal qui récapitule la maladie. Les souris devraient présenter des anomalies au niveau des follicules pileux à type de kystes épidermiques. Une inflammation cutanée pourrait être observée si le kyste se rompt. Si les souris développent une pathologie proche de l'HS, nous les utiliserons pour explorer les mécanismes qui gouvernent l'initiation et la progression de l'HS. Ceci permettra à terme de proposer de nouveaux traitements aux patients HS pour qui, à ce jour, aucune thérapie curative n'existe.

Cette étude nécessite l'utilisation de 120 souris pour mettre au point un nouveau modèle murin récapitulant la maladie HS. Ce nombre de souris est basé sur la complexité des croisements nécessaires à l'obtention des génotypes attendus. L'analyse des tissus permettra de déterminer si les lésions observées chez la souris récapitulent celles décrites chez l'homme.

La stratégie de conception des expériences a pour vocation de répondre de manière non ambiguë à des questions posées tout en respectant la règle de 3R (Réduire, Remplacer, Raffiner).

Pour la Réduction : Le nombre et le génotype des souris qui seront utilisées ont été définis en prenant en compte : (i) la complexité des croisements et la pénétrance du phénotype des animaux ayant le même génotype, (ii) des données bibliographiques qui portent sur des expériences similaires, (iii) des discussions avec des dermatologues spécialistes de cette pathologie. A chaque portée, nous obtiendrons deux souris avec le génotype recherché (25%). Pour analyser 30 souris, il faut donc obtenir 15 portées soit environ 120 animaux (8*15).

Pour le Remplacement, il s'agit de concevoir le premier modèle murin de l'HS. Les études décrites dans ce projet ne peuvent être donc accomplies avec un autre modèle animal ni des approches in vitro.

Pour le Raffinement: les animaux seront élevés en présence d'enrichissement dans le milieu, en portoir ventilé, au nombre maximum de 5 souris par cage. L'équipe zootechnique et l'expérimentateur surveilleront régulièrement l'état de santé des animaux afin de déceler tout signe de souffrance avérée (prostration, isolement, léthargie, poils hérissés, ulcération de peau) afin d'effectuer une mise à mort compassionnelle.

19474 Ce projet vise à étudier si il est possible d'évaluer les modifications de structure et fonction du cœur par imagerie après un infarctus expérimental induit chez la souris (en ligaturant une artère nourrissant le cœur appelée artère coronaire). Cette première étape de caractérisation permettra par la suite, d'évaluer l'effet de nouveaux traitements.

Pour mener ce projet un laboratoire partenaire a dans un premier temps mis en place le modèle de souris d'infarctus et nous avons développé l'imagerie cardiaque chez la souris. Une étude préliminaire a permis de valider la faisabilité de l'imagerie cardiaque post-infarctus. Le présent projet vise maintenant à mieux caractériser les modifications cardiaques post-infarctus par imagerie.

Pour cela, des infarctus transitoires ou permanents seront induits chez 60 souris dans un autre établissement. Après récupération post-chirurgicale, les animaux seront transférés dans notre structure et l'imagerie cardiaque sera réalisée à différents temps suivant l'infarctus. L'imagerie

permettra d'évaluer la fonction, la morphologie et le métabolisme cardiaque de façon non invasive. Pour cela l'animal est injecté en intraveineuse par un produit de contraste qui sera détectable en imagerie puis placé dans un lit d'imagerie chauffé sous anesthésie avant d'être imagé par IRM (imagerie basée sur le magnétisme) et TEP (imagerie de très faibles doses de radioactivité). Pendant toute la durée de l'imagerie, la respiration et les battements cardiaques de l'animal sont suivis grâce à des électrodes adaptées.

Un maximum de n=60 souris est prévu réparties de la façon suivante :

Une première étape est prévue sur 3 temps post-infarctus : 48h, 7 jours et 28 jours avec n=36 souris. Si la caractérisation du modèle est validée l'étude s'arrêtera. Si des mesures plus fines à des temps intermédiaires sont requises 2 temps supplémentaires seront examinés sur n=24 souris supplémentaires.

La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R. Tout d'abord, la construction de l'étude en 2 étapes permettra de réduire le nombre d'animaux dans le cas où l'étape 2 ne soit pas nécessaire. Le raffinement a été pris en compte : la totalité des procédures impliquant les animaux (injection intraveineuse et imagerie) est réalisée sous anesthésie. Aucun réveil des animaux n'est prévu. L'étude du fonctionnement cardiaque rend la règle de remplacement difficilement applicable puisqu'il est nécessaire de l'étudier dans son environnement nerveux et hormonal.

19475 Une myopathie congénitale d'origine génétique a été décrite chez le chien Labrador il y a de nombreuses années. L'identification du gène en cause chez le chien, grâce à l'établissement d'une colonie de chiens atteints par cette maladie, a à la fois permis de progressivement éliminer la maladie des pedigrees de Labradors, et d'identifier la mutation en cause dans six familles atteintes de myopathie congénitale chez l'Homme. Des travaux réalisés chez des souris chez lesquelles le même gène a été invalidé ont permis de montrer qu'en marge de la myopathie que développent également les souris, celles-ci montrent une résistance à l'obésité, qui s'accompagne d'une meilleure tolérance au glucose (sucre) et sensibilité à l'insuline (hormone qui fait entrer le sucre dans les cellules), en lien avec une dépense énergétique basale augmentée. Ceci a pu être relié à un dysfonctionnement des mitochondries, centrales énergétiques de nos cellules. Les chiens atteints par cette myopathie congénitale, qui reproduisent fidèlement les principaux éléments du tableau clinique et histopathologique de ce groupe de maladies humaines, sont un modèle d'intérêt pour évaluer l'efficacité de candidats médicaments, validés au préalable in vitro et chez la souris. En prévision de ces essais précliniques, il apparaît nécessaire de confirmer que cette amélioration de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline est également présente chez les chiens atteints par cette maladie. Il s'agit en effet, avec une élévation anormale après effort de certains marqueurs du métabolisme énergétique, d'indicateurs du dysfonctionnement énergétique musculaire qui constitue l'un des éléments principaux dans cette maladie. Etre capable de les quantifier chez les chiens permettra de disposer d'un élément d'évaluation au cours de futures études thérapeutiques. C'est l'objectif de ce projet qui comporte 20 animaux. Dix chiens malades et dix chiens témoins frères/soeurs de portée participant à une étude de caractérisation de la maladie déjà autorisée seront inclus. Ces données, obtenues sur des chiens non traités, pourront également être utiles pour comparer de futurs chiens traités. Les chiens seront soumis à un test de tolérance au glucose (sucre): suivi du taux de sucre dans le sang à intervalles réguliers après administration d'une dose importante de glucose. Après un exercice physique de 10 minutes, des marqueurs du métabolisme énergétique seront dosés dans le sang des chiens. Ce projet s'inscrit dans le respect de la règle des 3R. Remplacement : ce type d'étude sur le métabolisme implique d'être réalisée dans un organisme entier. Réduction : le nombre d'animaux a été réduit au minimum permettant de comparer statistiquement chiens malades et chiens témoins, mais aussi d'évaluer la variabilité de la population de chiens malades. Les animaux seront réutilisés d'un projet de description quantifiée de l'évolution clinique de cette maladie, ils ne seront donc pas uniquement utilisés pour le présent projet. Raffinement: les prélèvements sanguins seront réalisés par des personnes compétentes et dans le respect des bonnes pratiques vétérinaires. Cette myopathie, bien que modérée, sera prise en charge par un suivi vétérinaire étroit, permettant d'anticiper et d'éviter toute souffrance

potentielle. Les chiens seront hébergés en petits groupes d'animaux, auront des jouets divers à leur disposition, un lieu de couchage, une plateforme, et bénéficieront d'une sortie quotidienne en groupes avec jouets et pataugeoires. Enfin, les chiens témoins seront mis à l'adoption en fin de suivi.

19476 La Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie génétique qui touche le muscle chez l'enfant, provoquant une faiblesse musculaire généralisée et évolutive. Les patients sont contraints à l'usage du fauteuil roulant vers l'âge de 10 ans, et décèdent d'insuffisance respiratoire ou cardiaque vers l'âge de 30 ans. Il n'existe pas, à ce jour, de solution thérapeutique curative sur le marché pour la DMD. Les modèles de culture cellulaire ne permettent de valider que les premières étapes de l'élaboration de nouveaux médicaments et il faut ensuite envisager un passage sur les modèles animaux. De plus le modèle souris couramment employé (souris mdx) n'est pas satisfaisant car il ne reproduit pas fidèlement l'ensemble des symptômes présentés par les malades contrairement au chien GRMD (Golden Retriever Muscular Dystrophy), qui reproduit de manière fidèle les manifestations cliniques et fonctionnelles rencontrées chez les patients mais qui nécessite des infrastructures particulières coûteuses et un suivi vétérinaire lourd contraignant. Pour pallier au manque de modèle fidèle à la maladie et de taille moyenne, nous avons développé un modèle de rat myopathe qui reproduit aussi bien que le chien tous les symptômes des patients DMD et représente donc un modèle de taille raisonnable à développement rapide permettant la validation préclinique de potentiels traitements.

Cette étude a pour objectif de comparer de manière quantifiée et exhaustive l'effet d'une stratégie de thérapie génique utilisant deux virus différents pour cibler au mieux les cellules souches et permettant l'expression d'une protéine dystrophine tronquée mais fonctionnelle qui devrait améliorer et prolonger de façon significative la vie des patients DMD. Les deux types de virus contenant la construction seront administrés par une injection intraveineuse unique chez les rats DMD. Ils seront traités soit précocement (4 semaines) lorsqu'ils n'ont pas encore de symptômes soit plus tardivement lorsque la maladie est déjà établie (3 mois) pour voir s'il est possible de limiter son développement voire de le stopper avec l'expression de cette mini dystrophine. Cette étude utilisera un total de 200 rats, qui seront traités de l'âge de 4 semaines jusqu'à l'âge de 4, 7 et 12 mois ou de l'âge de 3 mois jusqu'à l'âge de 7 et 12 mois. Les rats traités seront comparés à des rats DMD et des rats sains traités seulement avec la solution permettant la dilution des virus et suivis de la même manière et sur la même période. Ce nombre d'animaux a été réduit au minimum en tenant compte de la variabilité observée dans une population de rats DMD tout en ayant suffisamment de matériel pour réaliser toutes les analyses biologiques nécessaires à l'évaluation de la maladie et à l'efficacité de la thérapie. Pour limiter le stress, les rats seront évalués à l'aide de différentes mesures non invasives dérivées de méthodes utilisées chez les patients et adaptées aux rats avec des friandises en récompense. Les rats seront habitués aux manipulations dès leur plus jeune âge et seront hébergés par 2-3 individus selon l'âge, dans des cages contenant des enrichissements correspondant à leur espèce. Ils seront observés quotidiennement afin de suivre au plus près les éventuelles complications liées à leur maladie. Des points limites précis et suffisamment précoces pour leur éviter toute souffrance prolongée et inutile ont par ailleurs été définis. Un effet bénéfique est attendu sur l'ensemble des paramètres évalués et cette étude permettra de déterminer précisément le niveau de cet effet.

19477 La transplantation combinée rein-pancréas est à ce jour le traitement de référence dans la prise en charge des diabètes de type I instables sous traitement substitutif associés à une insuffisance rénale sévère. Elle restitue une sécrétion physiologique d'insuline ce qui diminue les complications micro et macro vasculaires et limite la iatrogénie du traitement substitutif en partie due aux hypoglycémies qui peuvent être fatales. La transplantation pancréatique augmente ainsi l'espérance de vie de ces patients mais améliore aussi significativement leur qualité de vie.

Le protocole français de donneurs d'organes décédés après arrêt circulatoire contrôlé (DDAC controlled-Maastricht III) offre d'excellents résultats en transplantation rénale et hépatique et a été ouvert récemment pour la transplantation pancréatique. La transplantation pancréatique est le

traitement de choix du diabète instable. Le pancréas est un organe particulièrement sensible aux lésions d'ischémie reperfusion du fait de son anatomie et de sa physiologie. La technique actuelle de référence de préservation pancréatique demeure la conservation statique hypothermique. L'objectif de ce travail est d'établir les modalités d'une technique innovante de préservation des transplants pancréatiques sur machine de perfusion hypothermique pulsatile avec oxygénation continue dans un modèle préclinique porcin de donneurs DDAC-MIII. L'objectif de cette perfusion est d'optimiser les conditions de préservation et donc de diminuer les thromboses veineuses et les pancréatites des transplants.

La perfusion hypothermique oxygénée permettrait de limiter les lésions d'ischémie-reperfusion et d'améliorer la préservation des composantes exocrines et endocrines des transplants pancréatiques. L'ajout d'oxygène au cours de la perfusion permettrait de diminuer la glycolyse anaérobie et donc la production de lactate concomitante d'acidose. Les marqueurs de souffrance cellulaire (généraux/endocrines/exocrines) seraient diminués par cet ajout d'oxygène. Les paramètres de reperfusion (ici évalués en normothermie ex-situ) en seraient donc améliorés.

L'objectif de cette étude est de comparer, sur modèle porcin ex vivo, la conservation pulsatile hypothermique non-oxygénée et oxygénée à une conservation statique hypothermique du pancréas. L'objectif, à plus long terme, est un transfert de cette procédure de perfusion pré-transplantation chez l'homme, dans le but d'améliorer les critères de sélection des transplants pancréatiques.

Dans ce projet la règle des 3R sera assurée comme suit:

Le nombre maximum estimé d'animaux (porcs) nécessaire à ce projet est de 50 animaux comprenant uniquement des donneurs d'organe.

Remplacer/réduire : De façon à réduire le nombre d'animaux utilisés, la fonction pancréatique post-conservation ne sera pas réalisée par allo-transplantation, mais par mise de l'organe sur machine de perfusion normothermique oxygénée ex vivo.

Cependant, l'étude des paramètres de perfusion/conservation d'un organe, compatibles avec une transplantation ne peut se concevoir que dans un modèle animal pré-clinique, il n'existe pas de remplacement possible pour ces expérimentations qui répondent cependant aux exigences de réduction et de raffinement.

Raffinement : De façon à diminuer le stress, la souffrance et la douleur, toutes les procédures de ce projet seront réalisées chez ces animaux sous anesthésie générale et un traitement antalgique leur sera donné de façon adaptée en fonction de la procédure et de l'espèce.

Selon leur taille et leur comportement, les animaux peuvent être hébergés par 1, 2 ou 3 par boxes, au sein d'une même pièce. Un enrichissement alimentaire (fruits et/ou légumes) est apporté quotidiennement, un enrichissement par jeux (différentes activités) est apporté en rotation dans les boxes selon un programme hebdomadaire.

19478 Les ovins sont particulièrement sensibles aux parasites gastro-intestinaux, qu'ils ingèrent en broutant au pâturage. Les conditions de développement des larves de parasites sont soumises à des stress environnementaux. Nos observations in vitro ont montré que les conditions climatiques peuvent induire des modifications de sensibilité aux anthelminthiques, démontrant que le réchauffement climatique pourrait accélérer la perte d'efficacité des vermifuges sur le terrain. Lors d'un premier test d'infestation in vivo, nous avons validé ces observations et avons également observé une virulence accrue des parasites. Dans le cadre de ce nouveau projet, nous souhaitons évaluer l'impact de conditions de culture des larves parasitaires sur la durée d'efficacité des vermifuges. Les essais se feront par infestation expérimentale de quatre lots de 6 moutons (2 conditions expérimentales comprenant chacune un lot témoin infesté et non traité, un lot infesté et traité) pour un total de 24 moutons. Chaque expérimentation durera 96 jours.

Réduction: le nombre d'animaux est le minimum recommandé pour réaliser un test d'efficacité ; ces effectifs nous ont permis de mettre en évidence une réduction de 16% de l'efficacité du vermifuge après modification des conditions de culture des parasites.

Raffinement: les animaux sont conduits en lot, et gérés par du personnel qualifié. La dose infestante est limitée pour démontrer des effets tout en minimisant l'impact sur le bien-être des animaux. Le test est mis en place après avoir obtenu de premières observations in vitro sur un nématode modèle et un premier dispositif in vivo. Les animaux seront hébergés en groupes pour éviter le stress de l'isolement social, sur litière paillée. Le milieu sera enrichi de disque à mordiller suspendus et de la musique est diffusé dans le bâtiment.

Remplacement: il n'existe pas de méthode de culture des parasites adultes in vitro. De plus notre étude vise à reproduire les situations d'élevage.

19479 La dépression est une pathologie psychiatrique caractérisée par la perte de la capacité à ressentir le plaisir, associée à une baisse de l'humeur et de la motivation et qui touche 15 à 20% de la population générale. Les traitements actuels sont basés sur un déséquilibre de neurotransmetteurs dans le cerveau appelés monoamines (dopamine, sérotonine, noradrénaline), molécules indispensables à la régulation de l'humeur et du système de récompense. L'habénula est une structure clef dans la modulation monoaminergique et donc dans le système de la récompense et des pathologies associées comme la dépression. De plus, des études récentes montrent la présence d'une horloge circadienne dans l'habénula latérale. Néanmoins le rôle de cette horloge dans la dépression est mal connu.

Donc, dans une première partie nous étudierons dans un modèle de dépression chez la souris, l'activité circadienne de l'habénula. Nous utiliserons un modèle dans lequel les souris seront soumises à divers agents stressants induisant un phénotype dépressif afin d'étudier l'impact sur l'horloge de l'habénula. A l'inverse, nous déterminerons aussi si une perturbation spécifique de l'horloge de l'habénula est capable d'induire des comportements témoignant de l'altération de l'humeur et un dysfonctionnement de la rythmicité de la libération des monoamines. Enfin, il a été montré dans la littérature que lorsque les horloges internes ne sont plus en phase avec des synchroniseurs puissants (ex : chez les travailleurs de nuit), le risque de développer des troubles tels que la dépression et l'anxiété est augmenté. Il sera donc question ici d'étudier l'horloge de l'habénula sur un modèle de souris présentant une perturbation de la synchronisation à la lumière des rythmes circadiens. Si, dans ces trois modèles, l'horloge de l'habénula est altérée, pour rétablir sa rythmicité nous utiliserons différents synchroniseurs des horloges circadiennes (cycle jour-nuit, restriction temporelle alimentaire et de l'activité physique). L'hypothèse étant que si la rythmicité dans l'habénula est rétablie, alors nous pourrions observer une amélioration de l'état émotionnel de l'animal.

Dans une deuxième partie, il sera donc question d'évaluer les effets de ces synchroniseurs sur l'activité circadienne de l'habénula et sur le comportement émotionnel des souris.

Ce projet nécessitera au minimum 347 souris et au maximum 594 souris, et ce pour une durée de 5 ans. L'étude des états anxio-dépressifs et de leurs conséquences nécessitent des animaux vivants, il n'y a donc pas de remplacement possible. En ce qui concerne la réduction: le nombre de souris et les techniques utilisées ont été choisis en respect des règles statistiques en vigueur en minimisant le nombre d'animaux utilisés mais en tenant compte d'éventuels pertes dus à la chirurgie et aux autres techniques utilisées. De plus, nous étudierons l'impact de nos expériences à différents niveaux (comportemental, moléculaire) sur les mêmes animaux, afin de réduire le nombre d'animaux utilisés. Les procédures d'études virales prendront place après confirmation d'un impact des différents synchroniseurs de l'habénula et seront précédées par des tests préliminaires sur un plus petit nombre d'animaux afin de vérifier l'efficacité de la technique avant de passer sur un nombre d'animaux plus élevé. En ce qui concerne le raffinement: toutes procédures chirurgicales se feront sous anesthésie/analgésie. Les animaux seront hébergés en cages collectives ou individuelles avec du matériel d'enrichissement (nids en coton, bâtons à ronger). Les souris seront suivies quotidiennement et des points limites établis au préalable permettront de veiller au bien-être animal tout au long de l'expérience.

19480 Dans son rapport présenté en Février 2017, l'Organisation Mondiale de la Santé publie sa première liste « d'agents pathogènes prioritaires », hautement résistants aux antibiotiques, énumérant les

familles de bactéries les plus menaçantes pour la santé humaine. En tête de liste de la catégorie « critique » se trouvent les bactéries du genre *Acinetobacter* spp, et en particulier l'espèce *Acinetobacter baumannii*. C'est un pathogène fréquemment associé aux infections nosocomiales (acquises en milieu hospitalier), telles que les pneumonies sévères acquises sous ventilation chez les patients de réanimation ou immunodéprimés. *Acinetobacter baumannii* est le plus souvent résistant à un grand nombre d'antibiotiques, y compris les carbapénèmes, qui constituent l'une des dernières lignes de traitement actuellement disponible. De ce fait, les infections à *Acinetobacter baumannii* sont grevées d'une mortalité hautement significative, à hauteur de 40%.

Par ailleurs, l'OMS met en avant la nécessité de mieux évaluer les antibiotiques dans des modèles précliniques pertinents. La rifampicine, seule ou associée à un autre antibiotique, semble présenter un intérêt thérapeutique dans le traitement aux infections pulmonaires à *Acinetobacter baumannii*. Mais la distribution de la rifampicine mérite d'être davantage décrite chez la souris de façon à adapter les modalités d'administration dans cette pathologie. Cette étude fait suite à un précédent projet dans lequel la pharmacocinétique de la rifampicine a commencé à être explorée mais les résultats obtenus rapportent une accumulation sanguine supérieure à celle attendue, ce qui nécessite des explorations complémentaires pour reconstruire la courbe pharmacocinétique chez la souris.

L'objectif de ce présent projet est d'évaluer la pharmacocinétique (distribution sanguine) la rifampicine administrée à différentes doses par voie intra-péritonéale chez la souris immunocompétente. Du sang sera prélevé sur animal anesthésié à différents temps.

Dans le cadre de cette étude, une attention particulière sera portée au respect de la règle des 3R. Le nombre d'animaux nécessaire pour répondre aux hypothèses et permettre une analyse statistique robuste a été réduit à 3 par groupe grâce à l'expérience acquise lors d'études précédentes. Des analyses *in vitro* ont déjà été réalisées sur l'efficacité de la rifampicine sur certaines souches d'*Acinetobacter baumannii*. Toutefois l'efficacité de tels antibiotiques ne peut être confirmée que dans des modèles pré-cliniques, c'est pourquoi aucune stratégie de remplacement ne peut être envisagée. Enfin, un gros travail bibliographique a été réalisé en amont de cette étude afin de s'assurer que les doses utilisées ne soient pas toxiques pour les animaux. Il s'agira d'une étude sans infection où aucune toxicité n'est attendue. De plus un enrichissement du milieu (jouets en plastique, igloos en carton) sera utilisé et une surveillance accrue sera également réalisée pour cette étude. Des critères d'arrêts de l'étude ont été définis afin d'assurer le bien-être des animaux. (Raffinement).

93 souris sont nécessaires pour la mise en œuvre de ce projet.

19481 L'ambition scientifique du projet est, d'une part d'optimiser l'aspect nutritionnel afin d'améliorer la croissance et de maintenir la qualité du produit final, d'autre part de maintenir les défenses et le bien-être des animaux à un niveau satisfaisant pour assurer une bonne croissance.

Une meilleure utilisation des aliments va aussi contribuer à réduire l'impact environnemental de la production animale, en assurant une meilleure rétention des nutriments réduisant le besoin de supplémentation en P.

Le développement d'additifs alimentaires comme les enzymes a pour objectif l'amélioration de la nutrition des poissons. Les enzymes phytasiques ont pour but d'améliorer la valeur nutritive des ingrédients utilisés dans les aliments pour animaux d'élevage en terme d'apport phosphoré.

Le phosphore (P) est déterminant pour la croissance des poissons et se trouve au cœur des enjeux de productivité. Dans les matières premières d'origine végétale utilisées en alimentation animale, le P est essentiellement présent sous forme de phosphore phytique (phytates). Or, cette forme de P est mal absorbée par les poissons et la majeure partie est éliminée via les excréta sans être utilisée. La démarche la plus efficace pour réduire l'excrétion de P consiste, d'une part à améliorer la digestibilité du P phytique de la ration alimentaire par l'ajout de phytase d'origine microbienne pour réduire les apports de P minéral dans la ration alimentaire, et d'autre part à mieux ajuster les besoins en P des poissons à différents âges et stades physiologiques afin de maximiser les performances et/ou la minéralisation osseuse.

Le développement d'additifs alimentaires passe nécessairement par une étape d'enregistrement des dits additifs auprès des autorités compétentes. A cet effet, certains types d'études doivent donc être menées, selon des modalités propres à chaque organisme d'autorisation, par exemple l'EFSA en Europe ou CVM/FDA aux Etats-Unis d'Amérique. Malgré des différences notoires dans les attentes des différents organes de régulation, il est possible de séparer les essais en deux grandes catégories, des essais d'efficacité, visant à démontrer l'utilité d'un produit, d'une part, et les essais de tolérance visant à démontrer son innocuité à la dose recommandée ou à des surdoses d'autre part.

Le présent projet a pour objectifs principaux :

- de contribuer à la découverte de nouvelles phytase comme additif alimentaire.
- de réaliser des études d'efficacité et de tolérance pour l'enregistrement de ces additifs.
- de rechercher de nouvelles applications pour les additifs déjà enregistrés.
- de comparer l'efficacité des additifs développés par notre établissement avec ceux du marché.
- d'identifier les modes d'action et effets annexes des phytases.

Les études d'efficacité sont réalisées en utilisant des molécules ou mélanges de molécules le plus souvent précédemment identifiées lors d'un criblage in vitro. Il convient de noter que le criblage in vitro mentionnés ci-dessus peut avoir été réalisé en interne, au sein du centre de recherche, mais peut également avoir eu lieu en partenariat avec des universités ou des instituts de recherche tiers, publiques ou privés.

Les études in vivo vont mettre en œuvre diverses approches scientifiques, et faire appel à des procédures entraînant notamment une carence nutritive réalisée en alimentant les animaux avec un régime déficient en phosphore et autres minéraux. Ces études vont permettre d'évaluer les effets des additifs sur la croissance, la digestibilité des nutriments et des minéraux, le bilan nutritionnel. Ces études peuvent être réalisées en amont de celles visant à démontrer l'innocuité du produit.

L'évaluation de différents candidats ayant un potentiel de mise sur le marché se fera au niveau du laboratoire et par des études en expérimentation animale au sein du centre de recherche en nutrition animale, selon des protocoles établis et suivant des procédures expérimentales définies en fonction de l'objectif à atteindre au sein du projet.

La comparaison avec d'autres additifs déjà présents sur le marché ou en développement est réalisée lors de tests d'efficacité similaires à ceux utilisés dans le cadre de la découverte de nouveaux additifs.

Le projet s'étend sur 5 années dans le but d'évaluer, de tester et de développer différentes conditions d'optimisation de l'efficacité de phytase destinées aux poissons et prévoit l'utilisation de 9000 poissons. Lors du processus de développement et d'enregistrement de cet additif, il est indispensable de tester son efficacité sur l'animal auquel il est destiné, cela afin d'en démontrer l'efficacité et l'innocuité auprès des autorités habilitées à délivrer une autorisation de mise sur le marché. Le projet est conduit dans le respect de la règle des 3R avec comme mesures de raffinement, la sédation et/ou l'anesthésie des animaux à la tricaine methanosulfate avant toute manipulation ou prélèvement en cours d'étude, le suivi quotidien de l'état de santé des animaux avec l'observation de points limites adaptés et attendus, des conditions d'hébergement des animaux définies de telle sorte que la densité des animaux par bassin, les paramètres environnementaux (température...) ou encore la qualité d'eau procurent le maximum de confort aux animaux, et restent supérieurs ou égaux à la législation en vigueur (Arrêté du 01/02/2013). Aucun animal ne reste isolé en bassin individuel sans contact olfactif, auditif et visuel avec ses congénères, ceci afin de réduire au minimum l'angoisse et le stress des animaux.

19482 Campylobacter jejuni est la première cause de gastro-entérites humaines d'origine bactérienne en Europe. Lors d'infections sévères, un traitement antibiotique par macrolides ou fluoroquinolones est parfois nécessaire. Une des principales sources de contamination humaine est la viande de poulet qui peut être contaminée par des souches de Campylobacter provenant de l'intestin du poulet. Les traitements antibiotiques administrés en élevage peuvent sélectionner des souches résistantes.

Ainsi en Europe, en 2018, plus de 70% des souches de *C. jejuni* de poulet étaient résistantes aux fluoroquinolones, ce qui entraîne un fort risque d'échecs thérapeutiques lors de traitements des infections humaines. Or, l'analyse approfondie des génomes de souches de *C. jejuni* montre que certains types (ST) de souches de *C. jejuni* sont presque toujours trouvés résistants, alors que d'autres sont presque toujours trouvés sensibles. Le but du projet est, d'une part, d'évaluer et comparer la capacité de différents ST à acquérir la résistance aux fluoroquinolones et, d'autre part, à comparer la compétitivité des souches sensibles de différents ST et de leurs mutants résistants.

Pour ce faire, dans un premier temps, quatre groupes de 15 poulets seront inoculés par voie orale, chacun avec une souche de *C. jejuni* d'un ST différent, sensible aux fluoroquinolones. Puis un traitement par fluoroquinolones sera administré aux poulets dans l'eau de boisson. Des échantillons de matières fécales et de caecums, prélevés lors des autopsies des poulets après mise à mort à cinq semaines d'âge, seront réalisés et les souches résistantes (mutants) de *C. jejuni* sélectionnées par le traitement seront isolées par culture. Elles seront ensuite caractérisées et leur génome sera comparé à celui des mêmes souches sensibles.

Dans un second temps, pour chacune des quatre paires de souches (la souche initiale et son mutant résistant), trois lots de 15 poulets seront utilisés : un lot sera inoculé avec la souche sensible, un lot avec son mutant résistant et un lot avec un mélange de la souche sensible et de son mutant. Des échantillons de matières fécales et de caecums, prélevés lors des autopsies des poulets après mise à mort à cinq semaines d'âge, seront réalisées. Les proportions de souches sensibles et de mutants résistants seront évaluées par culture sur tous les prélèvements, afin de comparer l'implantation des souches et de leurs mutants, lorsqu'ils sont présents isolément ou en compétition dans l'intestin des poulets.

Les poulets utilisés seront de souche Leghorn EOPS (exempts d'organismes pathogènes spécifiés) de notre laboratoire. Cette expérimentation utilisera au total 240 poussins, répartis en 16 lots de 15 poussins.

Règle des 3R : les animaux seront hébergés en isolateurs et bénéficieront d'enrichissements appropriés (plateformes et éléments de perchage). Le protocole expérimental ne doit pas entraîner de souffrance animale, dans la mesure où 1) les inoculations et traitements sont faits par voie orale, 2) *C. jejuni* n'est pas pathogène chez le poulet et 3) les prélèvements de fèces effectués une fois par semaine n'engendrent pas de souffrance ou de stress chez les animaux. Pour détecter une éventuelle souffrance des animaux, ceux-ci seront surveillés quotidiennement (4 à 5 passages par jour en cas d'apparition de symptômes) pour détecter des comportements anormaux (difficulté locomotrice par exemple). Toutes les précautions seront ainsi prises pour abrégier une éventuelle souffrance. L'utilisation des animaux est indispensable pour ce projet. Cependant, compte tenu de notre expérience, le nombre d'animaux est calculé de manière à obtenir des résultats significatifs en utilisant un minimum d'animaux par lot.

19483 L'incidence des maladies rénales chroniques (MRC) est en progression constante et représentent actuellement un problème majeur de santé publique dans les pays industrialisés. Ainsi en France les maladies rénales d'origine diverses touchent plus de 5,7 millions de personnes avec une progression de 2% par an. La maladie rénale chronique est une maladie longtemps silencieuse, d'évolution progressive et qui ne régresse pas. Son évolution est plus ou moins lente mais peut aller jusqu'à la perte totale de la fonction rénale. On parle alors d'insuffisance rénale terminale, nécessitant un traitement de suppléance par dialyse et/ou greffe de rein qui reste lourd de risques et de complications pour les malades. Les mécanismes à l'origine de cette détérioration du rein sont encore peu connus. Leur étude permettrait de ralentir cette évolution en évitant ou en traitant les facteurs qui l'aggravent.

Ce projet vise à comprendre les mécanismes d'action de facteurs de croissance qui jouent un rôle clé dans l'évolution de la maladie rénale. Certains facteurs de croissance ont un rôle délétère alors que d'autres ont un rôle protecteur. Nous nous intéressons à l'expression de l'un de ces facteurs de croissance «protecteur» qui est diminuée dans la MRC. Des études sur des cultures cellulaires rénales ont montrés que cette diminution pourrait être liée à une diminution du stress osmotique. Or un facteur de transcription régule la réaction au stress osmotique. L'étude de souris dépourvues

de ce gène spécifiquement dans les tubules rénaux nous permettra d'approfondir son rôle dans la régulation de ce facteur de croissance «protecteur».

Nous utiliserons un modèle de souris génétiquement modifiées qui nous permettra d'inactiver ce gène spécifiquement au sein des tubules rénaux de souris mâles et femelles, afin d'éviter tout effet de genre. L'inactivation sera réalisée par gavage avec du Tamoxifène et les animaux seront sacrifiés à différents temps après l'invalidation du gène afin de suivre l'évolution des facteurs de croissance dans le rein.

Un prélèvement de sang au niveau de la veine cave abdominale sera réalisé sous anesthésie générale afin d'éviter la souffrance et l'angoisse avant l'euthanasie des animaux. Les reins des animaux seront prélevés post mortem pour analyses.

Ce projet sur 3 ans utilisera 192 souris. Toutefois ce programme de recherche est développé afin de respecter les règles éthiques des 3R:

1) Remplacement : La culture cellulaire nous a permis de tester nos hypothèses mécanistiques mais la complexité du rein et de la maladie rénale nécessite l'utilisation d'un modèle animal.

2) Réduction : nous utiliserons le nombre minimum d'animaux requis pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et atteindre l'objectif scientifique du projet. Afin de réduire le nombre d'animaux, nous analyserons plusieurs paramètres sur le même animal : des analyses anatomopathologiques ainsi que des analyses des ARN et protéines rénales.

3) Raffinement : Une surveillance quotidienne sera effectuée auprès des animaux afin de s'assurer de leur bien-être constant. Dans le cas contraire une supplémentation antalgique sera introduite, et on choisira en dernier recours l'euthanasie de l'animal. Un prélèvement de sang au niveau de la veine cave abdominale sera réalisé sous anesthésie générale adaptée afin d'éviter la souffrance et l'angoisse avant la mise à mort des animaux.

Les animaux bénéficieront d'un programme d'enrichissement, comme des carrés de cellulose, un tunnel ou une maisonnette, défini par la cellule de l'établissement chargée de leur bien-être.

Cette étude permettra de comprendre le rôle de cette protéine chez la souris afin de connaître son implication dans les maladies rénales humaines et pourra permettre à terme le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

19484 La coqueluche est une pathologie des voies respiratoires causée par la bactérie *Bordetella pertussis*. Chez certains patients, les symptômes coquelucheux (fièvre, toux) peuvent évoluer vers une détresse respiratoire sévère, voire le décès (195 000 décès par an). Cette pathologie touche en majorité les nourrissons et les jeunes enfants, dont le système immunitaire est encore immature. Néanmoins, aujourd'hui, les cas de coqueluche chez des enfants plus âgés voire des adultes sont de plus en plus fréquents.

Depuis les années 1940-1950, des vaccins « ancienne génération » dit cellulaires ou à germe entier (wP) ont été mis au point pour l'immunisation des populations. Cependant, depuis les années 1990 et par crainte d'effets indésirables (tels que fièvre et/ou réaction inflammatoire au site d'injection), des vaccins « nouvelle génération » dit acellulaires (aP, c'est-à-dire composé de protéines bactériennes inactivées) sont aujourd'hui utilisés dans la plupart des pays industrialisés. Depuis ce changement de paradigme vaccinal, une résurgence de cas de coqueluche a été détectée. Des études épidémiologiques, cliniques et précliniques ont montré que l'immunité induite par la vaccination contre la coqueluche diminue rapidement et particulièrement avec les vaccins aP. Ces derniers protègent de la maladie (symptômes) mais pas de la colonisation bactérienne ou de la transmission. Ainsi après plus de 20ans d'utilisation, les enfants vaccinés dans les années 90 avec ce vaccin aP ont eu des enfants et les cas de coqueluche ont augmenté. Le besoin de développer de nouveaux vaccins contre la coqueluche, induisant une immunité durable et protégeant des symptômes de la maladie mais aussi de la colonisation bactérienne et de la transmission, sans induire d'effets secondaires indésirables, est donc nécessaire.

Ce projet est la continuité d'un projet européen initié en 2016, qui vise à mieux caractériser le modèle animal d'infection par la bactérie *B. pertussis* pour 1/ caractériser la transmission, l'infection

et l'évolution de la maladie, notamment par imagerie non invasive in vivo ; 2/ caractériser la réponse immunitaire induite par les deux générations de vaccins, et la comparer avec les données obtenues chez l'humain pour mieux comprendre les changements observés dans l'épidémiologie de la coqueluche, notamment chez les femelles gestantes et les nouveau-nés (la coqueluche touchant majoritairement les nouveau-nés chez l'humain) ; 3/ évaluer l'efficacité vaccinale de nouveaux candidats vaccin contre la coqueluche

Il est aujourd'hui impossible de reproduire in vitro la complexité d'une infection virale et d'une réponse immunitaire de l'organisme. Le recours à un modèle animal est donc nécessaire, et ne peut être remplacé par aucun autre modèle ne représentant que partiellement un organisme. Dans ce projet, le primate non humain (PNH) a été choisi pour sa proximité génétique avec l'être humain, afin d'avoir d'une part un modèle d'infection par la bactérie comparable à la maladie humaine et, d'autre part, une réponse vaccinale similaire à celle qui sera obtenue chez l'humain.

Le projet prévoit d'utiliser au maximum 150 animaux sur 5 ans (soient 30 animaux par an), nés et élevés en captivité dans un établissement agréé. Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux a été ramené au minimum nécessaire permettant une interprétation statistique fiable des résultats. Des protocoles d'anesthésie, d'analgésie sont mis en place lors des méthodes expérimentales, toutes conçues pour éviter les souffrances lors des interventions (prélèvements de sang, de fluides et de biopsies, immunisations, infection expérimentale, imagerie non invasive in vivo sous anesthésie pour limiter le recours à des biopsies tissulaires, limitation des volumes de sang prélevés). Une attention particulière est apportée à l'hébergement des animaux en groupe. Pour maîtriser les éventuelles surexpositions bactériennes et les contaminations croisées entre individus et uniquement dans ce cas, l'hébergement individuel pourra être nécessaire. Dans ce cas, les animaux seront hébergés en cage individuelle dans des modules permettant des interactions sociales, et seront remis en groupe dès que possible. Les nouveau-nés seront hébergés avec leur mère jusqu'à leur sevrage.

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

19485 RNT projet COLIPSO : Evaluation de l'efficacité et de l'impact de trois ingrédients naturels pour la prévention d'une diarrhée bactérienne expérimentale de post-sevrage chez le porc

En élevage porcin, les traitements antibiotiques sont fréquents afin d'enrayer les diarrhées bactériennes dues à *Escherichia coli* apparaissant après le sevrage des animaux. L'existence de souches bactériennes multirésistantes réduit les options thérapeutiques. Il est donc nécessaire de trouver de nouvelles solutions préventives ou thérapeutiques tout en réduisant les quantités d'antibiotiques utilisées en élevage. L'utilisation de certains additifs naturels figure parmi les pistes à explorer. L'objectif de ce projet est d'utiliser un modèle d'infection colibacillaire chez le porc pour comparer l'efficacité protectrice vis-à-vis de l'infection et de la colonisation par les bactéries *Escherichia coli* multirésistantes de trois ingrédients naturels déjà autorisés en Europe. Pour cela, une expérimentation sera conduite pendant quatre semaines en animaleries sur un total de 40 porcs au statut sanitaire contrôlé, de 4 semaines d'âge. Cinq lots de 8 porcs seront utilisés, un lot non inoculé, un lot inoculé avec *E. coli* et non traité et trois lots inoculé avec *E. coli* et recevant dès le jour du sevrage, soit deux semaines avant inoculation, et jusqu'à la fin de l'expérimentation, un aliment supplémenté avec un de ces trois additifs à tester. Le suivi quotidien des animaux permettra d'observer et de comparer les éventuels symptômes. Des prélèvements de matières fécales seront collectés et analysés pour comparer l'excrétion de la souche résistante inoculée dans les différents lots. L'analyse statistique des résultats permettra d'évaluer l'intérêt des différentes formulations. Ces résultats ne peuvent être obtenus que par expérimentation sur l'espèce cible. Le protocole expérimental peut entraîner de la souffrance animale, car la souche d'*E. coli* utilisée est virulente ; les animaux pourront ainsi présenter, dans la pire des situations, de la diarrhée, des vomissements et une déshydratation. En cas d'atteinte de points limites fixés, les porcs seront mis à mort. Dans

un but de réduction, compte tenu de notre expérience, le nombre d'animaux a été calculé de manière à obtenir des résultats significatifs en utilisant un minimum d'animaux par lot. Les inoculations seront faites par voie orale. Les additifs sont administrés dans l'aliment. Les animaux seront vus au moins une fois par jour ; ils seront élevés en groupe stable, disposeront d'objets manipulables, auront accès à de l'aliment et à de l'eau à volonté, et disposeront de lampes chauffantes ainsi que de plaques de couchage. Ils seront pesés chaque semaine. Leur température sera mesurée chaque jour, afin de surveiller l'évolution de leur état de santé. Afin de réduire le stress des animaux, les prélèvements seront collectés lors des prises de température. Enfin, des prélèvements d'organes seront effectués sur les animaux après leur mise à mort en fin d'expérimentation, soit deux semaines après inoculation. Le remplacement n'est pas envisageable, les animaux utilisés étant nécessaires pour évaluer l'efficacité de solutions préventives pour la même espèce.

19486 Le lymphome T sous-cutané à type de panniculite (SPTCL) est un lymphome cutané qui peut être associé à un syndrome hyperinflammatoire caractérisé par une activation persistante des globules blancs (syndrome hemophagocytaire = SH). Ce syndrome se manifeste par des symptômes cliniques et biologiques dévastateurs, généralement mortels sans traitement. Nos travaux ont montré que des mutations délétères dans un gène étaient responsables de SPTCL associé à un SH (SPTCL/SH). La molécule mutée résultant de ce gène agit comme un point de contrôle immunitaire en inhibant la réponse immunitaire. Ainsi, les patients qui expriment cette molécule mutée présentent une inflammation chronique et sévère. Notre projet de recherche vise à mieux caractériser les mécanismes qui participent au développement du SPTCL/SH lorsque cette molécule est mutée. Le SPTCL/SH impliquant plusieurs types de globules blancs et la graisse corporelle localisée sous la peau, l'étude des mécanismes impliqués dans cette pathologie ne peut être restreint à des modèles cellulaires, et seul un modèle chez la souris pourra permettre de reproduire la complexité de la pathologie humaine. C'est pourquoi, des souris qui ne possèdent pas cette molécule seront utilisées pour comprendre comment cette dernière contribue au développement de cette pathologie hyper-immunitaire. Différentes procédures seront ainsi réalisées sur des souris contrôles et des souris qui ne possèdent pas la molécule d'intérêt :

- injection par voie intra-péritonéale de molécules pro-inflammatoires dans le but d'induire un SH selon des protocoles décrits dans la littérature. Nous suivrons ainsi les différentes manifestations cliniques et biologiques du SH.

- injection en intra-veineux de cellules de rate de souris contrôles ou de souris mutantes pour une molécule dont l'absence va activer un type de globule blanc appelé Natural Killer (NK). Ceci nous permettra de déterminer si les cellules NK sont fonctionnelles en absence de notre molécule d'intérêt.

- injection en sous-cutané de molécules pro-inflammatoires au niveau de la graisse sous la peau dans le but d'induire un SPTCL. Pour cette procédure, les souris seront minces ou rendues obèses par un régime riche en graisse. Nous suivrons ainsi les différentes manifestations cliniques et biologiques de la SPTCL.

- tests de résistance à l'insuline (ITT) et de tolérance au glucose (GTT) sur des souris minces ou rendues obèses dans le but d'analyser le phénotype métabolique de nos souris. Le SPTCL étant une pathologie qui touche la graisse sous la peau, une zone importante pour la régulation du métabolisme, cette procédure nous permettra de comprendre si l'absence de la molécule chez les souris conduit à une altération du métabolisme. Ces souris seront également soumises à une procédure d'imagerie non invasive qui permet de déterminer la masse graisseuse des souris et qui sera réalisée à différents temps au cours du régime riche en graisse. De plus, les organes de ces animaux seront utilisés pour des expériences ex vivo et/ou in vitro qui permettront d'apporter des réponses supplémentaires au problème posé.

Cette étude nécessitera 1600 souris sur une période de 4 ans.

Les procédures seront réalisées en respectant la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner).

Remplacement : Pour répondre à des questions de biologie cellulaire et moléculaire, nous utiliserons des cultures primaires, ce qui réduit fortement l'utilisation d'animaux. Cependant, les cultures cellulaires ne peuvent pas remplacer les études in vivo pour les réponses physiopathologiques à une manipulation génétique ou traitement pharmacologique.

Réduction : Pour tenir compte des 3R, les différents protocoles expérimentaux ont été consciencieusement élaborés afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en permettant d'obtenir des résultats interprétables et statistiques. L'utilisation d'imagerie non invasive dans une des procédures permet de suivre un même lot d'animal au cours du temps, ce qui évite de devoir sacrifier des animaux à différents temps et ainsi réduit le nombre d'animaux utilisés.

Raffinement : Nous nous attachons à réduire au maximum la souffrance des souris. Des points limites ont été établis et entraîneront la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire. Pour la procédure d'ITT et GTT, les différents tests seront réalisés en respectant un intervalle d'au moins une semaine entre chaque test afin de réduire le stress imposé à chaque animal. De plus, tous les prélèvements sanguins seront réalisés sous anesthésie générale. Les souris auront dans leur cage du coton, ainsi que des tubes en plastique et des batonnets à ronger (enrichissement).

Ce projet devrait permettre de mieux comprendre la physiopathologie du SPTCL/SH chez l'Homme et de proposer de nouvelles thérapeutiques pour le traiter.

19487 L'imagerie optique des tissus sur animal vivant est actuellement la seule méthode pour étudier les aspects dynamiques des processus physiologiques ou pathologiques à l'échelle subcellulaire. En cancérologie, elle représente une méthode de choix pour identifier les principaux acteurs et voies d'expression impliqués dans les processus tumoraux (angiogénèse, interactions et recrutements cellulaires, interactions avec le microenvironnement). Cette méthodologie nécessite la pose de chambres d'imagerie qu'elles soient craniennes, dorsales ou abdominales. Plusieurs modèles de chambre existent mais d'aucun n'est prouvé être applicable à des suivis long terme. Ors la plupart des processus biologiques se déroulent sur plusieurs jours ou semaines. Par ailleurs aucun de ces modèles n'est compatible avec plusieurs modalités d'imagerie simultanément et ne permet donc pas la collecte des différentes informations biologiques à partir de ces images sur un même individu. Face à cette lacune, notre laboratoire a développé un nouveau modèle de chambre dorsale validé pour sa haute tolérance par l'animal (plusieurs mois) et son caractère multimodal. Il permet ainsi de suivre les comportements cellulaires individuels et/ou collectifs sur un même animal au cours du temps en imagerie optique, ultrasonore, par résonance magnétique et par tomographie rayons X. Ce modèle a depuis peu été décliné dans sa version abdominale et les procédures d'implantation chirurgicale et d'imagerie doivent être donc vérifiées et mises au point sur l'animal.

Concernant la mise au point des procédures chirurgicales, les fantômes polymériques d'animaux ne peuvent être considérés comme modèle adapté car : 1- ils ne reproduisent pas finement l'élasticité naturelle de la peau, élasticité qui est un paramètre primordial dans la pose de chambres intravitales ; 2- ne permettent pas le contrôle de l'étanchéité du système et des sutures pour prévenir toute infection ou sécrétion de fluides endogènes vers l'extérieur. Leur emploi aurait été justifié si aucune expertise n'était acquise par l'équipe en chirurgie expérimentale et l'apprentissage aurait pu ainsi être initié sur fantomes. De plus, l'étape ultime du projet requiert par définition le recours à l'animal s'agissant d'étudier le suivi du développement tumoral sachant qu'aucune greffe de cellules ne peut être considérée sur ces modèles de remplacement. Le recours à l'animal est donc indispensable pour l'ensemble du projet.

Un soin particulier a été porté au bien-être de l'animal. Ainsi la chirurgie sera pratiquée sous anesthésie générale et des analgésiques seront administrés. De l'enrichissement sera ajouté dans la cage au moment du change et de la nourriture gélinifiée sera mise à disposition après la chirurgie afin de favoriser la récupération. Les animaux seront surveillés quotidiennement et pesés à minima une fois/semaine. Leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer qu'il n'y a aucun signe de stress.

Afin de mener à bien ce projet, il est estimé un total de 65 souris. Une fois finalisé, ce projet ouvrira le champ des modèles tumoraux explorables en imagerie intravitale et non implatables selon

d'autres modalités de chirurgie et d'imagerie et de mieux comprendre les processus biologiques conduisant à leur progression et dissémination de ces tumeurs.

19488 Les douleurs neuropathiques et pathologiques chroniques sont en général consécutives à des lésions du système nerveux. Dans leur grande majorité, ces douleurs sont insensibles aux principaux analgésiques tels que l'acide acétylsalicylique (aspirine), le paracétamol, l'indométhacine, les dérivés morphiniques et les benzodiazépines. Ces douleurs sont liées à des perturbations de l'équilibre fonctionnel des structures nerveuses spinales et supraspinales contrôlant la nociception. Il apparaît donc évident que les composés à découvrir pour la pharmacothérapie des douleurs neuropathiques et pathologiques chroniques devraient nécessairement être de puissants modulateurs de l'activité des réseaux de neurones nociceptifs spinaux et supraspinaux. Diverses pistes sont explorées parmi lesquelles la voie de l'acide gamma-amino-butérique (GABA) qui est le principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux central. Pour l'instant, les essais cliniques réalisés avec les agonistes classiques des récepteurs GABAA et GABAB n'ont pas donné de résultats satisfaisants dans le cadre des douleurs neuropathiques sévères.

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

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

Le principal but de ce projet est d'utiliser une approche pluridisciplinaire et translationnelle pour développer des stratégies thérapeutiques efficaces permettant de combattre les causes de souffrance axonale. Les objectifs du projet sont de disséquer les mécanismes qui sont à l'origine des anomalies, d'utiliser de façon pertinente les outils technologiques de qualité à la disposition de l'Unité pour le suivi de l'évolution de la pathologie. Il s'agit également de mettre au point des stratégies thérapeutiques à partir des modèles animaux développés pour la neuroprotection. Ce projet permettra le transfert d'hypothèses physiopathologiques vers la clinique et vice-versa. Les modèles animaux (rat) développés se font dans le respect des règles de 3R. Réduire : le nombre d'animaux utilisés dans les expériences de comportement est nécessaire et suffisant pour valider statistiquement les expériences (6-8 animaux pour les groupes expérimentaux et 4 animaux pour les groupes naïfs et sham (cf 3. 4. 10)). Raffiner : les protocoles sont optimisés et les expériences ne sont répétées qu'une fois. Remplacer : les mécanismes biochimiques et moléculaires mis en jeu dans nos études sont étudiés sur des cultures de cellules. C'est ainsi que nous avons développé la culture cellulaire provenant des ganglions rachidiens pour appréhender les mécanismes mis en jeu au cours de l'apparition des neuropathies. Les animaux sont surveillés tous les jours et les signes cliniques de souffrance sont évalués (posture, aspect du poil, alimentation et poids, à partir de la mise en place de la ligature). La mise à mort des animaux est réalisée par des méthodes appropriées et autorisées et des personnes expérimentées (niveau II minimum).

Les objectifs du projet sont:

- Utiliser de façon pertinente les outils technologiques de qualité à la disposition de l'unité pour le suivi de l'évolution de la pathologie
- Mettre au point des stratégies thérapeutiques à partir des modèles animaux développés pour tester des substances neuroprotectrices
- Permettre le transfert d'hypothèses physiopathologiques vers la clinique et vice-versa.

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

19489 Depuis quelques années, un nombre croissant d'études indiquent que l'autisme et la schizophrénie pourraient être des maladies neurodéveloppementales (MND) caractérisées par des altérations anatomiques du cortex apparaissant lors des phases de développement précoce ou de maturation du cerveau. Ce projet s'intègre dans une thématique générale de recherche qui vise à étudier la mise en place du système nerveux chez la souris. Nous nous intéressons tout particulièrement au rôle de la voie de signalisation Eph/ephrin, un système de communication entre cellules voisines qui joue un rôle important dans de nombreux processus développementaux et physiologiques. Nous nous focalisons plus précisément sur deux membres de la famille des ephrinBs : ephrin-B1 et ephrin-B2 qui présentent des patrons d'expression partiellement recouvrant dans le cortex embryonnaire. L'objectif du présent projet de recherche est d'étudier les conséquences de mutations dans les gènes EfnB1 et EfnB2 sur le développement du neocortex. Ce projet fait appel d'une part à des lignées existantes de souris génétiquement modifiées pour les gènes Efnb1 et Efnb2 mais aussi des lignées exprimant la Cre recombinase ou portant des mutations sur des gènes en aval de la signalisation. Il inclut l'entretien des lignées, des croisements en vue d'obtenir des embryons à différents stades de développement et des prélèvements d'embryons. Ces procédures n'entraînent pas de douleurs ou de souffrance. Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés, nous concentrerons nos analyses sur 4 stades clés du développement embryonnaire. Les analyses (immunohistochimiques, imagerie en temps-réel et génomiques) seront réalisées sur 10 individus pour chaque génotype à chaque stade, ce qui est le minimum pour obtenir des résultats statistiquement fiables. Concernant l'histologie, les échantillons seront inclus en paraffine ce qui nous permet de collecter un grand nombre de coupes pour chaque échantillon et ainsi réaliser toute la série de marquages immunohistochimiques nécessaires à la caractérisation des phénotypes. D'autre part, ce projet comprend la génération de nouvelles lignées de souris par la technique d'édition du génôme CRISPR/Cas9. Cette procédure nécessite un acte chirurgical pour réimplanter les embryons modifiés dans l'utérus d'une mère porteuse. Afin de réduire la douleur, la chirurgie est réalisée sous anesthésie et l'animal bénéficie de traitement analgésiques post-opératoires. Tous les animaux sont hébergés en milieu enrichi, 5 animaux maximum par cage, sauf en cas de portée (une mère/une portée par cage), ainsi que pour les mères porteuses après chirurgie (une par cage). Une observation minutieuse quotidienne sera effectuée. Au total, 1114 souris seront utilisées pour ce projet.

19490 Le système endocannabinoïde (EC) est impliqué dans le contrôle de la prise alimentaire, du métabolisme énergétique et participe au développement de l'obésité et du diabète de type 2. Le fait qu'il soit suractivé au cours de l'obésité et que les EC soient capables de moduler la sensibilité à l'insuline des tissus et leur capacité à produire de l'énergie (captation de glucose, biogenèse mitochondriale) suggère un rôle potentiel du système endocannabinoïde dans le contrôle de l'homéostasie protéique, en particulier au niveau musculaire. Des résultats préliminaires obtenus montrent que certains antagonistes de ce système stimulent la synthèse protéique dans un modèle de cellules musculaires in vitro.

La sarcopénie se définit comme la perte involontaire de masse, force et fonction musculaire associée au vieillissement. Sa physiopathologie est complexe et résulte de la combinaison de l'altération de différents facteurs : augmentation de la dégradation protéique, diminution de la synthèse protéique, diminution de l'activité mitochondriale musculaire et résistance aux stimuli anaboliques incluant insuline et acides aminés. La résistance aux stimuli anaboliques observée avec l'âge est encore mal comprise mais pourrait résulter d'une infiltration lipidique musculaire accrue ou d'altérations mitochondriales. Ce type d'atteintes est également couramment observé au cours de l'obésité, et cette dernière accroît la fonte musculaire au cours du vieillissement. On parle alors d'obésité sarcopénique. Dans ce contexte, le système endocannabinoïde a un rôle majeur potentiel puisqu'il contrôle le développement de l'obésité, de l'insulinorésistance et l'activité mitochondriale.

Le rôle de ce système dans le contrôle de l'anabolisme musculaire et ses altérations éventuelles au cours du vieillissement n'ont à ce jour pas été caractérisés. L'objectif de cette étude sera d'étudier les liens potentiels entre système endocannabinoïde et anabolisme musculaire (principalement la

synthèse protéique) dans le cadre d'une obésité induite chez des souris âgées. Pour cela, des souris âgées seront soumises soit à un régime contrôle soit à un régime riche en graisses et en sucre (HFD) pendant 25 semaines. Une partie des souris nourries avec le régime HFD sera traitée durant les 6 dernières semaines de régime avec un antagoniste du système EC pour l'inhiber (HFD+antagoniste). Puisque l'antagoniste utilisé est connu pour modifier la prise alimentaire, un groupe de souris HFD pair-fed sera utilisé ; ce groupe recevant l'apport alimentaire journalier mesuré dans le groupe HFD+antagoniste. Nous utiliserons également un groupe de souris adultes pour nous permettre de quantifier le degré de sarcopénie de nos souris à la fin des régimes et traitement. A la fin de ce régime, 22 animaux par groupes seront abattus : 11 animaux à jeun et 11 animaux en période post-prandiale. Nous comparerons les mesures effectuées durant les phases pré- et post-prandiales, puisque de nombreux travaux démontrent que la synthèse protéique musculaire est principalement altérée en phase post-prandiale, et proviendrait d'un défaut de réponse à l'action anabolique des nutriments et hormones associés à la prise alimentaire.

Le protocole proposé s'inscrit dans le respect de la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement) pour l'expérimentation animale. Nous ne pouvons pas remplacer cette expérimentation animale par une expérimentation in vitro ou ex vivo mais nous avons réduit le nombre d'animaux en optimisant le nombre d'animaux par lots. Nous mettrons en œuvre des méthodes permettant de limiter au maximum la douleur et la souffrance de nos animaux, en utilisant des cages adaptées et en surveillant quotidiennement les animaux afin de prendre rapidement des décisions de soins ou d'exclusion d'animaux en souffrance. Pour répondre aux objectifs de cette étude nous utiliserons 120 souris réparties en 5 groupes expérimentaux (5x22 souris) et un groupe test (10 souris) pour déterminer la meilleure voie d'administration de l'antagoniste.

19491 Le fonctionnement du cerveau repose sur des circuits de neurones connectés par l'intermédiaire de synapses. Les synapses sont des nanomachines moléculaires dont la composition et l'organisation déterminent quels neurones sont connectés et comment les signaux sont transmis d'un neurone à l'autre. Elles sont au cœur de tous les comportements et de toutes les capacités cognitives. En conséquence, des changements subtils induits par des mutations de gènes synaptiques sont une cause majeure de troubles neurodéveloppementaux et psychiatriques tels que l'épilepsie, l'autisme ou les déficiences intellectuelles. Des changements subtils sont également apparus au cours de l'évolution humaine, conduisant les synapses à être beaucoup plus nombreuses chez l'homme que chez les autres mammifères, y compris les primates non-humains, et à se développer sur des périodes beaucoup plus longues. La plasticité synaptique, qui est à la base de nos apprentissages et de notre mémoire, présente également des spécificités chez l'homme. Ces caractéristiques contribuent à l'unicité du cerveau humain, à ses capacités cognitives distinctives et à sa susceptibilité aux maladies. Notre objectif est de comprendre les mécanismes fondamentaux du développement et de la plasticité synaptique chez les mammifères et d'identifier des régulations spécifiques à l'homme.

Notre laboratoire utilise la souris comme modèle de mammifère car c'est le seul mammifère aisément modifiable génétiquement. Les stratégies utilisées pour étudier les synapses reposent sur des modifications génétiques ciblées introduites le plus souvent par des méthodes chirurgicales. Les conséquences fonctionnelles sont analysées à différents stades du développement (postnatal, jeune, adolescent ou adulte) en utilisant des techniques de microscopie à haute résolution, d'électrophysiologie, ou des approches dites « omiques ». La réalisation de ce projet se fera suivant les règles de bonnes pratiques d'expérimentation animale, notamment la règle des 3R (Remplacer, réduire, raffiner). Nous utiliserons des approches in vitro autant que cela est possible et nous resterons vigilants quant au développement de nouvelles méthodes mais il n'existe à l'heure actuelle pas de méthode alternative fiable à l'utilisation du modèle murin pour comprendre la formation des circuits neuronaux. Le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum nécessaire pour répondre à la question scientifique et les expériences réalisées seront optimisées dans la mesure du possible. L'inconfort des souris sera réduit autant que possible grâce à une analgésie, une anesthésie, un suivi postopératoire et un environnement adaptés, ainsi que l'observation de points limites.

Ce projet de recherche nécessitera environ 3935 animaux.

19492 La sédentarité augmente le risque de développement de maladies cardiovasculaires et de diabète ainsi que d'autres pathologies associées à une augmentation de la concentration de cytokines pro-inflammatoires dans le plasma. Les principales cytokines pro-inflammatoires sont IL-6, TNF-alpha et IL-1 beta. La production de ces médiateurs cellulaires peut être régulée par l'action de cytokines anti-inflammatoires telles que IL-4 et IL-10. Le muscle squelettique est une source importante de ces deux catégories de cytokines avec lors de la contraction musculaire une augmentation de la production d'IL-6. De plus, un exercice physique violent peut être considéré comme un facteur de stress menant à des syndromes inflammatoires. En revanche, un entraînement chronique peut médier ces réactions inflammatoires par la production de cytokines à activités anti-inflammatoires.

L'utilisation de compléments alimentaires peut aider à la récupération entre deux séances d'entraînement, d'autant plus si ces compléments alimentaires apportent des molécules à activité anti-oxydante. Les microalgues, sont des microorganismes qui produisent de nombreuses molécules à activités biologiques connues pour avoir des effets sur la prévention de l'installation de maladies cardiovasculaires pouvant être associées à des dyslipidémies ou à un stress cellulaire. Actuellement, de nombreux industriels cherchent à valoriser ces microalgues en les utilisant comme compléments alimentaires afin de valider leur efficacité.

L'objectif de cette étude est de tester deux extraits de microalgues apportés dans le régime alimentaire de rats au cours d'un entraînement d'endurance, afin de voir si les molécules d'intérêt contenues dans ces microalgues, ont une action sur la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires.

Le modèle rat est retenu pour cette étude. L'objectif étant de pouvoir transférer les résultats qui seront obtenus à la nutrition humaine, un modèle murin est requis. Etant donné qu'un certain nombre d'analyse sera effectué sur le sang et sur différents tissus (muscle squelettique et foie), les prélèvements effectués sur le rat permettront d'avoir des quantités suffisantes afin de mener à bien cette étude. Pour cela, quarante huit rats mâles Wistar adultes vont être soumis pendant 8 semaines à un régime standard d'entretien supplémenté avec un complément alimentaire contenant un extrait de microalgue. A ce régime alimentaire, va être associé un protocole de course sur tapis roulant, équivalent à un entraînement modéré d'endurance. Six lots vont être constitués avec huit animaux par lot: un lot contrôle, un lot extrait microalgue 1, un lot extrait microalgue 2, un lot contrôle+entraînement, un lot extrait microalgue 1+entraînement, un lot extrait microalgue 2+entraînement.

Après une semaine d'adaptation consistant à apprendre à courir aux rats, un protocole permettant d'augmenter graduellement le temps de course ainsi que la vitesse, sera mis en oeuvre afin d'atteindre une vitesse de 20 m/min pendant 20 minutes, 5 jours par semaine. Afin de minimiser tout phénomène de stress ou d'angoisse, des grilles d'évaluations sont établies lors du protocole d'entraînement. Le suivi de l'entraînement est effectué par du personnel qualifié et de façon ininterrompue. Dès l'apparition d'un stress (modification de la physionomie du visage), d'une posture non adaptée (voûtée ou prostrée), d'un comportement inhabituel (agitation) ou d'une appréhension vis à vis de la course, la séance d'entraînement est interrompue. Si cette situation se présente à nouveau lors d'une nouvelle séance d'entraînement, le rat est exclu du protocole et réversé dans le lot contrôle. Le tapis de course est muni de 5 pistes séparées par des parois en plexiglas, ce qui permet à chaque rat de voir son congénère. Le système est adapté au rat, ce qui évite tout risque de coincement de la queue ou d'une patte. En cas de plaie éventuelle, un antiseptique et un cicatrisant sera posé et le rat sera dispensé d'entraînement jusqu'à récupération de son intégrité physique.

Les rats sont hébergés dans une animalerie en conditions contrôlées (éclairage, température, hygrométrie) et dans le respect de la méthode des 3R. Un suivi de soin journalier sera effectué (suivi de la prise alimentaire, évaluation de l'eau de boisson consommée) ainsi qu'un suivi deux fois par semaine du poids corporel des animaux. Au cours de ces visites, il sera aisé

d'observer un comportement éventuel non approprié tel qu'un comportement agressif, un aspect physique pouvant être un signe de carence ou de domination. Le milieu sera enrichi en objets permettant aux animaux de créer un environnement propice à leur développement et à leur épanouissement.

A la fin du protocole de huit semaines, les rats sont anesthésiés par un mélange kétamine/xylazine (Imalgène 1000 100 mg/kg et xylazine 2% 10 mg/kg). Une fois anesthésiés, la totalité du sang est prélevée au niveau de l'aorte abdominale. Le foie et le muscle gastrocnémien sont prélevés. Le dosage des cytokines pro- et anti-inflammatoires sont mesurées par méthodes ELISA au niveau du plasma. Un dosage des réserves en lactate et en glycogène est aussi effectué au niveau des tissus hépatiques et squelettiques par méthodes spectrophotométriques.

19493 La fibrose pulmonaire est une pathologie qui conduit à un dysfonctionnement des organes et une insuffisance respiratoire, ceci a un impact considérable sur la qualité de vie. Malgré une avancée majeure dans ce domaine, il est nécessaire d'améliorer davantage nos connaissances sur les mécanismes impliqués dans la fibrose pulmonaire, afin d'améliorer le management thérapeutique de cette pathologie ainsi que la qualité de vie des patients. Plusieurs facteurs peuvent causer la fibrose pulmonaire,

entre-autre les traitements anti-cancéreux (la radiothérapie et la chimiothérapie). En effet les données cliniques montrent que les patients guéris de leurs cancers développent à long terme une fibrose au niveau du site ayant reçu la radiothérapie

et dans la plus part des cas ses patients décèdent suite aux complications causées par la fibrose (ex: insuffisance respiratoire dans le cas de la fibrose pulmonaire ou insuffisance cardiaque dans le cas de la fibrose cardiaque). Des études ultérieures avaient bien mis en évidence les facteurs cellulaire et moléculaire impliqués dans la fibrogénèse et qui sont le fibroblaste et le TGFb1 respectivement. Cependant, des études récentes ont suggéré un rôle des macrophages en tant que régulateurs cellulaires critiques de la fibrose pulmonaire et en particulier les macrophages polarisés M2 qui produisent de grandes quantités de TGFb1. De manière intéressante, il a été démontré que la fibrose pulmonaire induite par les irradiations est souvent associée à une importante infiltration de macrophages. Cependant le profil des macrophages ainsi que leur implication dans le processus de fibrose radio-induite n'ont jamais été déterminés.

L'objectif de ce projet est de : 1/Caractériser le profil des macrophages qui infiltrent la fibrose pulmonaire, 2/déterminer le rôle des macrophages dans le développement de la fibrose pulmonaire, 3/ évaluer si les macrophages constituent une cible thérapeutique potentielle pour prévenir le développement de la fibrose pulmonaire radio-induite.

La radiothérapie et la chimiothérapie engendrent chez le patient des effets secondaires importants aux niveaux des tissus sains comme la fibrose, provoquant ainsi la perte de fonction de l'organe touché.

Une avancée importante dans ce domaine va permettre d'améliorer la qualité de vie des patients guéris de leurs cancers. Afin de pouvoir comprendre la pathologie de fibrose et proposer des solutions thérapeutiques, le recours à l'utilisation d'un modèle animal (organisme vivant entier) est nécessaire et indispensable du fait que la fibrose est un processus physiopathologique qui implique plusieurs composantes cellulaires et moléculaires. De plus, l'efficacité des molécules thérapeutiques ne peut se vérifier que sur un modèle in vivo.

Nous avons mis en place des stratégies d'expérimentation et d'observation afin de réduire au minimum la souffrance et la douleur des animaux. En effet, l'induction de fibrose par des rayonnements ionisants sera pratiquée sous anesthésie générale de la souris afin de réduire au minimum la souffrance et l'angoisse des animaux. Les souris seront hébergées en groupe pour minimiser le stress de l'isolement. L'environnement des animaux sera enrichi en permanence par du coton ou des nids en carton afin de diminuer leur angoisse et favoriser leur bien être. Une pesée sera effectuée régulièrement. Les points limites seront strictement appliqués. La première partie du projet est terminée et a donné les résultats attendus.

Dans le deuxième volet de ce projet, nous allons d'une part évaluer l'effet thérapeutique d'un anti-CSF1 (anticorps qui déplete les macrophages) dans le développement de la fibrose pulmonaire radio-induite, et d'autre part nous allons évaluer la réponse des tumeurs aux rayonnements ionisants combinés avec des immuno-modulateurs (anti-CSF1R et anti-PD1).

Nous avons mis en place des stratégies d'expérimentation et d'observation afin de réduire au minimum la souffrance et la douleur des animaux. En effet, l'induction de fibrose par des rayonnements ionisants sera pratiquée sous anesthésie générale des souris afin de réduire au minimum la souffrance et l'angoisse des animaux. Une anesthésie locale (lidocaïne) sera également appliquée avant de procéder à l'injection intra-péritonéale des drogues. Les souris seront hébergées en groupe pour minimiser le stress de l'isolement. L'environnement des animaux sera enrichi en permanence par des sizzlenests et des tunnels en carton afin de diminuer leur angoisse et favoriser leur bien être. Une pesée sera effectuée régulièrement.

Le nombre d'animaux sera adapté pour atteindre les objectifs du projet (Deuxième volet) et réduire au minimum le nombre d'animaux. En effet, une analyse statistique a priori a été effectuée afin de calculer le nombre d'animaux nécessaires pour détecter des différences significatives et qui permet de réduire au minimum le nombre d'animaux, qui a été estimé au maximum à 760 souris.

19494 Contexte

L'ostéosarcome est la plus fréquente des tumeurs osseuses malignes, qui touche principalement les enfants et les jeunes adultes. La chirurgie et la chimiothérapie constituent la norme de soin, mais même en employant les approches les plus agressives, le taux de survie ne s'est pas amélioré au cours des trois dernières décennies. Chez environ 40 % des patients, l'ostéosarcome réapparaît ou s'aggrave dans les cinq ans suivant le traitement initial. La réponse de la tumeur initiale à la chimiothérapie avant la chirurgie est un facteur prédictif important de survie. Cependant, près de la moitié des patients sont classés comme mauvais réponders. De nouvelles stratégies visant à améliorer le contrôle préopératoire de la tumeur sont donc nécessaires.

Objectifs du projet

Ce projet vise à utiliser une nouvelle forme de radiothérapie (RT) pour améliorer le pronostic de l'ostéosarcome. Cette technique de radiothérapie unique délivre des rayons X à haute énergie dans un réseau de faisceaux parallèles micro-planaires, ce qui permet de délivrer rapidement des doses supérieures du même ordre de grandeur au moins que la radiothérapie conventionnelle. Les propriétés physiques uniques de cette modalité de RT peuvent être exploitées pour augmenter le bénéfice thérapeutique de la RT pour les patients. Il s'agit notamment de :

A. Minimiser les dommages des tissus sains environnants, ce qui constitue souvent le facteur limitant la dose dans la RT conventionnelle.

B. Augmenter sélectivement la perméabilité des vaisseaux sanguins tumoraux aux médicaments chimiothérapeutiques, augmentant ainsi leur délivrance et leur absorption par le tissu tumoral et, en fin de compte, leur potentiel thérapeutique.

C. Modulation du système immunitaire pour susciter une attaque anti-tumorale.

Par conséquent, ce projet vise à définir comment cette nouvelle stratégie de RT améliore l'efficacité du traitement de l'ostéosarcome selon les propriétés énumérées ci-dessus, en particulier en améliorant l'absorption des médicaments chimiothérapeutiques dans la tumeur.

Bilan des dommages/bénéfices

Nous demandons un total de 580 souris femelles Balb/c pour la durée de ce projet. L'utilisation d'un modèle de souris est indispensable pour récapituler les processus complexes à l'origine de la croissance et de la progression des tumeurs observées chez les patients humains. Ainsi, les cellules tumorales doivent se développer dans le contexte 1) du microenvironnement osseux, 2) d'une vascularisation fonctionnelle et 3) d'un système immunitaire fonctionnel ; tous ces éléments influencent la progression de la maladie et la réponse au traitement. Ces caractéristiques ne peuvent être récapitulées en dehors d'un hôte animal. Les animaux subiront une implantation chirurgicale de cellules tumorales sous anesthésie pour générer le modèle de la maladie et seront

soumis à une irradiation ciblée avec des doses bien inférieures aux doses maximales tolérées précédemment publiées pour ces animaux. D'autres procédures impliquent l'injection de substances et des procédures d'imagerie, toutes essentielles pour étudier les effets cliniques de cette nouvelle RT sur l'ostéosarcome et faciliter l'amélioration des soins prodigués aux patients souffrant de cette maladie. L'ostéosarcome est une maladie d'intérêt clinique et constitue une voie de translation possible pour cette modalité de RT vers une utilisation humaine. Les données générées dans ce projet ouvriront la voie à un essai clinique utilisant cette technique de RT pour l'ostéosarcome et marqueront le premier essai clinique ayant recours à cette modalité de RT. Cela n'aurait pas été possible sans des investigations précliniques sur des modèles d'animaux pertinents. Plus largement, la démonstration de sa capacité à renforcer l'effet de la chimiothérapie pourrait profondément affecter la façon dont d'autres cancers solides sont traités, en particulier les cancers réfractaires ou résistants aux traitements actuels tels que le cancer du pancréas, le glioblastome et le carcinome pulmonaire avancé, qui ont tous actuellement un pronostic désastreux.

Conformité avec la règle des 3R

Le nombre d'animaux est spécifiquement calculé pour garantir l'utilisation du nombre minimal d'animaux afin de répondre aux exigences statistiques nécessaires pour prouver une pertinence clinique solide. Le nombre d'animaux est considérablement réduit par l'utilisation de techniques d'imagerie non invasives afin d'éviter de devoir sacrifier un animal dans le seul but de surveiller la progression et la taille de la tumeur. Des interventions et des points finaux strictement humains seront suivis pour minimiser la souffrance, l'inconfort et le stress des animaux. Toutes les procédures susceptibles d'induire un stress ou un inconfort chez les animaux seront effectuées sous anesthésie. Des fiches détaillées évaluant le bien-être des animaux seront conservées et le comportement des animaux fera l'objet d'une surveillance quotidienne afin que des interventions puissent avoir lieu dès les premiers signes de douleur et/ou de détresse.

19495 Les inflammations généralisées associées à une infection grave constituent 1/3 des décès à l'hôpital et sont causées, dans un grand nombre de cas, par infections originaires de la cavité abdominale. Ces infections sont dues à des bactéries libérant de puissants activateurs de l'inflammation : les lipopolysaccharides (LPS). Les LPS présents dans la cavité péritonéale passent rapidement dans la circulation, déclenchant une réaction inflammatoire incontrôlée.

Les récepteurs de lipides (CD36 et GPR120) sont non seulement responsables de la perception lipidique mais jouent également un rôle important dans la régulation de l'inflammation. Ainsi ces deux récepteurs pourraient représenter une cible thérapeutique d'intérêt pour traiter l'inflammation.

Nous avons pu mettre en évidence plusieurs molécules bio-sourcées « faux lipides » dérivées d'acides gras naturels capables d'interagir avec ces récepteurs et d'induire une modulation du comportement alimentaire lipidique.

Le projet vise à déterminer si une supplémentation par ces molécules bio-sourcées permettrait de protéger contre les effets néfastes des LPS dans un modèle de péritonite chez la souris.

La première étape de ce projet consiste à la mise au point d'un modèle de péritonite chez la souris. Des doses croissantes de LPS seront injectées pour déterminer la dose induisant une mortalité de 50 % au bout de 12 jours.

Une fois le modèle mis au point, la deuxième étape consistera à déterminer les effets de la supplémentation en molécules bio-sourcées dans ce modèle.

Ces études nécessiteront au total l'utilisation de 640 souris (C57Bl6/J) et se dérouleront sur 2 ans.

Nous utiliserons une stratégie suivant la règle des 3R. Tous les tests de caractérisation des composés, réalisables sur cultures cellulaires seront faits. Cependant, la complexité du processus inflammatoire rend indispensable l'étude sur animal entier. Nous réduirons le nombre d'animaux au minimum requis pour remplir les conditions des tests statistiques.

Nous raffinerons nos expérimentations en administrant les molécules bio-sourcées par gavage. Une attention particulière sera apportée au bien-être des animaux (densité par cage, enrichissement du milieu). Nous utiliserons des points limites précoces permettant d'éviter une souffrance

susceptible d'avoir une incidence grave sur l'état général des animaux. Le modèle de péritonite sera appliqué par du personnel qualifié et entraîné.

19496 Malgré l'arsenal thérapeutique aujourd'hui disponible pour la prise en charge du diabète de type II (T2D), cette maladie reste la 7ème cause de mortalité dans le monde. La résistance à l'insuline, cause majeure de la pathologie, s'installe progressivement et silencieusement et continue de progresser malgré les prises en charges thérapeutiques. En effet, les médicaments de première intention que sont par exemple la metformine s'attaquent à l'hyperglycémie associée au T2D mais pas à la racine du problème qui reste la résistance à l'insuline.

Il a été préalablement démontré que notre molécule, analogue de la protéine humaine HIP/PAP dont les actions anti-inflammatoire et anti-oxydative sont largement décrites, ciblait la résistance à l'insuline dans des modèles murins de prédiabète (modèle génétiquement obèse et modèle dont l'obésité est induite par une nourriture riche en gras, HFD).

L'objectif de ce projet est de démontrer le bénéfice d'une combinaison thérapeutique sur le métabolisme du glucose en associant notre molécule analogue de HIP/PAP à un des médicaments de première intention (metformine...).

Le projet se divisera en quatre axes d'étude permettant d'étudier notre molécule en combinaison avec chacune des 3 classes thérapeutiques : biguanide (metformine, 2 doses), agoniste du GLP-1 et inhibiteur des SGLT2.

Chaque axe sera étudié sur 2 modèles d'étude : le modèle génétique diabétique et obèse (hyperglycémie et hyperinsulinémie sévères) et le modèle non-génétique HFD (modèle plus modéré et plus physiologique).

Pour cela nous combinerons une perfusion continue de 14 jours en sous cutanée de notre molécule associée à une assimilation orale dans l'eau de boisson des médicaments de première intention (hormis pour le traitement par l'agoniste du GLP-1 qui se fait par voie sous-cutanée) sur des souris génétiquement obèses ou obèses induit par un régime HFD. A l'issue du traitement, nous réaliserons des tests de tolérance au glucose et à l'insuline pour mesurer les effets du traitement pour contrôler la glycémie en mimant un rapport en sucre (test de tolérance au glucose) ou un traitement à l'insuline.

Les résultats de ce projet, qui seront directement exploités pour le design et la mise en place d'un essai clinique chez l'homme, devraient valider l'effet amplificateur de cette nouvelle molécule anti-diabétique sur la résistance à l'insuline.

A terme, ces combinaisons thérapeutiques devraient permettre de freiner la progression de la résistance à l'insuline et donc de repousser voire de limiter l'utilisation d'insuline, dernier rempart thérapeutique pour contrer les complications liées au diabète de type II.

Notre projet se fera sur un nombre total de 480 souris et respectera la règle des 3R.

Remplacement : Notre projet correspond à un travail de phase préclinique visant à tester l'effet anti-diabétique d'une nouvelle molécule. C'est donc un passage obligé vers la clinique et l'Homme. Il n'existe pas actuellement de modèle in vitro permettant de reproduire la complexité d'un organisme vivant.

Réduction : Nous limitons au maximum le nombre d'animaux (n=10) par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables et interprétables. En effet, dans ce domaine de la diabétologie et le type de mesures que nous allons effectuer, un nombre égal à 10 est largement documenté pour donner des résultats fiables et pertinents.

Raffinement : l'ensemble des procédures de ce projet vise à concilier une interprétation fiable des résultats et le respect du bien-être animal. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation. Les chirurgies sont réalisées sous anesthésie générale et la prise en charge de la douleur est prévue avant pendant et après l'opération. De plus, des points limites adaptés (chute importante de la glycémie au cours du test, perte d'un implant...) aux procédures expérimentales ainsi que des critères d'arrêt des souffrances (perte de poids supérieur à 15%...) sont mis en place.

19497 Ce projet vise à explorer l'effet de l'inactivation du gène Nf1 dans des cellules périvasculaires du poumon sur le développement de l'hypertension pulmonaire (HP), pathologie qui affecte des patients atteints de Neurofibromatose de type 1 (NF1). NF1 est une pathologie génétique complexe qui, en plus des tumeurs des nerfs présentes chez tous les patients, chez environ 10% d'entre eux conduit au développement de l'HP dont l'origine cellulaire reste inconnue. Des travaux récents suggèrent que la mutation de NF1 dans les cellules du système vasculaire (cellules endothéliales ou/et péricytes) serait à l'origine de l'HP. Ici, nous allons étudier l'effet de l'inactivation de NF1 dans des péricytes sur le développement de l'HP. Pour cela nous croiserons trois lignées de souris : Krox20Cre, Nf1fl/fl et Rosa26tdTom afin d'obtenir les souris mutantes Krox20Cre, Nf1fl/fl, R26tdTom. Le phénotype vasculaire et pulmonaire des souris mutantes sera étudié.

La stratégie de conception des expériences a pour vocation de répondre de manière non ambiguë à des questions posées tout en respectant la règle de 3R (Réduire, Remplacer, Raffiner). Pour la Réduction ; Le nombre et le génotype des souris qui seront utilisées dans chaque procédure ont été définis en prenant en compte : (i) la complexité des croisements génétiques nécessaires à l'obtention des mutants et la pénétrance du phénotype des animaux ayant le même génotype, (ii) des données bibliographiques qui portent sur des expériences similaires, (iii) des discussions avec des pneumologues spécialistes de l'HP. Pour le Remplacement, il s'agit de concevoir d'un nouveau modèle animal de l'HP, pathologie incurable pour laquelle il n'existe aucun modèle ou des modèles disponibles ne récapitulant que partiellement la maladie. Les études décrites dans ce projet ne peuvent être donc accomplies avec un autre modèle animal ni des approches in vitro. Pour le Raffinement: nous surveillerons régulièrement l'état de santé des animaux afin de détecter tout signe de souffrance avérée (prostration, isolement, léthargie, perte de poids supérieure à 10% en 24h, poils hérissés, troubles de respiration) afin d'effectuer une mise à mort compassionnelle. Cette étude nécessite l'utilisation de 200 souris.

19498 En sélectionnant les animaux de rente pour des niveaux de production élevés, leurs capacités d'adaptation à des variations de leur environnement d'élevage (comme par exemple la variation de température ou la variation de quantité et de qualité de l'alimentation) ont été détériorées.

Cette sélection pour des niveaux de production élevés a eu des conséquences négatives sur la santé, la reproduction, et la longévité de carrière de ces animaux (moins 220j jours de durée de carrière productive en 20 ans) et par conséquent elle a affecté l'efficacité de production.

La capacité d'adaptation d'un animal est le résultat de mécanismes adaptatifs agissant à différents niveaux physiologiques. Ils sont en partie sous le contrôle des conditions d'élevage et de nutrition (notamment dans le jeune âge), du statut physiologique de l'animal, mais aussi de son patrimoine génétique.

Des lignées de chèvres sélectionnées sur leur longévité de carrière productive existent dans notre institut, traduisant une capacité d'adaptation aux conditions d'élevage plus ou moins importante. Nous souhaitons voir comment cette sélection génétique a pu modifier les capacités d'adaptation dès le jeune âge des chevreaux. Le projet reposera sur l'étude de 52 chevreaux de race Alpine, dont les mères ont été sélectionnées sur leur longévité de carrière productive.

L'ensemble des chevreaux sera étudié sur des caractères de croissance (pesées hebdomadaires), d'efficacité alimentaire (mesure de l'aliment ingéré), de réponse à une restriction alimentaire (70% des besoins quotidiens sur une période de 2 mois entre 5 et 7 mois d'âge), de mise en place de la puberté (dosages sanguins bimensuels d'hormones de la reproduction) et de production de semence (collectes en vagin artificiel) afin de mieux comprendre les déterminants de la capacité d'adaptation des chevreaux. Le protocole comprend donc 4 lots d'animaux : 2 régimes alimentaires et 2 lignées génétiques.

Prise en compte de la règle des 3R :

--Remplacement : compte tenu de l'objectif du projet (évaluer le lien entre génétique et capacité d'adaptation chez les chevreaux), le modèle animal ne peut pas être remplacé.

--Raffinement : les chevreaux seront hébergés en groupe, sur une litière paillée. Le milieu sera enrichi avec des plateformes avec un plan incliné sur lesquelles les animaux peuvent monter et

exprimer leur comportement naturel de jeux et de découverte. Ils feront l'objet d'une surveillance journalière pendant toute la durée du protocole.

--Réduction : le dispositif a été dimensionné pour permettre d'observer une différence statistique entre les 4 lots d'animaux sur la mesure biologique la moins variable.

19499 La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative qui se traduit par la disparition sélective des neurones dopaminergiques localisées dans une région du cerveau nommée la substance noire. Il existe des formes sporadiques et des formes héréditaires de la maladie de Parkinson. A ce jour, tous les traitements proposés en clinique visent à pallier les symptômes de la maladie tels que la rigidité, le tremblement, les mouvements anormaux, mais aucun traitement n'est capable de protéger les neurones qui dégèrent.

Depuis quelques années, des chercheurs à l'international travaillent sur des traitements pour limiter voire arrêter la progression de la maladie, en utilisant des stratégies thérapeutiques neuroprotectrices. Par exemple, l'administration de facteurs trophiques soutenant et nourrissant les neurones, peuvent empêcher leur dégénérescence. Cela a été démontré lors des études précliniques réalisées dans le modèle rongeur et le modèle primate non-humain, et également chez l'humain mais des effets secondaires ont entraîné l'arrêt des essais cliniques. C'est dans ce cadre de recherche que la protéine Parkine a été identifiée comme un bon candidat thérapeutique grâce à ces fonctions de « nettoyage » intracellulaire. La présence de formes mutées de la protéine Parkine trouvés dans les formes familiales de la maladie de Parkinson ont pour conséquence un mauvais fonctionnement de la Parkine et un engorgement progressif des neurones dopaminergiques provoquant ainsi leur dégénérescence. La protéine Parkine participe à plusieurs mécanismes biologiques impliqués dans la dynamique cellulaire pour «recycler » les déchets de la cellule et éviter son engorgement. Ceci est pertinent pour traiter les formes sporadiques et les formes héréditaires de la maladie de Parkinson.

L'hypothèse de recherche développée dans ce projet est que la thérapie génique ciblant la Parkine via l'utilisation d'un outil de transfert génique permettant d'augmenter son expression, pourrait être utilisée seule ou en combinaison avec l'administration locale d'un facteur trophique pour limiter voire arrêter la dégénérescence des neurones dopaminergiques dans la substance noire.

Des études préalables réalisées dans des modèles murins de la maladie de Parkinson, traités avec un vecteur viral entraînant la surexpression du gène codant pour la protéine Parkine ont démontré la capacité neuroprotectrice de cette protéine en limitant le développement du syndrome parkinsonien dans ces modèles.

Dans le cadre du projet, nous souhaitons, d'une part valider ces résultats en utilisant le même vecteur viral permettant la surexpression de la Parkine dans un autre modèle d'étude préclinique, plus proche de l'humain, le primate non-humain, et, d'autre part réaliser une étude de biodistribution et de sûreté de ce vecteur viral dans ce modèle. Ceci permettra d'obtenir une partie des données nécessaires pour un essai clinique de phase I/II chez l'humain.

Ce projet prévoit l'utilisation de primates non-humains, souvent utilisées comme modèles de la maladie de Parkinson, où la progression de la dégénérescence neuronale est bien connue et bien contrôlée. Nous utiliserons les mêmes techniques d'administration que chez l'Homme (neurochirurgie, neuronavigation) pour optimiser l'inoculation (en termes de volume, concentration virale, territoire cérébrale ciblé) et augmenter le volume de la région du cerveau qui surexprime la protéine Parkine. Les méthodes de détection des effets adverses potentielles seront identiques à ceux utilisées chez l'humain, tels que l'imagerie par résonance magnétique pour exclure des effets inflammatoires ou hémorragies, et l'observation clinique du comportement suivant une démarche strictement translationnelle.

Afin d'assurer la mise en place de notre stratégie expérimentale, le projet prévoit l'utilisation d'un maximum de 25 macaques adultes, mâles et femelles, sur 5 ans. Leur nombre a été réduit au minimum nécessaire pour obtenir des données exploitables statistiquement permettant d'évaluer l'effet de la délivrance d'agents thérapeutiques. Les primates non-humains étudiés dans le cadre de ce projet sont nés et élevés en captivité, dans des élevages agréés. Le recours à l'animal est

nécessaire, car aucun système synthétique ou in vitro ne permet aujourd'hui d'évaluer ces effets physiologiques.

Le choix de ce modèle, espèce proche de l'humain, s'explique par la complexité anatomique de son cerveau qui offre la possibilité d'évaluer les fonctions motrices et cognitives, en utilisant des échelles et tests de comportement non-douloureux et non-invasifs, très comparables, à ceux utilisés en clinique. Les procédures expérimentales de ce projet ont un degré de sévérité « modéré ». L'administration du traitement nécessitera une seule procédure chirurgicale standard, en utilisant des protocoles d'anesthésie et d'analgésie qui ont été définis et validés par le vétérinaire et la cellule de bien-être animal. Les séances d'imagerie et l'observation du comportement de l'animal utiliseront des techniques non-invasives. Afin d'éviter au maximum toute douleur chez les primates, des points limites ont été définis au niveau de chaque geste invasif et en veillant à atténuer l'effet cumulatif des expériences. L'application de critères d'arrêts spécifiques et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe dans un milieu enrichi permettent de garantir le bien-être des animaux.

19500 Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, les déficiences auditives toucheraient aujourd'hui 15 % de la population mondiale. L'impact sociétal est majeur, pouvant entraîner chez les malades, isolement social et dépression. Ce projet permet de mettre au point ou d'affiner des modèles animaux (chez le rat et la souris) d'acouphène et/ou d'hyperacousie afin d'étudier l'efficacité de candidats médicaments sur la prévention ou le traitement de certaines pathologies auditives.

Parmi elles, les acouphènes (sifflements, bourdonnements d'oreille) et l'hyperacousie (intolérance au bruit) sont deux indications pour lesquelles aucune solution thérapeutique satisfaisante n'existe à ce jour. Dans ce contexte ce projet consiste à générer chez le rongeur éveillé, en utilisant les mêmes causes que celles observées chez l'homme, des acouphènes et/ou une hyperacousie pour vérifier l'efficacité des principes actifs en développement.

Les acouphènes et/ou l'hyperacousie peuvent être générés via l'administration d'un médicament connu pour provoquer des acouphènes comme le salicylate de sodium ou via des traumatismes sonores. Les animaux étant éveillés, l'intensité et la durée du son sont choisies afin de ne créer ni douleur ni stress.

La vérification de l'efficacité de candidats médicaments sur l'apparition d'acouphènes et sur l'hyperacousie se fera par différents tests sur l'animal éveillé qui devront être développés au laboratoire : des tests de comportement (comme le modèle de réflexe de sursaut des animaux) ainsi que des mesures d'EEG (électro-encéphalogramme) ou des mesures d'électrophysiologie unicellulaire permettant de mesurer l'activité du cortex auditif.

Les traitements sont administrés en suivant les bonnes pratiques vétérinaires.

Le nombre d'animaux inclus dans ce projet est évalué au maximum à 1400 sur une période de 5 ans, dont 800 souris et 600 rats.

Le projet s'établit selon la règle des 3 R :

Remplacer : L'analyse de l'état de l'art de la Recherche préclinique dans l'audition montre que l'utilisation des modèles rongeurs est la seule alternative pour tester l'efficacité des principes actifs avant leur administration chez l'Homme. Une veille technologique continue permet de rester vigilant sur l'arrivée de nouvelles techniques qui viendraient se substituer à l'expérimentation animale. Les modèles vitro existant à ces jours ne permettent pas d'évaluer l'entièreté de la chaîne de l'audition (des cellules qui reçoivent le son jusqu'au cerveau qui traite l'information). Néanmoins nous cherchons à obtenir des informations partielles en amont des expérimentations grâce à certains modèles vitro (explant).

Réduire : Le choix des procédures expérimentales à mettre en œuvre dans le projet tient compte de l'état de l'art et des conseils de scientifiques, d'experts internationalement reconnus dans le domaine de l'audition. Le nombre d'animaux inclus dans ce projet correspond au nombre maximum d'animaux que nous considérons nécessaire pour étudier la distribution, la tolérance et l'efficacité d'un principe actif sur les acouphènes ou l'hyperacousie. Les expérimentations seront réalisées après une habituation des animaux aux expérimentateurs afin de permettre de réduire le stress et ainsi limiter la variabilité expérimentale et par conséquent de réduire le nombre d'animaux

nécessaire pour parvenir à l'objectif de ce projet. Par ailleurs la mise au point et le développement de ce modèle de trauma sonore chez l'animal vigile sera plus sensible au trauma sonore et nous permettra de réduire le nombre d'animaux requis en comparaison avec le même modèle réalisé chez l'animal anesthésié.

Raffiner : La priorité est donnée aux procédures non invasives mais lorsqu'elles sont invasives, elles sont réalisées sous anesthésie-avec une couverture analgésique adéquate. Des points limites ont été définis pour aider à la décision face à une situation « critique ». De plus des séances d'habituations aux expérimentateurs et aux installations sont prévus en amont de la réalisation des procédures ceci afin de réduire le stress des animaux lors de la réalisation des expérimentations.

19501 Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) se caractérisent par une inflammation de l'intestin grêle et du côlon qui conduit à des diarrhées et des douleurs abdominales. Ces pathologies touchent environ une dizaine de personnes pour 100 000 habitants et elles débutent généralement chez le jeune adulte. Ces maladies évoluent tout au long de la vie par des phases de poussées entrecoupées de phases de remissions engendrant un inconfort de vie. Les deux principales formes de MICI sont la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique. Les MICI sont des maladies dites complexes faisant intervenir des facteurs environnementaux et génétiques. D'une manière générale, la physiopathologie des MICI est décrite pour être le résultat d'une réponse anormale du système immunitaire stimulé par des modifications du microbiote. Bien qu'on ne connaisse pas à si ce sont les altérations du microbiote qui induisent celles du système immunitaire ou le contraire, un défaut de barrière de l'épithélium digestif (perméabilité accrue) est impliqué dans la genèse et l'entretien de ces interactions anormales aboutissant au processus inflammatoire. A l'heure d'aujourd'hui, les seuls traitements utilisés dans les MICI ciblent le système immunitaire afin de le mettre au repos. Ainsi, la connaissance des mécanismes régulant la perméabilité intestinale devrait permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dans le traitement des MICI.

Les modèles animaux sont essentiels pour déterminer les mécanismes physiopathologiques à l'origine des altérations de perméabilité intestinale impliquées dans la genèse et la sévérité de l'inflammation de la muqueuse digestive. En effet, nous ne pouvons pas utiliser de modèles cellulaires (dépourvus de cellules immunitaires et d'interactions entre cellules épithéliales et immunitaires) puisque nous déterminerons quel(s) sous-type(s) de cellules immunitaires re-circulent de la zone inflammatoire vers les zones non-inflammatoires pour altérer la perméabilité intestinale et propager l'inflammation.

A ce jour il existe de nombreux modèles décrits dans la littérature, tous induisent chez l'animal une augmentation de la perméabilité intestinale au niveau du site inflammatoire. Néanmoins, aucune donnée n'est disponible sur les mécanismes par lesquels l'inflammation altère la perméabilité intestinale à distance du site inflammatoire permettant ainsi la propagation des lésions inflammatoires.

L'objectif de ce projet est d'étudier, dans différents modèles animaux de MICI caractérisés par une inflammation du gros intestin, les mécanismes cellulaires et moléculaires par lesquels cette inflammation altère la perméabilité de l'intestin grêle pour favoriser le développement de lésions inflammatoires chez des animaux génétiquement prédisposés aux MICI. 4 modèles de MICI seront développés chez des souris sauvages ou présentant une susceptibilité génétique aux MICI : deux modèles aigus et un modèle chronique mimant la maladie de Crohn et un modèle aigu correspondant à un modèle de rectocolite hémorragique.

Afin de répondre à cet objectif le nombre d'animaux utilisés sera de 1440 souris, 720 souris sauvages et 720 souris ayant des prédispositions génétiques pour les MICI. Pour chaque lignée de souris, nous réaliserons les 4 modèles inflammatoires dans lesquels 12 groupes de 12 souris (minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs) nous permettront d'étudier l'implication de la recirculation des lymphocytes inflammatoires, d'un enzyme impliqué dans la régulation de la perméabilité, et du microbiote dans l'augmentation de la perméabilité à distance des lésions inflammatoires.

Dès l'induction de la pathologie, l'état de santé des souris sera suivi régulièrement au cours du temps (de 3 à 21 jours selon le modèle expérimental) en effectuant un suivi quotidien du poids, de la consistance des fèces et de la présence de sang dans les fèces. De plus, afin de suivre la directive européenne 2010/63/UE, un enrichissement sera rajouté aux souris, comme des carrés de coton permettant aux animaux de faire son nid. Durant toute la période d'expérimentation, l'état général des animaux sera observé tous les jours et dans le cas où l'animal présenterait des difficultés pour s'alimenter ou s'abreuver, l'accès à l'aliment et la boisson lui serait facilité en plaçant ces derniers directement dans la cage. Si l'état général de l'animal ne s'améliorait pas au cours de la journée et qu'aucune solution ne pouvait être apportée, ce dernier serait euthanasié. De même, si un animal avait une perte de poids supérieure à 20%, ce dernier serait euthanasié. Ainsi, ce projet sera réalisé selon les exigences de la règle des 3-R (remplacement, réduction et raffinement)

19502 L'hépatocarcinome (HCC) est un cancer primitif du foie, 8e dans le monde par ordre de fréquence et premier des cancers primitifs du foie. L'incidence annuelle mondiale est d'environ 500 000 nouveaux cas par an. Dans les pays développés, son incidence a particulièrement augmenté ces vingt dernières années en raison de l'augmentation de l'incidence de la cirrhose due au virus de l'hépatite B ou de l'hépatite C.

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

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

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

Les procédures expérimentales mises en oeuvre seront réalisées sous anesthésie et analgésie, gazeuse ou chimique. Les résultats acquis chez un même animal permettront de répondre à plusieurs questions scientifiques (pharmacocinétique, biodistribution, imagerie) afin de raffiner le nombre total d'animaux.

Le suivi longitudinal des animaux grâce aux méthodes d'imagerie mises en oeuvre (IRM, Echographie, fluoroscopie) participe à la réduction du nombre d'animaux nécessaires pour ce projet. De même, l'utilisation post mortem de ces animaux pour d'autres projets internes à l'entreprise ou le prélèvement d'organes ou de liquides biologiques pour le service de bioanalyse concourent également à la réduction. Le remplacement par d'autres techniques telles que la culture cellulaire n'est que peu réalisable car c'est la réaction de l'organisme entier qui permet de répondre aux questions scientifiques posées par ce projet (tolérance, efficacité, biodistribution. . .) toutefois, les propriétés mécaniques de nos produits sont testées au préalable sur des bancs d'essais vitro afin de ne tester que les produits potentiellement efficaces.

Selon la réglementation, nous assurons également un suivi quotidien des animaux permettant d'anticiper l'atteinte d'un point limite et nous avons mis en place un hébergement enrichi selon les normes de la réglementation.

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

19503 Il est maintenant bien établi qu'il existe une formation de nouveaux neurones tout au long de la vie dans l'hippocampe des mammifères (y compris l'Homme), et que ce phénomène appelé néo-neurogenèse joue un rôle dans la mémoire spatiale. L'hippocampe est une structure clé impliquée dans les processus mnésiques. Les études menées au sein du laboratoire ont montré qu'un apprentissage spatial dans un labyrinthe aquatique, chez le rat mâle, active spécifiquement les neurones formés à l'âge adulte. Cependant, nous ignorons si lorsque les animaux sont soumis à un rappel de la tâche, c'est cette même population de néo-neurones qui est activée ou s'il s'agit d'une population de neurones distincte. L'objectif de ce projet est donc de déterminer si les néo-neurones recrutés lors de l'apprentissage spatial dans un labyrinthe aquatique sont également activés et donc nécessaires lors du rappel de cette mémoire spatiale. Afin de tester cette hypothèse, nous proposons de marquer les néo-neurones à l'aide d'outils moléculaires afin de déterminer leur implication d'une part lors de la phase d'apprentissage d'une tâche spatiale et d'autre part lors d'un test de rappel de cet apprentissage. Il sera donc possible de visualiser si ce sont exactement les mêmes néo-neurones qui sont recrutés lors des deux tâches (apprentissage et rappel) ou si ce sont deux populations neuronales distinctes. Pour cela, des rats mâles de la souche Sprague-Dawley (n=40) seront utilisés. Ils seront soumis à une première procédure (injection sous-cutanée) permettant d'étiqueter les néo-neurones nés lorsqu'ils seront âgés de 2 mois. Une deuxième procédure (chirurgie stéréotaxique) sera nécessaire afin de marquer tous les neurones activés lors de l'apprentissage. Enfin, une semaine après ils seront soumis à une procédure comportementale non invasive consistant en un apprentissage spatial dans un labyrinthe aquatique. Tout sera mis en œuvre afin de réaliser ce projet tout en respectant la règle des 3R. En ce qui concerne le remplacement, il est important de noter que cette étude repose sur une approche intégrée nécessitant de mesurer les capacités cognitives de l'animal lors d'un apprentissage, un tel projet ne pourrait donc pas être réalisé *in vitro* ou *in silico*. Dans un souci de respect du R de réduire, nous avons calculé au plus juste le nombre d'animaux par groupe sur la base d'études préalablement menées au sein du laboratoire. Ce nombre minimal d'animaux est nécessaire à la réalisation d'analyses statistiques cohérentes (ANOVA à 2 facteurs). Enfin, pour limiter au maximum l'inconfort des animaux, nous avons développé des procédures de raffinement notamment par l'utilisation d'anesthésies générales et locales et par l'usage d'analgésiques pour pallier la douleur associée aux opérations chirurgicales ainsi que par la surveillance et l'observation quotidienne des animaux afin de s'assurer de leur bien-être. De plus, pour identifier les dommages et contraintes subis par l'animal, nous avons défini une grille de score du bien-être basée sur quatre critères. Ces critères sont : la variation du poids de l'animal, son apparence physique, les changements comportementaux non provoqués et la réponse à des stimuli environnementaux. En cas de mise en danger du bien être établie à partir de ces critères, des procédures d'intervention ont été mises en place et des points limites ont été définis en accord avec la vétérinaire responsable.

19504 Les allergies sont très répandues au sein de notre société et ont été classées comme la quatrième pathologie chronique en termes de morbidité par l'OMS. La prévalence des allergies est en constante augmentation, en particulier dans les pays développés. Elles constituent ainsi un vrai problème de santé publique. Coûteuses, les allergies altèrent aussi la qualité de vie des patients. Par ailleurs, l'allergie alimentaire, très courante peut évoluer vers des manifestations respiratoires plus graves à l'âge adulte, c'est ce qu'on appelle la marche atopique. Des lacunes existent sur les mécanismes de la progression de l'allergie et de son évolution lors de la marche atopique. La flore intestinale ou microbiote intestinal est une pièce maîtresse de l'immunité: sa composition influe sur la qualité et l'efficacité du système immunitaire. Des déséquilibres du microbiote intestinal (dysbioses) ont été mis en cause dans les dysfonctionnements associés aux allergies. Des différences dans la composition de la flore intestinale ont été observées chez des patients allergiques (dermatite atopique, allergie alimentaire, rhinite allergique). Ainsi il existerait bien une relation entre microbiote intestinal et allergie. L'objectif de ce projet est d'évaluer l'impact du microbiote intestinal sur l'évolution de l'atopie. En modulant ou en supprimant totalement la flore intestinale nous analyserons alors l'effet sur les différentes populations de cellules immunitaires et sur le développement de l'allergie. La recherche dans ce domaine implique l'utilisation de modèles animaux. Ainsi l'utilisation de souris est nécessaire pour étudier de façon optimale la réaction in

vivo. Au cours de cette étude, le principe des 3R sera appliqué de façon à réduire, remplacer ou perfectionner l'utilisation de l'expérimentation animale. Il est impossible de reproduire efficacement les systèmes biologiques très complexes et en particulier le système immunitaire uniquement par des études in vitro. Dans l'allergie, de nombreuses cellules immunitaires sont impliquées, telles que les lymphocytes ou les cellules épithéliales et leurs interactions ont un rôle fondamental dans le développement de la maladie. De plus, l'allergie est caractérisée par le déclenchement de symptômes, uniquement observables chez l'animal. Ainsi l'expérimentation animale est un élément clé de ce projet. Toutefois, chaque fois que possible, l'étude sur l'animal sera substituée par une étude in vitro et seul le personnel qualifié et expérimenté participera aux manipulations. Ainsi, afin d'éviter toute souffrance dues au modèle d'allergie ou au protocole délétion du microbiote, les souris seront systématiquement euthanasiées si leur état se dégrade ou si elles subissent une perte de poids de 10% par rapport à leur poids de départ. Enfin, le modèle de marche atopique est bien établi au sein du laboratoire ce qui permet de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Le nombre de souris sera au total de 640 souris pour la totalité du projet sur cinq ans. Les animaux seront logés dans un environnement adéquat, avec une humidité et une température contrôlée et bénéficieront d'un enrichissement. Des mesures seront prises afin d'améliorer les conditions expérimentales envers l'animal, notamment l'utilisation d'analgésiques pour diminuer la douleur avant l'injection de l'euthanasiant. Les procédures pouvant être douloureuses seront réalisées sous anesthésie à la Kétamine-Xylazine. L'isoflurane n'a pu être choisi du fait de son invasion des voies respiratoires pouvant provoquer une inflammation pulmonaire qui serait un biais dans notre étude. Pendant l'anesthésie, les souris sont placées dans une cage sans litière sur tapis chauffant afin de les protéger d'une hypothermie, la température sera suivie au cours de l'expérimentation. Le réveil est effectué dans une salle isolée, sur tapis chauffant. Le réflexe de retrait de la patte arrière sera testé pour évaluer l'intégralité de l'anesthésie physique de l'animal. Une goutte de crème ophtalmique sera appliquée pour protéger les yeux des souris pendant l'anesthésie.

19505 Les allergies sont très répandues au sein de notre société et ont été classées comme quatrième pathologie en termes de morbidité par l'OMS. La prévalence des allergies est en constante augmentation. Elles constituent ainsi un vrai problème de santé publique. Coûteuses, les allergies altèrent également la qualité de vie des patients. Les mécanismes en œuvre dans le développement des allergies et les causes spécifiques de l'augmentation de leur prévalence ne sont pas totalement connus. L'exposition aux composés chimiques dans l'environnement est une source de sensibilisation allergique et de sévérités des réactions. En effet, les composés chimiques incluant les pesticides sont considérés comme une véritable menace pour la santé affectant le système immunitaire humain et contribuant à l'augmentation des maladies allergiques. De plus, le concept du DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease) suggère que l'embryon, le fœtus et l'enfant (les 1000 premiers jours) sont sous l'influence constante de l'environnement au sein duquel ils se développent. Les polluants peuvent passer de la mère à l'enfant au cours de la période périnatale, créant une « empreinte développementale ».

En France, la prévalence des allergies est estimée à 25-30% chez les enfants et est plus élevée en raison de l'immaturité de leur système immunitaire, leur microbiote et leur barrière intestinale. Cette immaturité au cours de la période périnatale est une cible pour les composés toxiques. De plus, les allergies les plus communément trouvées chez l'enfant sont les allergies alimentaires (8%), l'eczéma (10%) et l'asthme (10%) et ces maladies coexistent souvent. Il est maintenant bien établi qu'une allergie alimentaire dans l'enfance augmente le risque de développer un asthme plus tard et la progression en séquence de cette maladie est appelée la marche atopique. L'objectif de ce projet est donc de déterminer si une exposition périnatale à un mélange de pesticides à faible dose (dose journalière tolérable) peut impacter la progression de la marche atopique. Ce travail nous permettra de déterminer l'effet sur le métabolisme d'un mélange de pesticides, composé de boscalid, captan, chlorpyrifos, thiofanate, thiacloprid et ziram. Nous voulons déterminer si un mélange de pesticides a un effet sur la sensibilisation et/ou la sévérité de l'allergie alimentaire et de l'asthme et ainsi déchiffrer les facteurs et les mécanismes à l'œuvre notamment au cours de la période périnatale. La recherche dans ce domaine implique l'utilisation de modèles animaux d'allergie alimentaire et respiratoire. Ainsi l'utilisation de souris est nécessaire pour étudier de façon

optimale la réaction in vivo. Pour mener à bien ce projet, nous utiliserons 810 souris reproductrices, dont 540 femelles reproductrices et 270 mâles reproducteurs divisés en trois groupes : une étude du suivi physiologique (180 femelles + 90 mâles = 80 souriceaux femelles et 80 souriceaux mâles), une étude du suivi immunologique (180 femelles + 90 mâles = 80 souriceaux femelles) et une étude du microbiote (180 femelles + 90 mâles = 80 souriceaux femelles). Nous espérons donc obtenir 320 souriceaux en tout. Au cours de cette étude, le principe des 3R sera appliqué afin de réduire (estimation d'un nombre minimum de souriceaux à analyser en fin de protocole pour être statistiquement robuste, notre expérience en reproduction animale nous permet de réduire au minimum nécessaire le nombre de couple reproducteur ; les organes non utilisés des souris contrôles pourront être utilisés pour la mise au point d'autres protocoles), remplacer ou perfectionner l'utilisation de l'expérimentation animale. Il est en effet impossible de reproduire efficacement les systèmes biologiques très complexes et en particulier le système immunitaire uniquement par des systèmes in vitro ou in silico. Dans l'allergie, de nombreuses cellules immunitaires sont impliquées, telles que les lymphocytes ou les cellules épithéliales et leurs interactions ont un rôle fondamental dans le développement de la maladie. Ainsi, l'expérimentation animale est un élément essentiel de ce projet afin de modéliser efficacement la réponse physiologique globale du système. Cependant, chaque fois que possible, les études sur les animaux seront réduites grâce à l'utilisation de modèles in vitro. Le modèle animal utilisé a été soigneusement conçu et évalué pour fournir des informations pertinentes pour une application future à l'homme. Ce modèle est bien établi et possède l'avantage de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés du fait de la connaissance et de la précision des paramètres étudiés. Enfin, seul le personnel qualifié et expérimenté participera à l'expérimentation animale. Ces exigences visent à s'assurer que les expériences seront effectuées efficacement et afin de minimiser la souffrance de l'animal. Le nombre d'animaux estimé dans ce protocole est suffisant pour justifier d'une pertinence scientifique et a été réduit au maximum. Les animaux seront logés dans un environnement adapté avec une humidité relative et une température contrôlée et bénéficieront d'enrichissements.

19506 Ce projet de recherche a pour but de développer des outils de thérapie génique pour améliorer les traitements de maladies rares.

La thérapie génique a été conçue comme une approche thérapeutique destinées aux maladies liées à la dysfonction d'un gène, délivrant aux cellules un gène "sain" capable de remplacer le gène "malade". Pour ce faire, nous avons besoin de deux éléments :

1) une capsid, qui est utilisée comme une « boîte », dans laquelle sera enfermé le gène sain. En fonction de la capsid utilisée, elle aura plus ou moins d'affinité en fonction d'un tissu spécifique. Nous allons, ici, comparer de nouvelles capsides que nous avons développé afin de déterminer si certaines d'entre elles se dirigent avec plus d'affinité dans un tissu particulier (ex : foie, muscles, cerveau, etc.). Ce travail permettra d'augmenter la spécificité du traitement optimisant le ciblage des tissus atteints par une pathologie particulière (exemple : cibler préférentiellement les muscles pour une maladie musculaire).

2) une séquence ADN, composée d'un promoteur et du gène sain. Ce promoteur va permettre au gène sain de s'exprimer plus ou moins fortement en fonction du tissu où il se trouve. Ici, nous allons comparer différents promoteurs que nous avons développé afin de déterminer si certains d'entre eux permettent d'exprimer plus fortement notre gène sain dans un tissu particulier.

Ce travail permettra d'augmenter la force du traitement en augmentant l'expression du gène sain dans les tissus atteints par une pathologie particulière (exemple : augmenter l'expression dans le foie pour une maladie hépatique).

Dans un premier temps nous allons comparer ces deux éléments (capsid et promoteur) séparément dans des souris saines. Par la suite, nous combinerons la capsid la plus efficace pour cibler les muscles par exemple, avec le promoteur permettant la meilleure expression dans les muscles également afin de créer un couple capsid/promoteur plus spécifique d'un tissu particulier afin d'augmenter l'efficacité du traitement.

Ces meilleurs couples seront injectés dans des souris modèles d'une maladie génétique : la maladie de Pompe. Cette maladie touche environ 1 personne sur 40 000 à la naissance et entraîne des problèmes musculaires, notamment cardiaques et respiratoires ainsi que des atteintes cérébrales. Cette pathologie est causée par un dysfonctionnement d'une protéine appelée GAA. Le seul traitement disponible actuellement est une injection bimensuelle de GAA. Ce traitement reste contraignant pour les patients et ne permet pas de soigner la maladie mais seulement d'en ralentir ses effets. Nous allons donc traiter ces souris avec une approche ayant déjà montré son efficacité mais en faisant varier le couple capsid/promoteur.

- Remplacement : Afin de limiter au maximum le nombre de souris utilisé, nous avons réalisé un premier tri parmi notre liste de capsid et de promoteur grâce à l'utilisation de culture cellulaire. Néanmoins, nous devons approfondir ces résultats en mesurant l'efficacité de ces traitements sur un organisme entier, pouvant réagir contre ce traitement (réponse immunitaire) et également mesurer l'efficacité de traitement d'une maladie.

- Réduction : Afin de d'utiliser le moins d'animaux possible, nous avons calculé le nombre minimal d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats suffisamment fiable (6 souris par groupe soit 1050 souris pour l'ensemble de nos 4 procédures). De plus, nous allons prioriser l'utilisation d'animaux sains (798 souris) lors de la sélection de nos meilleurs candidats. Les souris souffrant de la maladie de Pompe seront utilisées en dernier recours, afin de valider nos meilleurs candidats (252 souris).

- Raffinement : Nous allons tout mettre en œuvre pour le maximiser le bien-être des animaux (limitation du nombre de souris par cage, enrichissement des cages, limiter le stress lors de la manipulation des animaux, etc.). Chaque geste expérimental réalisé sur les animaux (injections et prise de sang) sera réalisé par du personnel formé, la mise en d'anesthésies et des mesures de récupération (surveillance accrue des souris, utilisation de plaque chauffante jusqu'au réveil, etc.) seront utilisé lors de des prises de sang.

Le développement de ces nouveaux outils permettra d'augmenter l'efficacité des traitements par thérapies géniques en augmentant la spécificité et l'efficacité du traitement. Ces outils sont testés ici pour le traitement de la maladie de Pompe, mais pourront être mit en application dans de nombreuses maladies. Cette optimisation permettra de limiter les doses injectées aux patients ce qui réduira les potentiels effets indésirables ainsi que le coût de production des traitements.

19507 La sclérodémie systémique (SSc) est une maladie invalidante à composante auto-immune et inflammatoire, marquée par une fibrose cutanée et viscérale sévère. Il s'agit d'une pathologie rare affectant préférentiellement les femmes (sex-ratio 4/1) d'âge compris entre 45 et 65 ans. Sa prévalence est estimée entre 50 et 300 cas par million d'habitants.

Différents phénotypes cliniques sont rencontrés ; la topographie de l'atteinte cutanée permet de classer les patients en forme cutanée limitée ou diffuse. Le pronostic vital est menacé lors de la survenue d'atteintes d'organes, liées à la fibrose (pneumopathie interstitielle fibrosante, atteinte digestive...), la vasculopathie (hypertension artérielle pulmonaire, crise rénale) ou les deux (cardiomyopathie). Sa physiopathologie associe une activation anarchique des fibroblastes, un dysfonctionnement endothélial et une altération des réponses immunitaires. Les traitements actuels reposent principalement sur l'immunosuppression avec une efficacité relative et des effets secondaires importants. Des alternatives thérapeutiques doivent être envisagées en cas d'échec, de contre-indications aux immunosuppresseurs voire en première ligne si un traitement possède une efficacité importante. Parmi ces alternatives, les thérapies aux effets anti fibrosants (agonistes PPAR gamma par exemple) combinées aux thérapeutiques anti inflammatoires, (immunoglobulines polyvalentes, ou ciblant les les cytokines telles que l'IL-6) offrent des perspectives aujourd'hui les plus intéressantes.

Nous souhaitons évaluer les effets potentiels de différentes thérapies antifibrosantes et anti inflammatoires ainsi que leurs mécanismes d'action dans 2 modèles murins complémentaires de fibrose qui récapitulent les atteintes de la SSc humaine : le modèle induit par injection de HOCl qui associe une atteinte inflammatoire puis fibrosante diffuse, cutanée et pulmonaire, et le modèle induit par l'injection de bléomycine qui reste celui le plus décrit dans la littérature et qui est caractérisé par

une atteinte cutanée fibrosante plus isolée. Nous évaluerons dans ces deux modèles l'effet préventif et curatif des thérapies sur des critères cliniques et histologiques. Nous souhaitons évaluer plus précisément, dans le modèle HOCl (plus proche de la pathologie humaine au plan immunologique), les effets des thérapies sur les marqueurs de fibrose ainsi que sur le système immunitaire afin d'apprécier leurs mécanismes d'action à la fois sur les processus fibrosants et inflammatoires/immunologiques.

Pour répondre aux questions posées dans les 5 années qui suivent, nous projetons d'utiliser des souris BALB/c (modèle « HOCl ») et des souris C57/BL6 (modèle « bléomycine ») pour ce projet.

Ces évaluations précliniques n'interviennent qu'après avoir spécifiquement évalué et sélectionné in vitro de nouveaux « médicaments candidats », testé leurs propriétés anti-inflammatoires, leurs effets antifibrosants afin de limiter au mieux le nombre d'animaux (Réduire). Il n'est pas possible de reproduire in vitro la physiologie intégrée et complexe du dialogue entre le système immunitaire, les cellules endothéliales, les fibroblastes du tissu conjonctif de mammifères (Remplacer) et ceci nécessite donc le recours à des modèles in vivo de maladies fibrosantes induites par des agents toxiques ou chimiques largement décrits et reconnus par la communauté scientifique. Les procédures sont définies au mieux pour offrir le maximum de confiance dans les résultats générés dans le respect du bien-être des animaux en limitant la souffrance animale (Raffiner).

Le nombre total d'animaux envisagé sur les 5 ans à venir est estimé au maximum 7700 répartis comme suit en 2 procédures qui doivent être considérées comme indépendantes les unes des autres.

19508 Depuis 2007, de nombreuses études précliniques ainsi que des études pilotes réalisées sur des patients hospitalisés ont montré les propriétés thérapeutiques intéressantes de l'hydrogène gazeux : protection cellulaire et puissants effets anti-inflammatoires. Tout récemment, l'hydrogénéothérapie par inhalation a été appliquée avec succès sur des patients contaminés par le Sars Cov-2 en Chine et a conduit les autorités sanitaires chinoises à inclure ce traitement dans les recommandations de la prise en charge de la CoViD-19. En France, une étude clinique de phase 1 est actuellement en cours pour vérifier si, chez des patients hospitalisés pour une CoViD-19 modérée, un traitement à l'hydrogène, administré par inhalation en complément de l'oxygénothérapie, peut être appliqué en toute sécurité dans le but de limiter les lésions pulmonaires et prévenir l'aggravation de la maladie. Par ailleurs, le potentiel thérapeutique de l'hydrogène pourrait s'étendre à de nombreuses pathologies inflammatoires comme le choc septique, des maladies cardiaques, les maladies neurodégénératives, des maladies métaboliques.

Actuellement l'hydrogène n'a pas de statut de médicament auprès des différentes agences réglementaires européennes, son utilisation ne peut donc pas être généralisée dans un contexte clinique sans qu'une démonstration préalable de son innocuité soit établie selon des standards réglementaires. A ce jour, si des études de toxicité conformes aux standards européens n'ont montré aucun effet indésirable de l'hydrogène, il n'existe, dans la littérature, aucun élément concernant la génotoxicité in vivo de ce composé. Aussi, dans le cadre de cette étude, nous envisageons d'étudier l'impact d'un traitement chronique à l'hydrogène administré par inhalation sur la génotoxicité in vivo chez le rat afin de compléter les démarches réglementaires et permettre l'utilisation de ce composé dans le cadre d'études multicentriques de phase 2.

Pour cela, des rats mâles adultes seront placés dans une enceinte recevant une atmosphère enrichie en hydrogène pendant 72 heures. Les animaux seront ensuite mis à mort pour récupérer des organes afin de réaliser les tests de génotoxicité. Le nombre d'animaux, 24, est réduit à son strict minimum. Un point limite a été défini et les animaux seraient sortis de l'étude si ce point limite était atteint. Cette étude requiert l'utilisation d'animaux vivants, conformément aux lignes directrices réglementaires qui sont requises pour les tests de génotoxicité en Europe. Enfin, des mesures de raffinement spécifiques seront mises en place pour améliorer le confort d'hébergement comme l'enrichissement du milieu (cylindres cartonnés).

19509 L'insuffisance rénale aiguë (ira) est un problème majeur de santé publique. L'ischémie et le sepsis sont les causes dominantes. Quelle que soit la cause, l'ira se caractérise par des lésions de nécrose tubulaire aiguë (nta) qui intéressent principalement les tubules proximaux. Les études récentes ont montré que l'ira est associée à un risque élevé de développement d'une insuffisance rénale chronique (irc).

L'inflammation est récemment apparue comme un processus causal déterminant des lésions rénales. Au cours d'une ira, les cellules épithéliales tubulaires proximales libèrent des molécules, qui sont des ligands endogènes pour des récepteurs de l'inflammation nommés toll like receptor (tlr) activant les cellules dendritiques et macrophagiques, qui à leur tour libèrent des cytokines inflammatoires, contribuant à la lyse cellulaire. Ce processus d'auto-amplification des lésions épithéliales médiées par l'inflammation est dénommé « nécro inflammation ».

La mucine muc1 est exprimée par les tubules distaux et collecteurs du rein à l'état normal. Il a été récemment montré que muc1 protégeait le rein de lésions aiguës dans un modèle murin d'ischémie-reperfusion (ir) rénale. Nous avons observé que muc1 était induite par les tubules proximaux lésés au cours de l'ira. Dans un modèle murin d'ir, nous avons observé que muc1 exerçait des effets opposés: d'abord, protecteur lors des phases précoces; puis, pro-fibrosant lors des phases tardives d'agression rénale.

Nous avons émis les hypothèses que muc1 pourrait moduler l'inflammation rénale au cours de l'insuffisance rénale: en phase aiguë, muc1 serait fixée à la membrane cellulaire et bloquerait les tlr, limitant les lésions de nécro inflammation; alors qu'en phase chronique, muc1 serait clivée et transloquée au cytoplasme et au noyau des cellules pour activer l'inflammation conduisant à la fibrose rénale.

Pour tester nos hypothèses, nous avons établi un projet global basé sur des méthodes d'étude in vitro (lignées cellulaires rénales), ex vivo (tissus humains) et in vivo (modèles murins d'ira). Nos études in vitro et ex vivo nous permettront de déterminer si une interaction entre muc1 et tlr4, le principal tlr impliqué dans l'ira, existe. Les lignées épithéliales rénales transfectées de façon stable par tlr4 seront traitées par le lipopolysaccharide (lps), ligand exogène de tlr4. Afin de nous rapprocher au mieux des conditions pathologiques, nous développerons des modèles murins d'ira par injection intra-péritonéale de toxiques (lps ou cisplatine) et poursuivrons les modèles d'ir déjà développés. Les protocoles seront réalisés sur des souris c57bl/6 ko muc1 et wt, selon la distribution suivante: 20 souris pour étude pilote (afin de définir la nécessité ou non de répéter l'injection de lps), 84 souris pour le protocole lps; 28 souris pour le protocole cisplatine et 112 souris pour le protocole ir + inhibiteur pharmacologique de l'inflammation. Notre choix se porte sur un inhibiteur de la voie tlr4, tak-242, dont la biodisponibilité a été rapportée dans la littérature. Par ailleurs, nous disposons des outils moléculaires pour mener à bien nos expérimentations à partir des prélèvements tissulaires et sanguins que nous obtiendrons. AFIN DE REDUIRE LA DOULEUR DES ANIMAUX LIEE A LA CHIRURGIE ET A L'IRA, LES ANIMAUX SERONT OPERES SOUS ANESTHESIE GAZEUSE A LAQUELLE SERA AJOUTEE UNE ANALGESIE PAR BUPRENORPHINE (1H AVANT L'INTERVENTION CHIRURGICALE, 0,1MG/KG SOIT 3µG EN INTRAPERITONEAL). LES ANIMAUX AURONT LIBRE ACCES A L'EAU ET A LA NOURRITURE. APRES LA REALISATION DES MODELES D'IRA, LES ANIMAUX SERONT EXAMINES 1 FOIS PAR JOUR AFIN DE RECHERCHER LA PRESENCE D'EVENTUELS signes de douleur, de souffrance ou d'angoisse liés aux traitements selon une grille de 3 paramètres (le comportement; le poids et l'alimentation; l'apparence des animaux) grades de 0 à 3. Les points limites sont définis comme le stade 3 de chaque paramètre observé, c'est-à-dire comportement (automutilation, ne bouge pas: état pré-comateux); poids, alimentation (perte de poids de plus de 20%); apparence (pelage très terne, anus souillé, postures anormales, regard terne). Les animaux seront mis à mort lorsque l'évaluation de la douleur atteint une somme de paramètres égale à 6 et persiste pendant plus de 12 heures ou que l'un des points limites (c'est-à-dire un stade 3 d'un des paramètres) est atteint.

19510 Le mot « cancer » est un terme générique désignant un grand groupe de maladies pouvant toucher n'importe quelle partie de l'organisme. On parle aussi de tumeurs malignes ou de néoplasmes. L'une des caractéristiques du cancer est la multiplication rapide de cellules anormales à la croissance inhabituelle, qui peuvent envahir des parties voisines de l'organisme, puis migrer vers

d'autres organes. Les métastases entraînent des complications fréquemment létales pour les patients.

Les traitements varient selon le type de cancer, sa taille et sa localisation. Les tumeurs malignes sont habituellement traitées à l'aide de thérapies combinées comme la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. Préalablement aux traitements, les tumeurs sont localisées par imagerie (IRM, imagerie isotopique, scanner, angiographie...).

L'imagerie isotopique consiste à injecter une molécule radiomarquée (radiotracteur) au patient, qui va se fixer spécifiquement dans différentes régions de l'organisme. Le patient est ensuite placé sous une caméra capable de détecter la radioactivité. Cela donne une image 3D de la localisation du radiotracteur dans l'organisme. En fonction du radiotracteur utilisé, différentes régions peuvent être ciblées, comme par exemple : des cellules tumorales, des zones de nécroses ou encore des zones d'inflammation.

Il existe 2 types de caméras pour détecter les radiotraceurs : la TEP (Tomographie par Emission de Positons) et la TEMP (Tomographie par Emission Monophotonique) encore appelée SPECT ou scintigraphie. L'imagerie isotopique est généralement associée à un scanner (CT) permettant d'avoir une image anatomique.

La TEP et la SPECT sont les modalités d'imagerie corps entier les plus sensibles à ce jour et donc les plus appropriées quand il s'agit de détecter et localiser un phénomène moléculaire ou métabolique dont elles permettent une quantification absolue.

Dans ce projet d'une durée de 5 ans, nous poursuivons 2 objectifs scientifiques et technologiques principaux : 1) le développement de nouveaux candidats pour l'imagerie isotopique (radiotracteur) afin d'améliorer la détection et le suivi des tumeurs, 2) amener des candidats-médicaments aux phases précliniques de validation.

L'étude se fera sur des souris immunodéficientes, dans lequel on plantera, par injection sous cutanée, des cellules tumorales humaines. Le développement des tumeurs et l'efficacité des traitements seront suivis par imagerie isotopique et par échographie. A la fin du protocole les animaux seront mis à mort afin de récupérer les différents organes et la tumeur pour faire des analyses moléculaires et des imageries ex vivo.

La règle des 3R sera respectée dans ce projet :

REMPLACEMENT : il n'existe à l'heure actuelle aucun modèle de substitution in vitro ou in silico pour étudier l'impact d'un nouveau médicament ou un nouveau radiotracteur sur le développement de tumeurs. La souris immunodéficiente est un modèle de choix puisqu'elle permet le développement et le suivi de lignées tumorales humaines. L'induction des modèles de tumeur ectopique chez la souris sont des techniques maîtrisées et documentées. L'efficacité des nouveaux candidats médicaments aura été validée in vitro avant d'être testée sur les modèles de souris.

REDUCTION : Sur l'ensemble de ce projet, nous utiliserons 2420 souris immunodéficientes âgées d'au moins 6 semaines (jeune adulte). L'imagerie TEP, SPECT et l'échographie sont des imageries non invasives qui permettent de suivre un même animal de manière longitudinale et contribuant ainsi à hautement réduire le nombre d'animaux.

RAFFINEMENT : Au cours de l'étude, les souris seront hébergées par 5 dans des cages enrichies de dômes et copeaux, sur portoir ventilé, dans une pièce avec des cycles de lumière-obscurité de 12h, dont la température et l'hygrométrie sont contrôlées en permanence et avec un accès libre à la nourriture et à l'eau. Le bien-être des animaux sera surveillé quotidiennement par du personnel qualifié ce qui nous permettra d'intervenir rapidement dès le moindre signe de souffrance pour la prendre en charge. Pour limiter au maximum la souffrance et le stress des animaux, l'induction des modèles tumoraux se fera sous anesthésie générale selon des protocoles internes validés et une surveillance accrue des animaux se fera jusqu'à leur réveil. Des antalgiques seront administrés en cas de signes de douleurs. Toutes les imageries se feront également sous anesthésie ; nous privilégierons dans ce cas une anesthésie gazeuse qui permet un endormissement et un réveil rapide. Afin d'éviter la souffrance, tout signe et comportement anormal : difficultés à respirer, souris

prostrée ou en retrait, ou une perte de poids supérieure à 20% du poids initial des animaux ; entraineront la fin de l'expérimentation, et leur mise à mort sans délai.

19511 La Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie génétique qui touche le muscle chez l'enfant, provoquant une faiblesse musculaire généralisée et évolutive. Les patients sont contraints à l'usage du fauteuil roulant vers l'âge de 10 ans, et décèdent d'insuffisance respiratoire ou cardiaque vers l'âge de 30 ans. Il n'existe pas, à ce jour, de solution thérapeutique curative sur le marché pour la DMD. Les modèles *in vitro* ne permettent de valider que les premières étapes de l'élaboration de nouveaux médicaments et il faut ensuite envisager un passage sur les modèles animaux. De plus le modèle souris couramment employé (souris mdx) n'est pas satisfaisant car il ne reproduit pas fidèlement l'ensemble de la symptomatologie de la maladie humaine contrairement au chien GRMD (Golden Retriever Muscular Dystrophy), qui reproduit de manière fidèle les manifestations cliniques et fonctionnelles rencontrées chez les patients mais qui nécessite des infrastructures particulières coûteuses et un suivi vétérinaire lourd contraignant.

Pour pallier au manque de modèle fidèle à la maladie et de taille moyenne, nous avons développé un modèle de rat myopathe qui mime fidèlement la symptomatologie des patients DMD et représente donc un modèle de taille raisonnable à développement rapide permettant la validation préclinique de potentiels traitements.

La présente étude a pour objectif de décrire de manière quantifiée et exhaustive l'effet de trois nouvelles stratégies : deux thérapies géniques permettant soit de forcer l'expression et soit d'induire l'activation d'un récepteur hormonal cible dans les muscles squelettiques, et une thérapie pharmacologique avec un agent moléculaire déjà utilisée comme médicament dans d'autres pathologies et qui permet d'activer la voie de signalisation du récepteur d'intérêt.

Le récepteur hormonal en question a été identifié comme cible thérapeutique potentiel pour la DMD grâce à nos évaluations *in vitro* sur les cellules souches musculaires isolées à partir des muscles de notre modèle de rats DMD. Nos résultats *in vitro* montrent que ce récepteur est essentiel pour la fonctionnalité des cellules souches musculaires et donc potentiellement pour leur activité de régénération tissulaire ce que nous souhaitons vérifier. En effet, avec la progression de la pathologie, les muscles DMD perdent leur capacité régénérative à cause d'une sénescence précoce des cellules satellites. Le récepteur cible et sa voie de signalisation joue un rôle clé pour protéger les cellules souches musculaires de l'entrée en sénescence et le maintien d'une capacité proliférative et de différenciation majeure, essentielle pour une régénération efficace.

Les constructions pour les deux stratégies géniques seront portées par de vecteurs viraux et seront administrées par une injection intraveineuse unique chez les rats DMD soit précocement (4 semaines) lorsque les sujets sont encore asymptomatiques soit plus tardivement lorsque la maladie est déjà établie (3 mois) pour voir s'il est possible de limiter son développement voir de la stopper. Le même planning de traitement sera appliqué pour la thérapie pharmacologique avec un traitement précoce et un tardif avec une administration par voie intrapéritonéale du médicament, deux fois par semaine jusqu'à la mise à mort des animaux.

Cette étude utilisera un total de 240 rats, qui seront traités de l'âge de 4 semaines et suivis jusqu'à l'âge de 4, 7 et 12 mois ou traités de l'âge de 3 mois jusqu'à l'âge de 9 mois. Les rats traités seront comparés à des rats DMD et des rats sains, traités avec un vecteur viral contrôle pour les stratégies géniques ou une solution contrôle pour le traitement pharmacologique, suivis de la même manière et sur la même période de temps. Ce nombre d'animaux a été réduit au minimum en tenant compte de la variabilité observée dans une population de rats DMD tout en ayant suffisamment de matériel pour réaliser toutes les analyses biologiques nécessaires à l'évaluation de la maladie. Pour limiter le stress, les rats seront évalués à l'aide de différentes mesures non invasives dérivées de méthodes utilisées chez les patients et adaptées aux rats avec des friandises en récompense. Les rats seront habitués aux manipulations dès leur plus jeune âge et seront hébergés par 2-3 individus selon l'âge dans des cages contenant des enrichissements correspondant à leur espèce. Des friandises seront proposées pour les encourager à effectuer les tests fonctionnels. Les rats seront observés quotidiennement afin de suivre au plus près les éventuelles complications liées à leur maladie. Des points limites précis et suffisamment précoces pour leur éviter toute souffrance inutile et prolongée

ont par ailleurs été définis. Un effet bénéfique est attendu sur l'ensemble des paramètres évalués et cette étude permettra de déterminer précisément le niveau de cet effet.

19512 Dans son rapport présenté en Février 2017, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) lance l'alerte sur le nombre insuffisant de nouveaux antibiotiques en développement et la menace croissante de la résistance aux antimicrobiens. Elle publie également sa première liste « d'agents pathogènes prioritaires », hautement résistants aux antibiotiques, énumérant les familles de bactéries les plus menaçantes pour la santé humaine. En tête de liste de la catégorie « critique » se trouvent les bactéries du genre *Acinetobacter* spp, et en particulier l'espèce *Acinetobacter baumannii*. C'est un pathogène fréquemment associé aux infections nosocomiales (acquises en milieu hospitalier), telles que les pneumonies sévères acquises sous ventilation chez les patients de réanimation ou immunodéprimés. *Acinetobacter baumannii* est le plus souvent résistant à un grand nombre d'antibiotiques, y compris les carbapénèmes, qui constituent l'une des dernières lignes de traitement actuellement disponible (51% de résistance aux carbapénèmes en 2010 et jusqu'à 80% de résistance dans certains pays européens). De ce fait, les infections à *Acinetobacter baumannii* sont associées à une mortalité hautement significative de 40%.

Par ailleurs, l'OMS met en avant la nécessité de mieux évaluer les antibiotiques dans des modèles précliniques pertinents.

La rifampicine, un antibiotique connu depuis plus de 50 ans, semble présenter un intérêt thérapeutique dans le traitement des infections pulmonaires à *Acinetobacter baumannii*.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'efficacité de la rifampicine, seule ou associée à un autre antibiotique (un carbapénème), dans un modèle de pneumonie à *Acinetobacter baumannii* résistant aux carbapénèmes (CRAB) chez le lapin immunodéprimé. Pour cela, l'étude sera divisée en 2 phases :

- Phase 1 : étude de la pharmacocinétique de la rifampicine administrée par voie intraveineuse sur des animaux sains. Cette étude nous permettra d'obtenir des données concrètes sur la concentration sanguine de cet antibiotique au cours du temps.

- Phase 2 : étude de l'efficacité de la rifampicine administrée seule ou en association avec un autre antibiotique (carbapénème) dans un modèle d'infection pulmonaire à *Acinetobacter baumannii*.

Dans le cadre de cette étude, une attention particulière a été apportée au respect de la règle des 3R :

Remplacer : Des analyses in vitro ont déjà été réalisées sur l'efficacité de la rifampicine sur certaines souches d'*Acinetobacter baumannii*. Toutefois réussir à retranscrire la complexité d'une infection bactérienne pulmonaire ainsi que sa diffusion tissulaire et systémique n'est aujourd'hui possible qu'à travers les modèles in vivo.

Réduire : Seuls 4 animaux (2 par dose de rifampicine) seront utilisés pour la phase 1 car cette phase nécessitera pas de comparaison statistique. Ensuite, 6 animaux par groupes seront nécessaires pour réaliser une comparaison statistique solide entre les 5 différents groupes de traitement. Au total pour cette étude, 34 lapins New Zealand seront nécessaire.

Raffiner : Les animaux seront hébergés dans un environnement adapté, enrichi et seront surveillés au moins 2 fois par jour. Des critères d'arrêts de l'étude, supportés par une grille de score clinique, ont été définis afin d'assurer le bien-être des animaux.

19513 Les maladies métaboliques du foie (stéatose hépatique non alcoolique, ou NAFLD pour non-alcoholic fatty liver disease) sont en expansion dans les pays industrialisés, parallèlement à la prévalence croissante de l'obésité. Le premier stade de la maladie correspond à une accumulation de graisses dans le foie et est bénin mais peut évoluer chez certains patients vers une forme inflammatoire, puis vers une cirrhose, à l'origine d'autres complications telles que l'hépatocarcinome. Les mécanismes de progression de ces pathologies sont encore mal compris et aucun traitement médicamenteux efficace n'est disponible à ce jour.

Dans ce contexte, les hormones secrétées par le foie font l'objet d'attention depuis une quinzaine d'années. La plus prometteuse est FGF21 (Fibroblast growth factor 21) qui exerce des actions bénéfiques multiples sur la santé, en particulier sur le métabolisme énergétique. FGF21 est une protéine sécrétée dans la circulation sanguine qui est principalement produite par les cellules du foie et qui exerce ses différentes actions localement ou à distance sur d'autres tissus tels que le tissu adipeux blanc, le tissu adipeux brun et le cerveau. Ainsi, FGF21 améliore la glycémie et la sensibilité à l'insuline, prévient la prise de poids et augmente la production de chaleur. En cas de stéatose hépatique, sa sécrétion est altérée ce qui participe au développement de la résistance à l'insuline. Des analogues de FGF21 font actuellement l'objet d'essais cliniques pour le traitement des maladies métaboliques.

Dans ce projet, nous souhaitons approfondir les connaissances sur l'implication de FGF21 spécifiquement du foie dans le métabolisme énergétique. Pour cela, nous générerons des souris dont le gène FGF21 est invalidé par ingénierie génétique au niveau hépatique spécifiquement. Ces souris, en comparaison d'animaux contrôles de type sauvage, seront soumises à diverses conditions afin d'étudier le rôle de FGF21 du foie : lors du jeûne, lors d'un afflux d'acides gras provenant du tissu graisseux et lors d'un régime riche en graisses et pauvre en sucres (régime cétogène).

Ces expérimentations permettront de connaître l'importance de FGF21 spécifiquement du foie dans la réponse métabolique de l'organisme à ces différentes conditions, notamment en terme de modification de la sensibilité à l'insuline et de production de chaleur.

Nous mettrons en évidence ces perturbations en réalisant des bilans sanguins. Des analyses de pointe (transcriptomiques, lipidomiques, biochimiques et métabolomiques) seront réalisées sur des prélèvements post-mortem de différents tissus (foie, tissus adipeux brun et blanc).

Nous utiliserons uniquement des souris adultes. Nous prévoyons d'utiliser, à raison de 8 à 12 animaux par groupe selon les expériences et au vu du nombre d'études à mener, 384 animaux sur 3 ans. Basé sur les données de la littérature et des expériences antérieures du laboratoire, ce nombre d'animaux est le nombre minimum nécessaire mais suffisant afin d'obtenir des résultats exploitables.

L'utilisation de l'animal entier est indispensable car les processus biologiques étudiés dans ce projet (régulation de voies métaboliques) font intervenir différents tissus de l'organisme qui dialoguent entre eux (foie, tissus adipeux). De plus, la souris est un modèle de choix car adapté aux mécanismes que nous étudions et qui nous permet d'invalider une protéine d'intérêt dans un organe en particulier. Ainsi nous ne pouvons pas utiliser de méthodes de remplacement comme alternative pour cette étude. Nous veillerons au bien-être des animaux tout au long des expérimentations en leur assurant les meilleures conditions d'hébergement (hébergement collectif), dans un environnement contrôlé, une surveillance par le personnel soignant et des enrichissements du milieu de vie (cabanes en inox et ouate dans les cages). Pour un meilleur raffinement, les animaux seront habitués à l'expérimentateur et les gestes techniques seront réalisés par une personne formée et expérimentée. Nous surveillerons également attentivement le poids et le comportement des animaux, et nous mesurerons leur consommation alimentaire et hydrique afin de vérifier la bonne tolérance des différentes expérimentations. Si un animal présente un signe quelconque de souffrance, nous prendrons les dispositions réglementaires nécessaires pour la soulager et l'animal sera aussitôt retiré de l'étude.

Cette étude permettra de définir le rôle spécifique de FGF21 hépatique dans l'adaptation au jeûne et à un régime cétogène ainsi que dans le dialogue entre différents organes (foie, tissus adipeux).

19514 La dialyse est un traitement de purification du sang couramment utilisé par plus de 35 000 personnes en France. Cette méthode de soins consiste en l'épuration extra-corporelle du sang, chez un patient vigile. Elle est sans douleur pour le patient humain ou animal. Les séances sont répétées régulièrement chez les patients atteints d'insuffisance rénale chronique. Afin d'améliorer l'efficacité des séances de dialyse, il est nécessaire de faire progresser le matériel utilisé et les modalités de réalisation des séances. Les appareillages sont complexes et un grand nombre de

paramètres entrent en ligne de compte. Il est possible de gérer la plupart de ces éléments par des mesures physiques classiques. En revanche, l'inocuité d'un nouveau dispositif complet de dialyse, en particulier si on utilise de nouvelles membranes filtrantes, nécessite de faire des essais sur animaux, avant de pouvoir les utiliser chez des malades humains. Ainsi, il est indispensable de tester les nouveaux matériaux et nouvelles stratégies de dialyse dans des modèles qui se rapprochent le plus possible de l'homme. Les moutons, qui représentent une masse corporelle et un volume sanguin identiques à ceux de l'homme les meilleurs modèles pour mettre au point, valider et contrôler les dispositifs de dialyse. Sur les cinq prochaines années, notre plate-forme de dialyse devrait utiliser 60 moutons au maximum. C'est le nombre estimé le plus élevé de moutons qui nous sera nécessaire si la demande de test et mise au point de membranes de dialyses est importante. Les moutons sont acquis par le laboratoire longtemps à l'avance et maintenus à l'extérieur dans un pré, comme tout mouton de ferme. Ils sont également maintenus au pré entre deux séances de dialyse, en troupeau équilibrés. Avant les dialyses, les moutons sont habitués pendant plusieurs jours à la salle dans laquelle elle se déroule. Le mouton dialysé est debout, libre de ses mouvements. Il est toujours accompagné d'un congénère pour limiter le stress qui serait provoqué par un éventuel isolement. Ils sont soignés par du personnel formé et surveillés pour les éventuelles conséquences de dialyses, à long terme par une équipe de vétérinaire qualifiés. L'expérience est longue, elle peut durer jusqu'à 3 heures d'affilée, mais elle n'est pas douloureuse. Les animaux ont à boire et à manger à volonté pendant toute la séance et en général, n'éprouvent pas de stress majeur, du fait de la présence de compagnons.

19515 La formation de la coquille d'oeuf chez la poule pondeuse est un processus journalier qui nécessite une exportation massive de calcium. Ce processus physiologique de minéralisation de la coquille se produit la nuit au moment où la poule ne s'alimente pas. Le calcium apporté par l'alimentation ne peut donc répondre à lui seul à ce besoin de la poule qui mobilise ainsi ses réserves osseuses. Des stratégies alimentaires peuvent permettre de limiter cette mobilisation à partir du squelette telles que l'apport de calcium particulaire et l'apport de phytase microbienne. L'objectif de l'étude est d'évaluer pour proposer des stratégies alimentaires adaptées permettant d'améliorer l'utilisation digestive des minéraux, calcium et phosphore. Ces connaissances ont pour finalité d'apporter des solutions utilisables sur le terrain pour prévenir les problèmes de déminéralisation osseuse chez la poule pondeuse tout en maîtrisant les apports de phosphore (ressource non-renouvelable) et les rejets de l'élément dans l'environnement.

Au total, 100 poules de 16 semaines d'âge seront élevées en cages collectives jusqu'à 28 semaines. Puis, 88 poules seront placées en cages individuelles pendant 6 semaines. Le protocole respecte le principe des 3R :

Réduction : le nombre d'animaux a été réduit à son minimum en tenant compte de la puissance permettant de montrer une différence significative entre traitements et pertinente d'un point de vue biologique sur le critère de la digestibilité de calcium et de phosphore.

Remplacement : Le modèle animal ne peut être actuellement substitué par un modèle d'étude in vitro ou in silico. La complexité des mécanismes biologiques mis en jeu nécessite d'être approfondie pour adapter les stratégies alimentaires et permettre à plus long terme la construction d'un modèle mathématique de simulation.

Raffinement : pour limiter au maximum l'angoisse et la souffrance des animaux, les poules seront élevées en groupe en cages collectives qui sont équipées de perchoirs, nids individuels, et enrichissements non comestibles avant la procédure expérimentale (cages individuelles) dont la durée n'excédera pas 6 semaines. Il s'agit de cages individuelles également équipées d'un enrichissement non comestible mécanique (rondelles mobiles, perchoirs). Les poules peuvent se voir d'une cage à l'autre, cela permet une interaction visuelle entre les animaux. Les animaux seront visités au moins une fois par jour.

19516 La thérapie génique a progressé ces dernières années et des protocoles cliniques sont actuellement testés chez l'homme. Néanmoins, plusieurs obstacles doivent être surmontés avant que ce type de thérapie soit couramment utilisée. Une limitation majeure à l'utilisation de la thérapie génique est la

nécessité de moduler l'expression d'un transgène en terme de durée et de niveau d'expression. Nos connaissances dans le domaine de la nutrition protéique nous ont permis de concevoir un système d'expression génique inductible par une manipulation nutritionnelle.

Ce système breveté est basé sur l'association (i) d'un promoteur artificiel fortement inductible par une carence en un AAI qui est encapsulé dans un vecteur viral AAV avec (ii) une nourriture carencée en un Acide Aminé Indispensable (AAI) qui entraîne une forte baisse de la concentration sanguine de AAI limitant et permet l'induction du transgène via une voie de signalisation appelée GCN2/ATF4.

Ce système présente de nombreux avantages : (i) il permet de contrôler précisément l'induction d'un « gène médicament » en terme de durée et d'intensité et (ii) il ne présente aucune toxicité. Si le traitement doit être renouvelé, il sera possible d'alterner la carence en différents Acide Aminé Indispensable (AAI). Sur ce point, notre système présente un avantage unique par rapport aux autres systèmes inductibles qui ne sont pas utilisables en médecine humaine. Ce système est un outil fonctionnel dans plusieurs tissus et utilisable en thérapie génique pour exprimer n'importe quel « gène médicament » de façon localisée et régulée. Cette modulation spatio-temporelle ouvre de nouvelles perspectives à la thérapie génique pour le traitement d'un grand nombre de pathologies (cancer, maladies neurodégénératives, maladies rares, ophtalmologie, thérapie cellulaire...).

Nous souhaitons apporter une preuve de concept de la fonctionnalité de ce système dans un modèle animal de pathologie de façon à pouvoir rapidement transférer cette technologie à l'homme. Nous avons choisi un modèle murin de métastases hépatiques du cancer colorectal (MHCC) que l'on traitera par l'expression contrôlée d'un gène apoptotique. Le modèle animal de cancer MHCC permet d'étudier l'effet tumoricide du système NUTRIREG dans une situation réelle et globale, proche de ce qui est envisagé en clinique humaine.

Ce projet, qui va impliquer 270 souris, sera réalisé selon la réglementation 2010/63/UE et selon la règle des 3R (Réduction, Remplacement, Raffinement):

- Le nombre d'animaux utilisés pour chaque expérience est calculé au minimum en fonction du test statistique retenu (Réduction).

- Durant l'étude, tout sera mis en œuvre pour minimiser le stress auquel les animaux sont soumis (Raffinement). Les animaux seront hébergés en groupe, et des éléments d'enrichissement du milieu seront mis à disposition (tube plastique rouge ou bille métallique). Pour chaque expérience, des points limites (perte de poids, prise alimentaire, comportement. . .) seront définis et des groupes "contrôle" adaptés au protocole seront constitués. Les souris post-chirurgie seront hébergés individuellement avec un accès libre à l'eau et à la nourriture, et des conditions standard de température et d'hygrométrie et un cycle jour/nuit normal. Un analgésique, le Torbugesic sera administré à la fin de la chirurgie (200 microlitre d'une solution à 0.1 mg/ml pour 10 g de souris) à toutes les souris, et pendant les 2-3 jours post-opératoire si nécessaire. Si un animal présentait un état douloureux inacceptable, ou des signes de mal-être important, il sera examiné par un responsable du bien-être animal en coordination avec un responsable de la mise en œuvre du projet, et si nécessaire, anesthésié puis euthanasié.

Par ailleurs, l'utilisation de cellules exprimant la luciférase pour générer les métastases nous permettra de suivre leur évolution à l'aide d'une méthode non invasive.

- Ces expériences vont permettre de valider l'efficacité de l'expression contrôlée d'un gène apoptotique pour le traitement des MHCC chez la souris. L'efficacité des vecteurs sera préalablement testée in vitro sur cellules de souris en culture. (Remplacement).

19517 Ce projet s'inscrit dans la recherche d'une nouvelle approche diagnostique ou d'un nouveau traitement pour la sclérose en plaques, une maladie qui touche le système nerveux central, en particulier le cerveau, les nerfs optiques et la moelle épinière. Dans cette pathologie, la transmission des influx nerveux est altérée, ce qui se manifeste par des symptômes très variables : engourdissement d'un membre, troubles de la vision, sensations de décharge électrique dans un membre ou le dos, troubles des mouvements. La sclérose en plaques évolue par poussées au cours desquelles les symptômes réapparaissent, mais aussi accompagnés de nouveaux symptômes. Au

bout de quelques années, les poussées laissent des séquelles qui peuvent devenir très invalidantes (altération du contrôle des mouvements, de la perception sensorielle, de la mémoire, de la parole).

La sclérose en plaques est une maladie auto-immune chronique, caractérisée par des réactions inflammatoires qui aboutissent par endroits à la destruction de la myéline. La myéline est une gaine qui entoure les fibres nerveuses et qui a pour rôle de protéger ces fibres et d'accélérer la transmission des influx nerveux. Le système immunitaire des personnes atteintes de sclérose en plaques détruit la myéline en la considérant comme étrangère au corps. En conséquence, les influx nerveux sont ralentis, voire complètement bloqués selon l'ampleur de zone touchée. En dehors des poussées inflammatoires, la myéline peut se reformer en partie autour de la fibre nerveuse, ce qui se traduit par une régression complète ou partielle des symptômes. Cependant, lorsque la démyélinisation est répétée et prolongée, les neurones peuvent être détruits définitivement. Les parties du système nerveux touchées par la maladie ressemblent à des plaques que l'on peut visualiser par IRM, d'où le terme de sclérose en plaques.

La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée sur le terrain :

1) Réduction : le nombre d'animaux utilisé a été rationalisé au maximum tenant compte, des analyses qui seront effectuées.

2) Raffinement : Un enrichissement de l'environnement des animaux est adapté en fonction des espèces. La température et l'hygrométrie de l'animalerie est contrôlée et adaptée aux espèces hébergées. La sclérose en plaques sera induite chez la souris par injection sous cutanée de fragments de protéines capables d'induire une encéphalomyélite auto-immune. Les premiers signes cliniques de la maladie apparaissent normalement dans les 9 à 14 jours suivant l'injection et se traduisent par une mobilité réduite de l'animal. Afin de préserver une alimentation et une hydratation correctes des animaux, la nourriture et l'eau sous forme gélifiée seront mises à disposition directement sur le fond de la cage dès l'apparition des signes cliniques. Des injections sous cutanées, par exemple de Ringer lactate, pourront aussi être réalisées pour empêcher la déshydratation des animaux. Le poids des animaux sera suivi quotidiennement, ainsi que le degré de sévérité de la maladie qui sera déterminé chaque jour pendant les 4 semaines suivant l'injection à l'aide d'une grille pré-établie de signes cliniques liés à la pathologie. À des fins d'analyse, des prélèvements de sang (prélèvement d'un faible volume de sang sur animaux anesthésiés) ou d'organes (après euthanasie des animaux) pourront être réalisés durant l'étude. Tous les moyens seront mis en œuvre pour réduire la souffrance des animaux. Un suivi étroit des animaux sera fait par un membre de la SBEA ou bien par le vétérinaire lui-même.

3) Remplacement : La sclérose en plaques est la maladie neurologique la plus répandue chez le jeune adulte, avec une estimation d'une personne atteinte sur 10000. De façon inexplicée, il y a deux fois plus de femmes que d'hommes atteints par cette maladie. Le diagnostic se fait la plupart du temps chez des personnes âgées de 20 à 40 ans, et dans de rares cas chez l'enfant (< 5% des cas). En l'absence de traitement thérapeutique efficace, hormis sur la composante inflammatoire et la douleur, il est donc essentiel d'identifier de nouvelles stratégies diagnostiques (diagnostic précoce) et thérapeutiques pour permettre la régénération de la myéline et ainsi ralentir l'évolution de la maladie, avec une possible disparition des symptômes si le traitement est initié à temps.

Dans ce contexte, un modèle animal est nécessaire pour étudier les différentes phases d'inflammation, de destruction et de régénération de la myéline, car les modèles cellulaires in vitro ne permettent pas de récapituler tous les processus mis en place lors de la réparation neuronale in vivo, avec l'implication de différents types cellulaires au cours du temps.

Les composés chimiques ou biologiques évalués dans ce projet seront pré-sélectionnés in vitro sur des critères d'efficacité, afin de limiter le nombre de produits à tester chez l'animal. Ils seront testés en mode diagnostique pour évaluer leur capacité à détecter les altérations précoces liées à l'évolution de la maladie, en mode préventif pour mesurer leur capacité à empêcher l'apparition des signes cliniques, ou en mode thérapeutique pour déterminer leur efficacité lors de la poussée inflammatoire sur des signes cliniques déjà existants.

900 animaux seront utilisés pour ce projet.

19518 L'obésité concerne aujourd'hui la quasi-totalité de la planète et les complications associées comme le diabète de type 2 (DT2) provoquent des décès prématurés dans de nombreux pays. Cette pathologie résulte d'un déséquilibre entre les apports et les dépenses énergétiques, renforcé depuis une cinquantaine d'années par l'augmentation massive de la consommation de glucides raffinés ((GR), comme le pain blanc, les pâtes non complètes, le riz blanc. . etc). Lors du processus de raffinage, les aliments perdent vitamines, minéraux et fibres. Cela altère leur intérêt nutritionnel, entraîne une élévation plus rapide de la glycémie consécutive à leur consommation (on parle d'index glycémique (IG) élevé), suivie d'une élévation rapide de l'insulinémie. Le raffinage améliore aussi l'appétence des aliments, ce qui a pour effet de stimuler leur consommation. À l'inverse, les régimes riches en fibres et à faible IG sont associés à une diminution de l'incidence de l'obésité et du DT2. La prokinéticine-2 (PROK2) est une protéine fortement exprimée dans le système nerveux central où elle joue un rôle essentiel dans la régulation de la prise alimentaire. Des données préliminaires suggèrent que PROK2 pourrait influencer la préférence alimentaire, notamment l'ingestion de féculents raffinés. Dans ce projet, nous souhaitons déterminer: 1/si le régime alimentaire a une incidence sur l'expression de PROK2 et 2/ si PROK2 peut influencer le comportement alimentaire chez la souris.

Notre laboratoire respecte la règle des 3R : raffinement, réduction du nombre d'animaux, remplacement. Pour faire cette étude, sur une durée de 3 ans, nous avons choisi de travailler sur des modèles murins (chez les invertébrés, il n'y a pas de pancréas qui produit l'hormone hypoglycémiant, l'insuline) qui nous permettent d'étudier des paramètres de comportement alimentaire, sanguins et métaboliques dans un contexte d'organisme entier, in vivo. En nous limitant à un panel statistiquement représentatif, nous aurons besoin de 204 souris. Nous réutiliserons au maximum les mêmes animaux pour diverses expériences, en veillant à respecter le bien-être animal. Nos protocoles ont été mis au point de façon à veiller au bien-être animal en améliorant leur environnement et en surveillant leur état de santé: notamment nous chercherons à éviter et limiter la douleur et la souffrance, à assurer des soins pré-, per- et postopératoires adéquats, à recourir à l'anesthésie et à l'analgésie, à appliquer les points limites établis préalablement et, enfin, à utiliser les procédures réglementaires et appropriées de mise à mort.

19519 L'objectif de ce projet est de mettre en évidence, in vivo, une activité antihypertensive de fractions ou extraits alimentaires (FEA) et d'identifier le (ou les) composé(s) actif(s), afin de déterminer le mécanisme de l'activité antihypertensive de ces FEA.

Le potentiel FEA, à réduire ou prévenir l'hypertension artérielle ou ses complications, sera étudié chez le rat SHR (rat spontanément hypertendu). Ce modèle animal est un modèle d'hypertension artérielle mimant la pathologie humaine. La pression artérielle systolique chez l'animal vigile sera déterminée par une méthode non invasive, consistant à placer un brassard obturant au niveau de la queue de l'animal, ainsi qu'un capteur de pouls.

Nous travaillons dans le souci du respect de la règle des 3 R. Une attention particulière est portée afin de réduire le nombre d'animaux utilisés. En effet, les animaux seront réutilisés lors de 2 à 3 expériences successives lorsque leur pression artérielle sera de nouveau stabilisée à son maximum (200-210 mmHg). L'enrichissement de l'environnement sera effectué à l'aide de bois à ronger (Briques de peuplier pour rats, Safe) et de la litière en quantité suffisante.

Le nombre d'animaux estimé est de 360 rats dont, 270 rats SHR et 90 rats contrôles Wistar Kyoto. Une étude utilisant le même protocole a fait l'objet d'une saisine précédente et ayant reçu un avis favorable pour une période de 5 ans se terminant le 11 juillet 2018. Il s'agit donc du renouvellement d'une procédure précédemment approuvée.

Il n'y a pas de point limite dans la première procédure : Détermination de l'activité anti-hypertensive de fractions ou extraits alimentaires. Cependant, les animaux seront attentivement surveillés. Si des complications ou des signes de détresse de l'animal devaient survenir pour des raisons non liées au protocole, les animaux seraient euthanasiés. Cette procédure expérimentale n'est pas douloureuse. Afin d'obtenir des résultats reproductibles, il sera nécessaire d'entraîner très progressivement les animaux maintenus à l'état vigile à un bref séjour dans un tube de contention.

Cette précaution permettra de limiter au maximum le stress des animaux, ce qui est une nécessité absolue pour l'obtention de résultats reproductibles.

En ce qui concerne la deuxième procédure : Prélèvements sanguins veineux. La douleur sera limitée dans cette procédure (douleur légère et de courte durée). Lors des prélèvements sanguins au niveau de la veine, un anesthésique local de type EMLA sera préalablement appliqué. Le point limite pourra être la survenue d'une infection locale. Afin de limiter le risque d'infection, les zones de prélèvement seront désinfectées avant et après les prélèvements sanguins. Les animaux seront quotidiennement surveillés. Toutefois, si une infection survient associée à des signes de détresse (piloérection, prostration, perte de poids supérieure à 20% de son poids initial etc. . .), l'animal sera euthanasié.

19520 Notre projet concerne l'identification des mécanismes cellulaires et moléculaires qui gouvernent les différentes étapes du développement du cortex cérébral : prolifération des cellules souches corticales, migration et différenciation neuronale.

Il s'étend sur une durée de 5ans et s'inscrit dans la recherche fondamentale.

Mots clés : développement du cerveau, cellule, molécule.

La compréhension de ces processus biologiques fondamentaux est un pré-requis pour progresser dans l'étiologie des pathologies neuro-développementales qui sont à l'origine de troubles invalidants (épilepsie, autisme, schizophrénie, etc). Si les études sur le tissu humain sont d'une importance théorique et clinique indéniable, les résultats sont souvent difficiles à corrélérer avec les observations obtenues chez le rongeur où il a été possible d'élucider le rôle de gènes individuels. Par ailleurs, le matériel histologique humain est rare et la préservation des tissus souvent non optimale. Le singe représente un maillon incontournable entre l'homme et le rongeur qui constitue le modèle majeur des approches réductionnistes. Des travaux récents ont en effet montré que certains mécanismes gouvernant le développement du cerveau sont communs au singe et à l'homme mais n'existent pas chez la souris. Un des atouts majeurs du cerveau de singe comme modèle d'étude de la corticogénèse réside également dans le haut niveau de résolution spatiale et temporelle. Alors que la multiplication des neurones corticaux se déroule pendant une période de 7 jours chez la souris, cette période dure 60 jours chez le singe.

Le bénéfice d'avoir recours au primate non-humain est de nous permettre d'avancer dans la compréhension du développement cérébral de l'homme. Nous avons pour but de mettre en lumière de nouvelles molécules ou processus qui pourraient s'appliquer à l'homme. Et par conséquent, faire avancer la recherche clinique sur des pathologies neuro- développementales chez l'homme.

Les animaux entreront dans une procédure de gravité modérée. Les femelles seront soumises à plusieurs gestations durant le protocole, étalées dans le temps. Celles-ci seront mise en place par des reproductions naturelles : une femelle en période d'ovulation est mise en contact avec un mâle. Ensuite, si la gestation est confirmée par échographie, les embryons seront prélevés par césarienne à un stade précis (de E35 à E105). Elle sera réalisée par notre vétérinaire référente avec une anesthésie et analgésie contrôlée. Après la césarienne, les femelles seront en observation post-chirurgie durant 3 jours par des personnels compétents, connaissant parfaitement les animaux et capables de détecter les moindres modifications de comportement. Nous constatons généralement peu d'effets indésirables et les femelles recouvrent pleinement un état normal en une journée. Elles restent en observation le temps de la cicatrisation suite à la chirurgie.

Nous avons une colonie de reproduction de Macaques cynomolgus composée d'environ 44 femelles pubères âgées de 4 à 8 ans et 4 mâles. Pour nos travaux, 15 femelles et 1 mâle nous permettront d'obtenir 75 embryons, 45 (9/an) utilisés pour l'étude des précurseurs de la corticogénèse à différents stades embryonnaires (de E35 à E105) et 30 (6/an) utilisés pour des analyses génétiques (RNA-Seq, miRNA-Seq).

A la fin de la procédure, les animaux pourront être réutilisés pour d'autres procédures ou placés dans des structures d'accueil appropriées.

Dans le cadre de l'application des « trois R », nous avons mis en place :

-Remplacement : Nous menons en parallèle des recherches sur les capacités de différenciation neuronale des cellules souches pluripotentes (cellules souches embryonnaires et cellules souches pluripotentes induites) de primate et sur les organoïdes cérébraux (développés in-vitro d'après des cellules souches pluripotentes). Cela nous permet de sélectionner les paramètres biologiques à étudier sur l'animal. Néanmoins, à l'heure actuelle, nous ne pouvons pas nous passer de l'organisation complexe en 3D du cerveau embryonnaire de primate non-humain.

-Réduction : Une même femelle pourra être utilisée pour des gestations successives (entre 2 et 6 gestations). Un maximum de 6 gestations sera admis pour une femelle, en tenant compte de leur participation au précédent protocole. Nous utilisons des tranches épaisses de cerveaux embryonnaires que nous maintenons en culture pendant 8 à 15 jours pour des observations de la multiplication et de la migration en temps réel. Nous avons fait réaliser sur mesure un microscope nous permettant de doubler le nombre de tranches observées (48 tranches) et de réaliser entre 5 et 8 conditions expérimentales par cerveau ce qui permet de réduire le nombre d'embryons utilisés d'un tiers.

-Raffinement : Les animaux sont hébergés dans de grandes volières, et inclus dans des groupes sociaux, avec du matériel de fourrage et de multiples formes d'enrichissement (perchoirs, tunnels, cachettes, piscines, . . .). De plus, nous entraînons les animaux à coopérer (par renforcement positif) pour certaines procédures comme les frottis quotidiens (qui nous permettent de déterminer le cycle menstruel des femelles) de manière à diminuer le stress de l'animal et pour des actes non invasifs et non douloureux comme les échographies de manière à éviter le recours à l'anesthésie. Par ailleurs, nous sommes en train de mettre en place des groupes sociaux mixtes, c'est-à-dire des harems : 5 à 8 femelles plus 1 mâle présent en continu dans l'hébergement des femelles. Cela permet de maintenir une stabilité du groupe social et de favoriser les coûts en période d'ovulation.

19521 Les cellules souches progénitrices hématopoïétiques (CSPH) suscitent un vif intérêt de la part de la communauté scientifique. Leur capacité de différenciation et d'autorenouveau, totalement inédite, en font un arsenal thérapeutique de haute valeur.

La greffe des CSPH s'est imposée comme un traitement efficace en complément de la chimiothérapie dans le cas d'hémopathies malignes (comme les leucémies ou encore les lymphomes) et non malignes incluant les déficits immunitaires ou les aplasies médullaires.

Dans le cas de greffe post-chimiothérapie pour un patient leucémique, l'efficacité de ce traitement repose sur le degré de compatibilité tissulaire entre le donneur et le receveur. La mortalité peut atteindre 50%, causée principalement par des infections virales qui profitent de la lenteur de la reconstitution du système immunitaire. Dans ce contexte, nous avons développé une nouvelle stratégie thérapeutique pour rendre plus efficace la greffe de CSHP et augmenter les chances de survie des patients greffés. Cette stratégie thérapeutique repose sur la production de cellules dérivées de CSHP, des progéniteurs lymphoïdes, qui permettront d'accélérer la cinétique de reconstitution du système immunitaire des patients post-greffe.

Le projet permettra d'évaluer et de valider in vivo ces produits de thérapie cellulaire en étudiant l'efficacité de la greffe via le suivi de la cinétique de reconstitution d'un système immunitaire fonctionnel.

Plusieurs schémas thérapeutiques seront explorés pour une analyse poussée concernant l'approche combinée ou séquentielle des greffes avec ces produits de thérapie cellulaire.

La mise au point de ces protocoles innovants nécessite une étape préalable chez l'animal afin de vérifier in vivo leur efficacité et leur innocuité avant passage chez l'humain.

Les greffes des produits de thérapie cellulaire seront réalisées sur un modèle murin immunodéficient permettant la reconstitution à des degrés divers des différentes lignées hématopoïétiques humaines. Ce modèle murin représente par conséquent un modèle indispensable afin de tester in vivo notre stratégie thérapeutique dans des conditions proches de celles utilisées en routine sur les patients. Il s'agit d'une étape indispensable à l'application future de nos stratégies innovantes en protocole clinique.

Ces souris seront greffées à l'âge adulte. Des groupes de 5 à 10 souris (nécessaires pour obtenir des résultats statistiquement significatifs) seront greffées selon les schémas thérapeutiques développés en comparaison à des groupes témoins.

Le nombre total d'animaux à greffer s'élève au maximum à 510 souris sur cinq ans.

Le principe des 3R a été appliqué comme suit :

Remplacer : Des études fonctionnelles in vitro ont été réalisées avec des cellules humaines afin d'optimiser les conditions de préparation du produit de thérapie cellulaire. Toutes les étapes visant à améliorer la performance du produit de thérapie cellulaire ont été mises au point avec des expériences exclusivement in vitro.

Les expériences chez l'animal interviennent donc au terme d'un long processus et s'inscrivent dans le cadre d'une validation in vivo de l'effet thérapeutique de ces cellules avant un développement clinique.

Réduire : Le nombre total de souris impliquées dans les expériences a été réduit au minimum nécessaire pour obtenir des données suffisantes tout en s'assurant d'une interprétation statistique fiable des résultats pour évaluer l'effet thérapeutique des produits testés. Afin de réduire le nombre d'animaux, les scores d'évaluation clinique les plus objectifs, prédictifs et robustes seront privilégiés.

Raffiner : Afin de limiter la souffrance et le stress infligés aux animaux, une surveillance rapprochée et l'utilisation d'analgésiques sont prévues. Des points limites ont été établis afin d'anticiper le sacrifice de l'animal si nécessaire. De plus, le milieu d'hébergement sera enrichi à l'aide de coton de nidification et de rouleaux en carton pour favoriser les cachettes et le jeu. D'autres outils seront disponibles à la demande pour éviter l'ennui si des animaux se retrouvent seuls dans les cages. Une anesthésie générale et une analgésie locale seront appliquées lors des prélèvements (retro-orbitaires ou sous-maxillaires) et lors des injections rétro-orbitaires.

Les résultats de ces expériences nous permettront de compléter les dossiers réglementaires pour les futurs essais cliniques de thérapie cellulaire et génique chez des patients atteints de maladies génétiques hématopoïétiques sévères ou de cancers.

A terme, les résultats de ce projet permettront l'acquisition de données indispensables au développement clinique d'une thérapie innovante, à fort potentiel translationnel.

19522 Les troubles neurologiques sont des maladies du système nerveux central ou périphérique, c'est-à-dire qu'elles touchent le cerveau, la moelle épinière, les nerfs crâniens et les nerfs périphériques. Il existe de nombreuses pathologies cérébrales dont certaines ont été décrites dès le 19^{ème} siècle : maladie d'Alzheimer, maladie de Huntington, maladie de Parkinson. Les autres troubles neurologiques les plus courants comprennent l'épilepsie, la sclérose latérale amyotrophique (également appelée maladie de Charcot), la schizophrénie et la sclérose en plaques. Un français sur deux est touché directement ou indirectement par une pathologie cérébrale. Dans les pays à revenus élevés, la maladie d'Alzheimer et autres démences sont la deuxième cause de mortalité en 2019.

Actuellement, de nombreuses maladies neurodégénératives sont incurables et très fréquentes chez les personnes de plus de 65 ans comme la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson. L'architecture complexe du cerveau et ses nombreuses interactions avec l'organisme limitent la portée des études in silico et in vitro de ces pathologies cérébrales. L'utilisation de modèles de rongeurs mimant les troubles neurologiques est donc essentielle afin d'obtenir une meilleure compréhension de leurs développements et/ou et de favoriser la mise au point de traitements thérapeutiques.

L'objectif du présent projet est l'élevage de lignées génétiquement modifiées de rats et de souris reproduisant des troubles neurologiques. Cela permettra d'approfondir la caractérisation de ces modèles. Ultimement, ces études pourraient permettre d'identifier des substrats moléculaires et biologiques caractéristiques des pathologies cérébrales et de développer de nouvelles cibles thérapeutiques. Afin de satisfaire au raffinement, l'hébergement des animaux sera réalisé dans des locaux appropriés avec des conditions optimales de température et d'hygrométrie avec un cycle

jour/nuit de 12h/12h. De plus, un enrichissement sera systématiquement placé dans chaque cage et le personnel sera habilité à réaliser les différentes procédures dans le respect des règles d'éthique, de bien-être animal et du principe des 3R. Les surveillances quotidiennes des animaux permettront d'identifier d'éventuels animaux en souffrance et de prendre les mesures appropriées (surveillance accrue, mise à mort dans les cas les plus graves). Le nombre d'animaux est calculé selon les protocoles expérimentaux de manière à obtenir le minimum d'animaux par groupe permettant des résultats significatifs et homogènes. Afin de constituer les différents lots expérimentaux, il est estimé que sur les 5 années du projet un total de 6000 animaux est nécessaire.

19523 Les travaux pratiques (TP) de Physiologie Animale, de 3ème année de Licence nécessitent la mise en place de 8 séances différentes entraînant l'utilisation de rats ou souris.

Au cours de ces TP, les étudiants, 10 binômes maximum par salle, maximum 8 groupes par semaine, sont amenés à utiliser des rats mâles Wistar, 1 rat par binôme, ou 1 souris Swiss CD-1 mâle ou femelle par étudiant. Ces TP ont pour objectif de permettre l'acquisition de techniques expérimentales, ceci afin de mettre en œuvre des protocoles ayant pour but l'obtention de résultats exploitables : pose de canule jugulaire, pose de cathéter dans la carotide, dans la trachée et dans la vessie de rat, ainsi que l'étude du comportement de souris. À partir des résultats expérimentaux obtenus, les étudiants, pour chacune des séances de TP, doivent élaborer un compte rendu scientifique.

Au maximum, 8 groupes de 20 étudiants sont possibles, soit pour l'utilisation de rats, 7 séances de TP par binômes ce qui fait 700 rats par an donc 3500 rats sur 5 ans.

Pour les souris, utilisées dans un module d'enseignement optionnel, qui n'est donc pas pris par la totalité des étudiants, 1 séance de TP comportement soit 180 souris maximum par an, donc 900 souris sur 5 ans.

Les étudiants sont en même temps sensibilisés au respect des lois d'éthique concernant l'utilisation de modèles animaux.

Les animaux sont hébergés en cages standard (respect du nombre d'animaux par cage soit 5 rats, nourriture et boisson à volonté) avec pour enrichissement des copeaux en grande quantité ainsi que des morceaux de bois à ronger.

Les procédures d'anesthésie sont effectuées par le corps enseignant habilité en expérimentation animale, avant le début des séances par injection intra-péritonéale (IP).

La règle des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer) :

- Rats et souris sont nourris ad libitum, stabulés dans des conditions idéales de température et de luminosité, dans des cages avec assez de sciure et de copeaux de bois pour qu'ils puissent se nicher et dotés de jouets en bois.

- Durant leur utilisation expérimentale, l'attention est portée de façon permanente à leur possible souffrance, l'anesthésie suffisante est complétée par addition d'anesthésique en IP.

- Utilisation d'un rat par binôme et formation expérimentale basée sur l'attention à porter à l'expérimentation, la précision dans les gestes et dans le déroulé des TP de façon à réduire au maximum la mortalité en cours de séance.

- Pour le déroulement des TP de 3ème année de Licence, il est indispensable pour et dans la formation des étudiants, d'utiliser les modèles animaux. Par contre, depuis plusieurs années, la manipulation d'animaux a été remplacée en 2ème année de Licence.

- 1 rat par binôme est utilisé à chacune des 6 séances de TP + 1 séance consistant à prélever une portion d'intestin de rat après euthanasie.

Au cours des 6 séances de TP, la mise en place de plusieurs procédures sur rats est nécessaire : canulation jugulaire et cathétérismes de la carotide, de la trachée et de la vessie.

19524 Le lupus érythémateux disséminé (LED) est une maladie auto-immune (pathologie au cours de laquelle le système immunitaire réagit contre l'organisme) rare caractérisée par la production d'autoanticorps (anticorps dirigées contre l'organisme) pathogènes et associée à une inflammation

de plusieurs organes. Le développement de cette maladie semble parfois liée à des facteurs génétiques. Ainsi, une mutation hétérozygote du gène ERN1, conduisant à une perte de fonction partielle de ce gène, a été décrite dans une famille comportant plusieurs membres atteints de lupus. Afin de mieux comprendre les conséquences de cette mutation sur le développement d'une autoimmunité, nous étudions un nouveau modèle transgénique murin portant la mutation d'Ern1 équivalente à celle décrite chez les patients. Ce modèle va nous offrir l'opportunité d'effectuer des investigations impossibles chez l'Homme, notamment de comprendre les mécanismes du développement de l'inflammation et de l'autoimmunité lorsque cette mutation s'exprime, et d'explorer les mécanismes de production d'autoanticorps.

Ce projet comprend 3 objectifs :

- I. Etudier le phénotype des souris mutées, à l'état basal (phénotype des cellules immunitaires et développement d'une autoimmunité), en comparaison à des souris contrôles,
- II. Etudier la réponse anticorps chez les souris mutées, en comparaison à des souris contrôles,
- III. Etudier les mécanismes de la production d'autoanticorps chez des souris issues du croisement entre les souris mutées et un modèle transgénique murin (56R) permettant de suivre facilement les cellules produisant les autoanticorps, d'une part, et avec un autre modèle transgénique favorisant le développement d'une autoimmunité (B6 lpr/lpr), d'autre part.

Afin de respecter la règle des 3R, une réduction du nombre d'animaux utilisés a été décidée.

Nous prévoyons d'analyser des groupes de 10 souris pour chaque question posée, ce qui est minimum pour pouvoir réaliser des tests statistiques, soit 300 souris pour le projet global.

Pour répondre à l'objectif de raffinement, les souris seront hébergées en groupes sociaux, et dans des cages comportant des enrichissements (nids, barreaux).

De plus, avant chaque prélèvement sanguin ou injection, les souris seront anesthésiées. Enfin, les souris seront observées régulièrement et les dispositions adéquates seront prises si la souffrance des animaux devait atteindre les points limites. La règle du remplacement n'est pas applicable ici : en effet, nous devons avoir recours à un modèle in vivo afin d'étudier les réponses immunes et la production d'autoanticorps qui mettent en jeu des coopérations cellulaires multiples dans les organes lymphoïdes tels que la rate et les ganglions. Pour ces raisons, nous ne pouvons avoir recours à l'utilisation de lignées cellulaires (cellules non primaires) in vitro. En ce qui concerne les modèles in vivo, la souris est le modèle approprié afin d'étudier les fonctions du système immunitaire, car les connaissances chez la souris sont très développées dans le domaine de l'immunité et de l'autoimmunité.

Ce projet pourrait conduire à une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques à l'origine de développement d'une autoimmunité, et à l'identification de nouvelles stratégies thérapeutiques pour ces patients.

19525 La fréquence et le rythme cardiaque sont des facteurs très importants pour la qualité de la vie et la santé humaine. Définies comme des dysfonctions du rythme cardiaque, les arythmies sont des maladies très répandues avec des

degrés de sévérité et gravité très variable, pouvant aller jusqu'à la mort subite. Parmi les arythmies les plus répandues, nous trouvons la bradycardie. Cette pathologie se caractérise par une fréquence cardiaque trop basse (avec risque de syncope) pour répondre à la nécessité physiologique de l'organisme notamment face à l'effort. Un état de fatigue chronique, des vertiges et des palpitations sont les symptômes invalidants de la bradycardie. Elle est

plus répandue chez la population âgée, mais peut aussi affecter de jeunes individus.

La seule thérapie actuellement disponible consiste en la pose irréversible d'un pace-maker électronique. Malgré ses atouts multiples, cette thérapie présente de nombreux inconvénients avec l'augmentation massive du nombre de patients traités, notamment à cause du vieillissement de la population. Ces inconvénients sont notamment une implantation irréversible, des coûts importants et une amélioration de la qualité mais pas de l'espérance de vie. Dans un avenir proche, il sera donc de plus en plus important de disposer des nouvelles stratégies thérapeutiques, tout

particulièrement, des thérapies cellulaires basées sur les cellules souches et des thérapies pharmacologiques. L'objectif étant d'améliorer la fréquence cardiaque et de retarder voir remplacer les pace- makers électroniques.

Notre projet vise à mieux comprendre le rôle physiologique de protéines spécifiques impliquées dans la genèse et la régulation de la fréquence cardiaque. Ces protéines pourraient être de nouvelles cibles thérapeutiques dans la prise en charge de la bradycardie. En utilisant des modèles de souris génétiquement modifiées pour différentes combinaisons de ces protéines (14 lignées différentes), nous allons étudier la génération et la régulation de fréquence cardiaque. Cette étude se fera par l'enregistrement d'électrocardiogrammes, d'écho-cardiographies et 4 approches ex vivo et in vitro sur le coeur. Dans ces différentes approches, nous effectuerons divers traitements pharmacologiques connus pour réguler la fréquence et le rythme cardiaque.

Pour ce projet, les tests "à-priori" permettent d'estimer que 2000 souris sont nécessaires pour réaliser l'ensemble des objectifs fixés.

Nous appliquerons la règle des 3R notamment de la façon suivante :

*Remplacement : La fréquence et les arythmies cardiaques sont des phénomènes complexes résultant des interactions coordonnées de plusieurs paramètres. Ce niveau d'intégration ne peut être obtenu que sur un modèle animal complexe. Dans le choix de ce modèle animal, la souris permet de répondre au mieux à nos questions sans avoir recours à des modèles plus proche de l'homme.

*Réduction : Pour avoir une mesure fiable et statistiquement significative du paramètre de fréquence cardiaque, le nombre minimum d'animaux par lignée a été déterminé en se basant sur notre expérience, sur des analyses statistiques et sur les données bibliographiques. De plus, nous utiliserons à la fois les mâles et les femelles ce qui permet d'exploiter l'ensemble des animaux produits. Une rationalisation sur la production des génotypes nécessaires sera une partie importante de nos schémas d'accouplements pour la production de nos lots.

*Raffinement. Toutes les lignées de souris que nous utiliserons ne présentent aucun signe de douleur dans nos conditions d'élevage (cages avec enrichissement selon la réglementation et notre SBEA). Au cours des expérimentations, l'état général des souris est suivi quotidiennement par du personnel qualifié. La douleur induite par l'implantation des transmetteurs pour la télémétrie est prise en charge par un analgésique pendant et après l'anesthésie. Si des complications devaient survenir au cours du protocole expérimental et un animal montrait un ou plusieurs signes de détresse (prostration, arrêt d'alimentation, poils ébouriffé, perte de poids >15%, problèmes de locomotion), il sera euthasié (anesthésie par isoflurane suivie de dislocation cervicale).

19526 Les traitements disponibles aujourd'hui pour traiter la maladie d'Alzheimer (MA) sont essentiellement symptomatiques. La recherche de nouvelles molécules avec des cibles originales est cruciale. La fluoroéthyl-normémantine (FENM), molécule dérivée de la mémantine, semble être un candidat médicament intéressant. Les données préliminaires obtenue au laboratoire suggèrent en effet que la FENM serait un neuroprotecteur puissant, validé pour l'instant dans un modèle pharmacologique aigue de la MA chez la souris. La molécule présenterait une efficacité supérieure à celle de sa molécule parente, la mémantine notamment sur les aspects anti-inflammatoires et une absence d'effet amnésiant direct aux doses élevées. Le but de ce projet est de consolider ces résultats dans un modèle transgénique murin de la MA, un modèle qui se rapproche des caractéristiques histopathologiques et cliniques de la MA avec une évolution progressive de la pathologie. Le potentiel thérapeutique de la FENM seul ou en combinaison avec d'autres molécules pharmacologiques mise sur le marché sera donc évalué. Ce projet d'une durée de 5 ans à pour maximum l'utilisation de 798 souris. Ces souris seront issues d'un élevage qui débutera au laboratoire avec plusieurs couples reproducteurs. Les souriceaux (mâles et femelles) issus de cette reproduction seront directement intégrés au protocole.

Remplacement : L'utilisation d'un modèle transgénique de la MA pour ce projet est indispensable car ces modèles sont le seul recours « in vivo » autre que l'humain à présenter les symptômes pathologiques de la MA. Ils sont donc indispensables dans une étude pré-clinique.

Réduction : Afin de réduire le nombre d'animaux les doses administrées aux animaux se baseront sur les doses efficaces observés sur un modèle aigu de la MA précédemment obtenus au laboratoire. Les analyses statistiques adaptées aux données générées permettront de limiter le nombre d'animaux par groupe (12 souris/groupe). Une veille bibliographique sera également prise en compte durant les 5 années du projet. Plusieurs structures du cerveau seront prélevées dans cette étude afin de concentrer un maximum d'échantillons et éviter ainsi de relancer des expérimentations.

Raffinement : De la naissance jusqu'à la fin de vie des animaux les procédures d'injections seront peu douloureuses avec une administration par voie intra péritonéale et orale (eau de boisson). L'état des animaux sera suivi régulièrement avec une surveillance journalière en suivant la courbe de poids des animaux. Dans le cas où le traitement pharmacologique serait à l'origine de douleur visible ou de détresse le traitement serait interrompu et si nécessaire la mise à mort de l'animal serait anticipée. Ce sera le cas lorsque l'animal perdra 20% de son poids de départ ou lorsque celui-ci sera isolé du reste du groupe ou présentera des lésions cutanées signe d'un stress. Les animaux seront aussi manipulés tous les jours afin de créer une habitude diminuant ainsi le stress quotidien que peut représenter la présence de l'expérimentateur. Afin de suivre les animaux une feuille de bien-être, avec des points limites sera accessible à l'animalerie et complété par l'expérimentateur lorsque tout comportement suspect (plaie, lésions cutanées, agressivité, stéréotypie, apathie, convulsions, ...) sera remarqué par celui-ci. Nous procéderons à l'enrichissement minimal du milieu, car un enrichissement trop important interagit avec l'étude de la mémoire. Les animaux auront donc seulement accès à des copeaux de cartons afin de créer un environnement sécurisant permettant la création d'un nid. Dans ce contexte de la règle des 3R, nous anticipons que ce projet nécessitera au total 798 souris génétiquement modifiées. Ce projet comporte 6 procédures expérimentales.

19527 Notre projet vise à comprendre comment notre cerveau se souvient des environnements ou contextes qui ont acquis une connotation aversive. Cette mémoire est cruciale pour l'adaptation aux situations agressives du quotidien, par exemple se souvenir qu'il ne faut pas mettre les doigts sur une clôture électrifiée, et jouent un rôle majeur dans certaines pathologies (addiction, troubles de l'anxiété). Le cortex préfrontal et l'amygdale basolatérale sont deux structures du cerveau qui sont impliquées dans ce type d'apprentissage. Nous chercherons à caractériser et à comparer la dynamique des interactions cérébrales et leurs rôles dans deux types de mémoires aversives, physiologique (peur après un choc) et pathologique (effets aversifs du manque/sevrage dans la dépendance aux opiacés). Nous utiliserons un même protocole comportemental chez le rat adulte et étudierons les rôles respectifs des liens entre le cortex préfrontal et l'amygdale basolatérale par des techniques permettant leur inactivation transitoire à différentes étapes du protocole comportemental, grâce à des molécules injectées dans ces régions précises du cerveau. Les animaux subiront d'abord une chirurgie afin d'injecter ces molécules qui permettent de manipuler l'activité des neurones ciblés. Puis ils seront engagés dans un protocole comportemental de conditionnement permettant de mesurer la mémoire que l'animal garde d'un contexte aversif qu'il soit physiologique ou pathologique. La réponse à un conditionnement aversif est l'évitement de ce contexte, nous escomptons modifier cette réponse en manipulant les structures cérébrales d'intérêt et ainsi avoir une meilleure compréhension des stratégies thérapeutiques qui pourraient être développées pour traiter les mémoires émotionnelles pathologiques.

Le respect de la règle des 3Rs.

Remplacer: Le recours à l'animal est imposé par la nature même du projet qui étudie les mémoires aversives, en corrélation avec la réponse comportementale, ce qui nécessite d'étudier le cerveau intact chez l'animal vigile. Il n'existe donc pas pour l'instant de méthodes alternatives que nous puissions utiliser pour répondre à notre question scientifique.

Réduire: Nous avons choisi de recourir le plus largement possible à des interventions réversibles afin de limiter le nombre d'animaux nécessaires (plusieurs interventions peuvent être faites sur le même individu). Le nombre d'animaux nécessaire (412 rats) durant ce projet de 4 ans a été évalué

par l'expérience passée selon l'estimation de la variance observée avec ce type de données pour permettre une signification statistique satisfaisante.

Raffiner: Par ailleurs, les données comportementales étant essentielles, s'assurer du bien-être des animaux est un prérequis absolu pour la bonne marche du projet. Des dispositions sont prises pour permettre aux animaux de reproduire leurs comportements naturels Dans une animalerie aux paramètres environnementaux contrôlés, la taille des cages où ils sont hébergés leur permet de se déplacer et se redresser aisément. La litière changée régulièrement leur permet de fouir . Ils sont deux individus par cage pour éviter l'isolement social avec la présence de nid et de tunnel pour se cacher et jouer et des bâtons à ronger). La nourriture et l'eau de boisson leur sont fournies ad libitum. Ils sont surveillés quotidiennement par un personnel qualifié et des soins adaptés leur sont apportés dès le constat d'un problème.

Des points limites suffisamment précoces seront définis pour éviter toute souffrance tout au long de leur vie. L'utilisation de molécules adaptées (anesthésiques, analgésiques) permet d'éviter la douleur et l'inconfort dus aux étapes chirurgicales avec une surveillance renforcée faite à partir de critères objectifs (évolution du poids, signes physiques et physiologiques, comportements).

19528 Les nanomatériaux (composés de particules < 100 nm) sont de plus en plus présents dans le secteur de l'agroalimentaire, notamment dans les aliments en tant qu'additifs. L'exposition à ces additifs est souvent chronique (jusqu'à 1-10 mg/kg/jour en Europe) et commence très tôt, via la consommation maternelle suivie d'un passage vers le fœtus (transplacentaire) ou dans le lait. Le microbiote intestinal se retrouve donc au contact de ces additifs dès son implantation à la naissance. Le microbiote joue un rôle clé dans plusieurs fonctions physiologiques telles que les fonctions digestives, immunitaires, métaboliques et cérébrales. Une altération du microbiote intestinal (appelée dysbiose) est associée entre autres à des désordres intestinaux, neurodéveloppementaux et métaboliques. Du fait de leurs propriétés antibactériennes, une exposition chronique à certains additifs alimentaires est susceptible d'induire une dysbiose capable de favoriser le développement de ces désordres.

En réalisant une étude longitudinale allant de la vie in utero à l'âge adulte chez la souris, l'objectif de ce projet est d'explorer le devenir périnatal de trois additifs alimentaires, et d'en évaluer les effets sur les fonctions intestinales, neurologiques et métaboliques des descendants, jusqu'au rôle synergique du microbiote dans ces altérations.

Pour ce projet, des souris seront exposées durant la gestation et la lactation à trois additifs alimentaires ou un cocktail des 3 additifs ainsi qu'à leur nanomatériau de référence (100% de nanoparticules, NPs), à des doses encadrant l'exposition humaine. Les additifs seront incorporés dans les aliments. La dysbiose de la mère et des nouveau-nés, ainsi que la répartition des particules dans l'organisme fœtal seront étudiées par microscopie et dosage. Au sevrage, certains petits seront ensuite exposés aux mêmes additifs que leur mère jusqu'à l'âge adulte. La composition et l'activité métabolique du microbiote, ainsi que la barrière intestinale, la réponse immune, l'homéostasie métabolique, le développement cérébral et le comportement seront étudiés chez la descendance au sevrage et à l'âge adulte. Le rôle du microbiote intestinale dans les effets délétères sera évalué par transfert de microbiote.

Ce projet sera conduit dans le respect de la règle des 3R, les modèles alternatifs ne permettant ni d'étudier la répartition des particules dans l'organisme ni de recréer la complexité des dialogues Microbiote-intestin -foie -cerveau, ni de voir les impacts sur un organisme exposé dès la périnatalité. Ces souris seront exposées de la gestation jusqu'à l'âge adulte pour avoir une étude aux différents stades de développement, pour les trois additifs et le cocktail de ces additifs. Les femelles seront isolées durant la gestation pour diminuer le stress, réduire le cannibalisme et ainsi obtenir un taux de reproduction optimal. En prenant un taux de réussite de fécondation de 60% et un nombre de descendants mâles et femelles de 12 par groupe, 8056 souris sur 5 années sont nécessaires pour ce projet. Une étude préliminaire sur le placenta humain a permis d'obtenir des résultats de passage pour un additif, justifiant ainsi d'étudier l'exposition périnatale chez la souris. Le nombre de souris a été ajusté afin d'avoir le minimum requis par les tests statistiques et pouvoir exploiter les résultats. Tout sera mis en oeuvre pour assurer le bien-être des animaux avec notamment un hébergement

collectif dans des cages enrichies avec des dispositifs de nidification pour réduire le stress et l'utilisation de l'anesthésie pour les procédures potentiellement douloureuses. Si malgré toutes les mesures prises pour réduire le stress au minimum, une souffrance est constatée, la procédure sera systématiquement arrêtée et l'animal placé en soins.

19529 L'inflammation de la peau ou inflammation cutanée (aussi connue sous le nom de dermatite) est une pathologie très fréquente et dont l'incidence est en constante progression.

L'inflammation cutanée chez l'Homme se caractérise par la présence sur la peau des 4 points cardinaux de l'inflammation : la rougeur, la chaleur, le gonflement et la douleur.

Les causes de l'inflammation cutanée sont nombreuses : les infections, localisées ou plus étendues, dues à un microbe (abcès, folliculite, furoncle...), un parasite (poux, gale, tique...), un virus (varicelle, rubéole, herpès, zona...) ou encore un champignon (mycose), pouvant toucher toutes les régions de la peau sans exception, les inflammations des articulations provoquant pratiquement toujours une inflammation de la peau en regard, les inflammations des vaisseaux, en particulier des veines et des vaisseaux lymphatiques, les allergies et les réactions inflammatoires à des agressions mécaniques ou chimiques ou encore aux rayonnements ou aux radiations (soleil, rayons X...).

Parmi les différentes formes d'inflammation cutanée, la dermatite atopique ou eczéma atopique et le psoriasis sont les 2 formes les plus importantes. La dermatite atopique se traduit par des plaques rouges en particulier sur les plis de la peau et les convexités du visage, associées à des démangeaisons (prurit) et des zones de peau sèche (xérose), entraînant souvent des troubles du sommeil. Si une prédisposition génétique est certaine, la hausse de la prévalence des dermatites atopiques observées au cours de 40 dernières années signale que des modifications de l'environnement jouent un rôle dans le phénomène. Le psoriasis est très fréquent puisqu'il concerne environ 3% de la population, les personnes d'origine européennes en souffrant plus fréquemment que les autres. Il se traduit par la formation de plaques rouges accompagnées de squames (peau morte) avec une localisation très variée, zones de frottement comme les genoux, les coudes, la région lombaire, les plis, mais aussi le cuir chevelu, les mains et les pieds, les ongles et les muqueuses. Si des facteurs génétiques sont également connus, des anomalies immunitaires et des facteurs déclenchants ou aggravants des crises de psoriasis sont nombreux : frottements des habits sur la peau, contrariété ou stress psychologique, surmenage, alcool, surcharge pondérale, infection (angine, rhinite, pharyngite) et même certains médicaments par effet secondaire.

La recherche étudie aujourd'hui les anomalies génétiques et les anomalies de voies de signalisation aboutissant à une sécrétion excessive de cytokines pro-inflammatoires dans ces 2 formes de pathologies. Les progrès thérapeutiques récents reposent avant tout sur la mise en place de techniques permettant un meilleur ajustement des outils thérapeutiques aux besoins des patients. Car si ces pathologies ne mettent que rarement la vie en danger, il est fréquent qu'elles diminuent gravement la qualité de vie.

Le but de ce projet est donc d'évaluer les effets de 4 composés ayant des propriétés anti-inflammatoires démontrées par des études in vitro, en traitement curatif sur un modèle d'inflammation cutanée chronique que nous avons développé et validé chez la souris Hairless Skh-1. Ce modèle d'inflammation cutanée chronique obtenu par applications cutanées répétées de 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA) mime les pathologies inflammatoires de la peau telles que le psoriasis et la dermatite atopique observés chez l'Homme.

Ce projet nécessitera l'utilisation de 36 souris femelles Hairless Skh-1, réparties en 6 groupes de 6 souris chacun, qui seront soumises aux procédures expérimentales suivantes toutes effectuées sur animaux vigiles :

1) induction puis maintien de l'inflammation cutanée pendant 2 semaines de J0 à J14 par applications cutanées de TPA ou du véhicule de mise en solution du TPA (acétone) pour le groupe contrôle non induit,

2) traitement par application cutanée (topique) de chacun des 4 produits à tester ou du véhicule de mise en solution de ces produits (placebo) pendant 1 semaine de J8 à J14,

3) observation des effets des traitements sur l'inflammation cutanée avec scorage quotidien des niveaux d'inflammation cutanée de J1 à J15.

Les animaux seront mis à mort 24 heures après le dernier traitement et le dernier scorage effectué à J15, par injection d'une surdose d'euthanasique sous anesthésie gazeuse.

Les animaux seront placés à 2 par cage (18. 9 x 29. 6 x 12. 8 cm) pour l'ensemble des groupes expérimentaux, en cycle de lumière inversé pour respecter leur horloge biologique (chronobiologie) et celle des produits testés (chronopharmacologie), et des feuilles de papier absorbant seront placées dans leur cage comme enrichissement pour assurer leur bien-être (Raffinement).

Il n'existe pas de modèles *in vitro* permettant l'évaluation de l'efficacité de composés sur l'inflammation cutanée chronique (Remplacement) et nous utiliserons un nombre réduit d'animaux mais suffisant pour mettre en évidence des différences significatives selon notre expérience de ce modèle dans nos conditions expérimentales (Réduction).

Des observations quotidiennes des animaux seront effectuées tout au long de l'expérimentation, leur poids sera mesuré quotidiennement et l'atteinte des points limites définis (perte de poids de plus de 15% sur 3 jours ou de plus de 20% du poids maximum atteint au cours de l'étude, affaiblissement (cachexie), convulsions, tremblements, paralysie, vocalises...) entrainera la sortie d'étude et la mise à mort des animaux selon les recommandations éthiques.

Compte-tenu de l'augmentation constante de l'incidence des pathologies inflammatoires de la peau dans la population européenne mais aussi mondiale, cette étude présente un enjeu socio-économique certain car les composés testés pourraient ensuite être testés chez l'Homme, ouvrant ainsi la voie à des traitements plus efficaces, moins coûteux et surtout avec peu ou pas d'effets secondaires associés en comparaison avec certaines thérapies actuelles.

19530 Les cancers du sein triple négatif (CSTN) constituent un sous-groupe de tumeurs agressives représentant 15% des cancers du sein. A ce jour, la chimiothérapie est l'option dominante pour ces cancers et il existe peu de thérapies alternatives pour les patientes. La plupart des cellules cancéreuses doivent modifier leur métabolisme cellulaire afin d'accroître leur capacité à produire de l'énergie, des acides aminés, des cofacteurs, pour conduire à une prolifération accélérée. L'étude de ces altérations métaboliques dans les cellules cancéreuses constitue une nouvelle piste de recherche à visée thérapeutique. Pour cela la compréhension du rôle des différents acteurs de ces voies métaboliques est indispensable. La voie de synthèse et dégradation de la proline est altérée dans le cancer du sein triple négatif et l'enzyme qui nous intéresse la delta-1-pyrroline-5-carboxylate déshydrogénase mitochondriale (ALDH4A1) participe à la dégradation de la proline. Cette enzyme est peu exprimée dans les cellules de cancer du sein triple négatif. Nos données *in vitro* suggèrent que cette enzyme pourrait posséder des propriétés de suppresseur de tumeur.

L'essai *in vivo* présenté ici vise à valider les observations faites *in vitro* et à établir le potentiel rôle d'ALDH4A1 en tant que « suppresseur de tumeur ». Pour cela, nous souhaitons évaluer l'incidence de la surexpression et de la baisse d'expression d'ALDH4A1 dans la prise ou la pousse de xénogreffes issues de l'injection des cellules de CSTN, les SUM159, chez la souris athymique. La confirmation *in vivo* du rôle inhibiteur de ALDH4A1 sur la pousse des tumeurs constituera une avancée importante pour la compréhension des adaptations métaboliques du CSTN et permettra d'établir que la voie de dégradation de la proline peut constituer une cible thérapeutique. Pour cette étude 114 animaux seront nécessaires pour une durée maximale de 3 ans et le plan expérimental a été conçu en prenant en compte de la règle des 3R :

Remplacement : le protocole est établi en fonction des données de la littérature sur le modèle de xénogreffes. Ce projet sur un système vivant est nécessaire pour valider nos observations sur cultures cellulaires. En effet, il n'est pas possible de recréer *in vitro* la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires et physiologiques rentrant en jeu.

Réduction : le nombre d'animaux n'excède pas la quantité nécessaire à celle requise pour la confirmation de l'effet attendu (mécanisme d'action) et une exploitation statistique pertinente des données.

Raffinement : dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures a été mise au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal. Le nombre d'animal par cage sera limité à 5. Les animaux seront surveillés quotidiennement. L'hébergement sera modifié et l'environnement enrichi par la litière, des buchettes, des frisottis ou des mouchoirs. Dans le cas d'isolement d'un animal, un tunnel sera en plus mis dans sa cage. Lorsque l'un des points mentionnés dans la fiche de suivi clinique sera observé, l'animal sera alors suivi quotidiennement. Parmi ces points, une perte de poids supérieure à 20%, un volume tumoral supérieur à 1600 mm³ ou des ulcérations tumorales ont été établis dans la procédure expérimentale comme points limites.

19531 La digestion, la glycémie, et l'appétit sont régulés par différentes hormones (telles que l'insuline pancréatique), produites par les cellules endocrines présentes dans le pancréas et l'intestin. Des pathologies sévères telles que diabète, obésité et malabsorption intestinale sont associées à des altérations des cellules endocrines. Notre laboratoire s'intéresse aux mécanismes responsables du développement des cellules endocrines pancréatiques et intestinales, afin de comprendre comment ces cellules très hétérogènes sont produites, en particulier dans l'intestin (où elles sont appelées cellules entéroendocrines (CEE)), et comment elles sont capables d'assurer leurs fonctions tout au long de la vie. Malgré leur grande diversité, les cellules endocrines sont toutes issues de cellules dites progénitrices qui expriment un gène spécifique commun. L'absence d'expression de ce gène dans l'intestin au cours du développement entraîne une perte de l'ensemble des CEE et par conséquent de toutes les hormones qu'elles produisent, provoquant une malabsorption intestinale et des diarrhées chroniques. Ces altérations engendrent des atteintes très sévères chez l'Homme et entraînent une létalité périnatale dans des modèles murins, empêchant l'étude à des stades tardifs, lorsque l'intestin est pleinement fonctionnel. Les cellules de l'épithélium intestinal, y compris les CEE, sont continuellement renouvelées (tous les 3-4 jours chez l'Homme) durant toute l'existence. Afin d'étudier le rôle des CEE et des hormones intestinales dans l'intestin mature au cours de ces processus et d'éviter la létalité périnatale, nous avons développé un modèle de souris où l'on peut induire, suite à l'administration d'une drogue (le tamoxifène), l'inactivation du gène responsable de la formation des CEE dans l'intestin. Dans ce projet, nous souhaitons induire l'inactivation de ce gène chez l'adulte afin de définir l'impact de la perte des CEE sur le métabolisme énergétique (en particulier la régulation de la glycémie) et l'absorption des nutriments, et de suivre les éventuelles conséquences sur la flore intestinale. Nous souhaitons également évaluer le rôle de l'alimentation sur le développement des CEE. Dans ce but, l'ensemble des analyses (métabolisme, flore intestinale) sera réalisé à la fois en présence d'une alimentation standard et d'une alimentation riche en graisses.

Le projet décrit ci-dessus a été réalisé en partie sous le couvert d'une autorisation précédente. C'est le cas des études chez le mâle sous régime standard et riche en graisse, ainsi que chez la femelle sous régime standard (en cours). Cependant, les études chez le mâle ont dûes être arrêtées suite à la pandémie de COVID-19 ou à une mauvaise tolérance du régime riche en graisse (perte de poids rapide) et sont donc incomplètes. Par conséquent, elles ont besoin d'être répétées. Ainsi, cet avenant comprend la réalisation d'une nouvelle étude chez le mâle en régime standard et riche en graisse, ainsi que la potentielle répétition des études chez la femelle. En effet, les études chez la femelle en cours (régime classique) ou à venir (régime riche en graisse) seront répétées totalement ou partiellement, si la première étude doit être arrêtée suite à un évènement extérieur à l'étude ou afin de récolter des échantillons (tissus, fèces) ou mesures (dosages sanguins) supplémentaires. En outre, un régime riche en graisse plus léger (45% de graisses) que celui suivi lors des premières expériences (60% de graisses) sera utilisé afin d'améliorer le bien-être et la survie des animaux dépourvus de CEE.

Dans ce projet (établi pour une période de 5 ans), nous utiliserons 120 souris pour les études métaboliques in vivo, ce qui correspond à 12 animaux par lot, incluant un lot contrôle et un lot mutant, les 2 types d'alimentation (standard et riche en graisses), et des lots de mâles et de femelles pour tenir compte d'éventuelles différences liées au sexe. Cet avenant prévoit ainsi une seconde étude par condition (sexe, régime alimentaire)

Pour générer les organoïdes intestinaux, nous utiliserons 20 souris (incluant 5 animaux par lot, contrôles/mutants et mâles/femelles), les analyses étant ensuite majoritairement poursuivies in vitro dans un environnement défini. Nous utiliserons ainsi un total de 140 souris.

Remplacement : Ces analyses liées à la physiologie étudient le métabolisme et les interactions avec l'environnement (communications inter-organes, réponses aux stimuli microbiens et alimentaires...) et ne peuvent être réalisées qu'in vivo. Pour analyser plus finement les mécanismes à l'échelle cellulaire dans un environnement défini, nous souhaitons également générer des organoïdes intestinaux in vitro à partir de la lignée de souris décrite ci-dessus, où l'expression du gène d'intérêt aura été préalablement abolie chez l'adulte par traitement au tamoxifène. Les organoïdes intestinaux correspondent à des "mini-intestins" qui ne comportent que l'épithélium intestinal, incluant les CEE. Ce système simplifié présente différents avantages: les organoïdes peuvent être amplifiés et maintenus en culture à long terme dans un environnement défini, qui peut être modifié aisément (par addition de substances d'intérêt dans le milieu de culture); ils peuvent également être modifiés génétiquement sans avoir recours à l'animal. L'établissement d'un tel modèle permettra de réaliser des analyses à l'échelle cellulaire et moléculaire, pouvant être répétées in vitro de manière à atteindre une puissance statistique suffisante, et permettra ainsi de réduire le nombre d'animaux utilisés.

Raffinement : la majorité des expérimentations de ce projet sera réalisée sur des plateformes dédiées par un personnel compétent effectuant couramment les différentes procédures et respectant l'ensemble des règles relatives au bien-être animal, limitant ainsi au maximum le stress de l'animal. Par ailleurs, les souris seront maintenues le plus souvent dans leur environnement habituel, excepté lors des analyses du métabolisme énergétique qui nécessitent leur isolement dans des cages métaboliques qui ne comportent pas de litière. Dans ce cas, une période d'adaptation de 3 jours sera respectée et dès la fin des prélèvements les souris seront replacées dans des cages classiques (incluant litière et enrichissement). En outre, des phases de repos de 15 jours seront respectées entre les différents tests métaboliques. Les procédures mises en oeuvre impliquent un suivi régulier, notamment une pesée hebdomadaire; en cas de souffrance d'un animal, l'avis du vétérinaire sera demandé.

Réduction : Le nombre de souris utilisées dans cette étude a été calculé en tenant compte notamment de la variabilité inter-individus (élevée dans le cas de tests métaboliques) mais également pour l'application de tests statistiques adéquats (tels que t-test ou test non paramétrique de Mann Whitney). La répétition des études sera jugée nécessaire uniquement si les résultats d'une expérience ne peuvent être correctement interprétés (nombre de points mesurés trop faible).

19532 Les inflammasomes sont des complexes multiprotéiques de l'immunité qui permettent de lutter contre les infections microbiennes. Quand les gènes de l'inflammasome sont mutés, ils peuvent causer des maladies autoinflammatoires caractérisées par des épisodes récurrents d'inflammation associés à des fièvres et à des douleurs abdominales. Ces pics d'inflammation sont actuellement durs à prévoir et des facteurs endogènes pourraient contribuer à déclencher ces épisodes chez les patients présentant des mutations.

De nouvelles molécules endogènes ont été identifiées qui activent l'inflammasome et pourraient déclencher chez l'homme des pics d'inflammation. Ces molécules sont inactives sur l'inflammasome murin et nous avons donc généré des souris exprimant l'inflammasome humain par lentigénèse (utilisation de virus pour délivrer un ADN étranger dans la souris) pour étudier la pertinence physiologique de ces nouvelles molécules dans les pics d'inflammation.

3R: Les expériences décrites ici sont soutenues par des expériences préalables in vitro qui ont permis de montrer la faisabilité du projet et d'affiner le système expérimental. Ces expériences in vitro ont aussi démontré que la pertinence physiologique restait à valider in vivo dans des expériences dans des souris humanisées. Le nombre d'animaux utilisés sera réduit au maximum en se basant sur les résultats in vitro qui montrent des différences claires (de type "blanc-noir"). Les animaux ne pourront pas être ré-utilisés du fait de la mise à mort requise en fin d'expérimentation.

186 souris seront utilisées. Les principales procédures utilisées seront: le prélèvement sanguin, l'administration intraperitoneale de molécules, le suivi de la température, et le suivi de paramètres immunologiques dans le sang et la cavité péritoneale. Un sous groupe de souris sera soumis à un transfert de moelle osseuse pour limiter l'humanisation des souris pour l'inflammasome au système hématopoïétique (c'est à dire à l'ensemble des cellules issues du développement de précurseur de la moelle osseuse).

Un sous groupe des animaux devrait démontrer des signes d'inflammation aigüe qui seront limités dans le temps. Des points limites adaptés et une surveillance heure par heure des animaux permettra de raffiner les cinétiques pour maximiser les chances d'observer des phénotypes forts avec un nombre limité d'animaux.

Ce projet devrait permettre de mieux comprendre le fonctionnement de l'inflammasome et de valider une nouvelle molécule comme un contributeur des pics d'inflammation observés chez les patients leur permettant à terme de mettre en place des mécanismes d'évitement ou des thérapies ciblées.

19533 L'objectif principal de cette étude vise à caractériser l'impact d'un complément alimentaire sur les fonctions clés du tube digestif, i. e. la fonction de barrière de la muqueuse intestinale et la motricité intestinale dans un modèle murin soumis ou non à un stress (le water avoidance stress ou "stress d'évitement de l'eau"). En effet, le stress induit des altérations des fonctions intestinales (perméabilité et motricité) et mime ainsi les modifications observées chez l'homme dans des maladies telles que le syndrome de l'intestin irritable. La recherche de facteurs nutritionnels capables de renforcer la barrière intestinale et de préserver son intégrité lors d'un stress est donc un enjeu majeur pour la prévention et/ ou le traitement de cette maladie.

Ce projet sera réalisé en tenant compte du principe des 3R (Réduire, Raffiner et Remplacer). Le nombre de souris a été réduit au minimum possible tout en permettant une analyse statistique fiable (Réduire). Afin de limiter toutes sources d'angoisse et de souffrance, les souris seront conservées dans des cages de taille suffisante, et avec un accès libre à l'eau et à la nourriture. Le bien-être des souris sera surveillé tout au long de l'étude tous les jours, avec mise en place d'un enrichissement par fricotis, et en évaluant l'état général des animaux, et des points limites seront mis en place. En cas d'éventuels signes de souffrance, les animaux seront euthanasiés (Raffiner). La corrélation in vitro-in vivo n'étant pas satisfaisante, le recours à l'utilisation de modèles animaux est indispensable dans notre étude et il n'y a pas d'alternative au Remplacement. L'étude proposée se déroulera en plusieurs fois de la manière suivante : le complément alimentaire ou bien un placebo (témoin = contrôle) seront administrés aux souris par voie orale pendant 4 semaines. 5 compléments alimentaires différents seront testés au cours de ces 5 années et pour cette étude, 400 animaux (Souris C57Bl6) maximum seront utilisés.

19534 Les allergies sont très répandues au sein de notre société et ont été classées comme quatrième pathologie en termes de morbidité par l'OMS. La prévalence des allergies est en constante augmentation. Elles constituent ainsi un vrai problème de santé publique. Coûteuses, les allergies altèrent également la qualité de vie des patients. Les mécanismes en œuvre dans le développement des allergies et les causes spécifiques de l'augmentation de leur prévalence ne sont pas totalement connus. L'exposition aux composés chimiques dans l'environnement est une source de sensibilisation allergique et de sévérités des réactions. En effet, les composés chimiques incluant les pesticides sont considérés comme une véritable menace pour la santé affectant le système immunitaire humain et contribuant à l'augmentation des maladies allergiques. De plus, le concept du DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease) suggère que l'embryon, le fœtus et l'enfant (les 1000 premiers jours) sont sous l'influence constante de l'environnement au sein duquel ils se développent. Les polluants peuvent passer de la mère à l'enfant au cours de la période périnatale, créant une « empreinte développementale ».

En France, la prévalence des allergies est estimée à 25-30% chez les enfants et est plus élevée en raison de l'immaturation de leur système immunitaire, leur microbiote et leur barrière intestinale. Cette immaturité au cours de la période périnatale est une cible pour les composés toxiques. De plus, les allergies les plus communément trouvées chez l'enfant sont les allergies alimentaires (8%),

l'eczéma (10%) et l'asthme (10%) et ces maladies coexistent souvent. Il est maintenant bien établi qu'une allergie alimentaire dans l'enfance augmente le risque de développer un asthme plus tard et la progression en séquence de cette maladie est appelée la marche atopique. L'objectif de ce projet est donc de déterminer si une exposition périnatale à un mélange de pesticides à faible dose (dose journalière tolérable) peut impacter la progression de la marche atopique. Ce travail nous permettra de déterminer l'effet sur le métabolisme d'un mélange de pesticides, composé de boscalid, captan, chlorpyrifos, thiofanate, thiocloprid et ziram. Nous voulons déterminer si un mélange de pesticides a un effet sur la sensibilisation et/ou la sévérité de l'allergie alimentaire et de l'asthme et ainsi déchiffrer les facteurs et les mécanismes à l'œuvre notamment au cours de la période périnatale. La recherche dans ce domaine implique l'utilisation de modèles animaux d'allergie alimentaire et respiratoire. Ainsi l'utilisation de souris est nécessaire pour étudier de façon optimale la réaction in vivo. Pour mener à bien ce projet, nous utiliserons 810 souris reproductrices, dont 540 femelles reproductrices et 270 mâles reproducteurs divisés en trois groupes : une étude du suivi physiologique (180 femelles + 90 mâles = 80 souris femelles et 80 souris mâles), une étude du suivi immunologique (180 femelles + 90 mâles = 80 souris femelles) et une étude du microbiote (180 femelles + 90 mâles = 80 souris femelles). Nous espérons donc obtenir 320 souris en tout. Au cours de cette étude, le principe des 3R sera appliqué afin de réduire (estimation d'un nombre minimum de souris à analyser en fin de protocole pour être statistiquement robuste, notre expérience en reproduction animale nous permet de réduire au minimum nécessaire le nombre de couple reproducteur ; les organes non utilisés des souris contrôles pourront être utilisés pour la mise au point d'autres protocoles), remplacer ou perfectionner l'utilisation de l'expérimentation animale. Il est en effet impossible de reproduire efficacement les systèmes biologiques très complexes et en particulier le système immunitaire uniquement par des systèmes in vitro ou in silico. Dans l'allergie, de nombreuses cellules immunitaires sont impliquées, telles que les lymphocytes ou les cellules épithéliales et leurs interactions ont un rôle fondamental dans le développement de la maladie. Ainsi, l'expérimentation animale est un élément essentiel de ce projet afin de modéliser efficacement la réponse physiologique globale du système. Cependant, chaque fois que possible, les études sur les animaux seront réduites grâce à l'utilisation de modèles in vitro. Le modèle animal utilisé a été soigneusement conçu et évalué pour fournir des informations pertinentes pour une application future à l'homme. Ce modèle est bien établi et possède l'avantage de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés du fait de la connaissance et de la précision des paramètres étudiés. Enfin, seul le personnel qualifié et expérimenté participera à l'expérimentation animale. Ces exigences visent à s'assurer que les expériences seront effectuées efficacement et afin de minimiser la souffrance de l'animal. Le nombre d'animaux estimé dans ce protocole est suffisant pour justifier d'une pertinence scientifique et a été réduit au maximum. Les animaux seront logés dans un environnement adapté avec une humidité relative et une température contrôlée et bénéficieront d'enrichissements.

19535 Le muscle squelettique permet le déplacement du squelette et est responsable de tous nos mouvements comme par exemple, se tenir debout, maintenir la tête droite et respirer. Des blessures musculaires se produisent très fréquemment pendant le sport. La capacité de régénération du muscle squelettique diminue avec l'âge, résultant en une perte de la masse, de la qualité et de la force musculaire. En outre, il existe de nombreuses myopathies affectant sérieusement la qualité de vie des patients. Par conséquent, il est extrêmement souhaitable de comprendre davantage les mécanismes de régulation de la régénération musculaire et d'identifier les moyens permettant de les améliorer.

Notre but est d'identifier les mécanismes potentiels qui permettent d'améliorer le processus de régénération musculaire. Nous souhaitons déterminer le rôle de la sénescence dans la régénération musculaire. Ce projet pourra également être bénéfique pour les patients atteints de myopathie ou de sarcopénie.

La guérison de lésions musculaires (régénération) est un processus complexe qui requiert les efforts de différents tissus, y compris le système immunitaire. Ainsi pour modéliser précisément les

dynamiques et les capacités de régénération du muscle, les expériences requièrent d'être réalisées in vivo. La souris est une espèce régulièrement utilisée pour l'étude de la réparation des lésions musculaires car elle présente l'avantage d'avoir une organisation similaire à celle de l'être humain. De plus, la durée de vie d'une souris est de deux ou trois ans, ce qui est utile pour étudier des processus physiologiques tel que la régénération musculaire chez les individus âgés. Enfin, il existe de nombreux modèles de souris génétiquement modifiées mimant les altérations existantes dans les pathologies humaines (comme par exemple le modèle de souris Dmdmdx- β geo mimant la myopathie de Duchenne).

Nous utiliserons quatre modèles de souris différents et les protocoles qui seront utilisés dans ce projet ont été bien établis et publiés. Nous essayerons également d'éliminer les cellules sénescents grâce à l'utilisation de drogues spécifiques. Ces drogues seront délivrées aux souris par gavage ou par injection, classant ces procédures expérimentales en sévérité modérée. Les drogues ont déjà été utilisées dans le laboratoire et ne semblent pas induire de dommages particuliers aux animaux. Aucun de ces protocoles n'a montré d'effets indésirables sévères sur les souris et nous utiliserons un anesthésique et un analgésique appropriés pour éviter que les animaux ne souffrent. Si les animaux impliqués dans les expériences venaient à souffrir, ils seraient mis à mort par exposition au CO₂ et les échantillons collectés seront utilisés pour une analyse histopathologique. Le projet comporte 9 procédures de sévérité modérée et une procédure de sévérité légère.

L'ensemble de ce projet nous permettra de mieux comprendre la régénération du muscle squelettique et son aptitude à être régénéré aussi rapidement après blessure. Les cellules sénescents ont un rôle bénéfique lorsqu'elles agissent de manière transitoire dans un tissu. Cependant, leur accumulation est connue pour être néfaste, créant un environnement pro-inflammatoire via les molécules qu'elles sécrètent. Nous pensons que l'accumulation des cellules sénescents, mal éliminées lors de pathologie musculaire chroniques, pourrait avoir un effet délétère dans le tissu musculaire.

Au total, 440 souris seront utilisées pour la totalité du projet qui comprendra 9 procédures de sévérité modérées et une procédure de sévérité légère. Les effectifs dans chacune des procédures ont été ajustés sur des bases statistiques afin de les réduire tout en assurant une puissance suffisante.

19536 En raison de sa fonction de barrière thermorégulatrice et immunitaire, la peau est un organe indispensable à la survie de l'organisme. Lors d'agressions importantes, telles qu'une brûlure du troisième degré, la peau n'est plus capable de cicatriser spontanément et induit un déséquilibre physiologique parfois mortel. La prise en charge des victimes de brûlures sévères se base sur l'utilisation d'autogreffe de peau ou dans les cas les plus graves de substituts cutanés. Pourtant, malgré leur utilisation courante, ces solutions sont limitées par la variabilité de la prise de greffe, leur fragilité, leur coût et les séquelles esthétiques et fonctionnelles qui en découlent.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'efficacité d'une injection en sous-cutanée d'une suspension de Cellules Stromales Mésoenchymateuses (CSM) pour l'amélioration du traitement des brûlures cutanées par autogreffe de peau expansée. Nous testerons dans un deuxième temps si cette efficacité est conservée lorsque l'on utilise uniquement les produits sécrétés par ces cellules. Nous espérons que cette thérapie cellulaire améliorera la prise de greffe et la qualité de la cicatrisation après greffe en termes de re-vascularisation, de remodelage matriciel et d'inflammation. Pour mener à bien ce projet, un modèle de brûlure cutanée standardisée chez le rat, associée à une greffe de peau sera développé. L'idée est de reproduire la stratégie de prise en charge thérapeutique d'un grand brûlé dans le cadre de l'utilisation de CSM en tant que traitement adjuvant des autogreffes expansées.

Malgré l'existence de modèles d'études de réparation cutanée impliquant des cultures de cellules, les mécanismes physiopathologiques mis en jeu après une brûlure in vivo diffèrent de ceux induits en laboratoire. Par exemple, le test de blessure in vitro est biaisé par la structure bi-dimensionnelle du test et par l'utilisation d'un substrat de culture plastique. Les modèles de brûlure ex vivo qui reproduisent plus fidèlement l'environnement structurel et moléculaire de la peau sont eux limités

par l'absence de mécanismes de coagulation, d'inflammation et de réponse métabolique. L'utilisation d'un modèle d'étude chez l'animal est donc nécessaire pour rendre compte de la complexité de la réparation tissulaire et atteindre les objectifs du projet.

Pour réduire le nombre d'animaux utilisés dans ce projet, différentes étapes de mise au point successives seront effectuées avec des étapes conditionnelles aux résultats précédemment obtenus. Même si 10 animaux ont été assignés à chaque groupe expérimental, tous ne seront pas nécessairement utilisés. En effet, nous n'utiliserons que 6 animaux par groupe, et ne prendrons les 4 autres que si la puissance statistique n'est pas assez grande pour atteindre des résultats statistiquement significatifs. Ainsi nous estimons nos besoins entre 168 et 277 rats Wistar selon les résultats obtenus.

Le bien-être des animaux sera assuré par l'utilisation de moyens d'enrichissement du milieu de vie des animaux (abris, jeux à ronger), une visite quotidienne et un suivi analgésique avant, pendant et après les chirurgies. Une grille de suivi des animaux est mise en place et des points limites ont été définis afin de réduire la souffrance animale.

19537 En chirurgie humaine (orthopédique ou dentaire), lorsqu'une intervention nécessite le comblement d'un déficit osseux, l'utilisation d'un biomatériau permet de simplifier les procédures en évitant aux patients une étape de prélèvement d'os au niveau d'un second site, sain. En effet, certaines approches thérapeutiques (ablations de tumeurs, de kystes, de foyers infectieux...) peuvent aboutir à des pertes de substances osseuses importantes que les processus naturels de réparation tissulaire sont incapables de reformer. La reconstruction de l'os doit alors être assistée. La technique de référence consiste à prélever ailleurs dans le corps du patient un fragment de tissu osseux qui sera utilisé afin d'aider la réparation de l'os lésé. On parle alors d'autogreffe. L'autogreffe n'induit pas de réaction immunitaire puisque le tissu est celui du patient ; elle présente néanmoins trois limites majeures : elle suppose deux interventions (prélèvement puis greffe); la quantité de greffon est limitée et la survie des cellules transplantées est faible. Une autre solution consiste à utiliser des biomatériaux. La recherche autour des matériaux à finalité médicale permet l'émergence de produits de plus en plus efficaces qui permettent d'étendre les indications chirurgicales et d'améliorer les résultats obtenus. L'utilisation de biomatériaux pour favoriser le retour à la fonction tissulaire nécessite une connaissance approfondie du comportement de ces derniers dans l'organisme receveur. Aussi leur implantation in vivo est un prérequis indispensable à leur utilisation clinique. Cette implantation permet de prendre en considération l'intégralité des réactions de l'hôte vis-à-vis de biomatériaux, les études in-vitro préalables ne permettant que de suggérer leur potentiel thérapeutique et/ou leur innocuité. La complexité des systèmes physiologiques mis en place et leur intégration ne permet pas l'utilisation de méthodes alternatives. Afin d'évaluer au mieux les paramètres physiologiques entrant en jeu lors de l'implantation de biomatériaux nous proposons d'utiliser une technique de comblement osseux dont les objectifs sont d'étudier la réparation de l'os à l'aide de biomatériaux injectables. Cette technique, largement décrite dans la littérature, consiste à réaliser, après réalisation d'un accès chirurgical, un forage osseux au niveau du fémur de l'animal qui est comblé par les biomatériaux à l'image des techniques cliniques couramment employées en chirurgie régénératrice humaine. La plaie est ensuite suturée. Cette procédure chirurgicale osseuse, bien que présentant un risque de décès peropératoire comme toute intervention, présente l'avantage d'être moins lourde que d'autres modèles couramment utilisés (membrane induite par exemple) et permettra ainsi de réduire les risques de dommages per- et post-opératoires, quels qu'ils soient. Il est alors possible d'évaluer cliniquement et histologiquement la qualité et la quantité de l'os régénéré. Afin d'obtenir des résultats exploitables scientifiquement en utilisant le nombre le plus faible d'animaux, 45 rats seront nécessaires. L'ensemble des expérimentations sera réalisé dans le respect des textes réglementaires relatifs à la protection et à l'utilisation des animaux de laboratoire. Le projet s'inscrit dans une démarche éthique suivant la règle des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer) en optimisant les conditions de vie, d'hébergement et de soins des animaux et en tenant compte de la sensibilité des animaux ainsi que des contraintes liées à l'espèce. Cette étude est planifiée sur 2 ans. L'étude sera réalisée de façon à réduire au maximum le nombre d'animaux employés en arrêtant l'expérimentation dès que des résultats statistiquement significatifs seront

obtenus et en nous assurant de la faisabilité de l'obtention de ces résultats à mi-parcours. Ce projet tient compte de points limites spécifiquement édictés et prend en compte la prévention et le traitement des éventuelles douleurs et inconforts qui pourraient apparaître, et de favoriser le bien-être des animaux tout au long de leur vie. Les dommages escomptés pour l'animal pourraient consister en un inconfort transitoire à la marche ainsi qu'en une douleur modérée transitoire au niveau de la zone opérée. Ainsi, des visites régulières seront mise en place de façon à réaliser un examen clinique permettant de détecter au plus tôt tout éventuel signe d'inconfort et le traiter si besoin. Il pourrait résulter de ces études de nouvelles pistes de développement de nouveaux biomatériaux ainsi qu'une augmentation des connaissances en liens avec leur utilisation.

19538 Cette série de travaux pratiques a vocation d'enseigner les bonnes pratiques en expérimentation animale sur modèle rongeur (contention, préhension, prélèvement, analgésie, soins ...) dans le but de minimiser les contraintes exercées aux animaux.

Cet enseignement est dispensé pour des formations spécifiques destinées aux personnes concevant ou appliquant des procédures chirurgicales. Il prend place dans la réglementation (Directive 2010/63/UE Article 23 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques) qui définit l'adéquation des compétences du personnel par rapport à la fonction exercée et délivre une attestation valable pour le suivi des compétences.

Les stagiaires mettront en pratique les notions abordées lors des cours théoriques qui précèdent les 5 travaux pratiques. Ils réaliseront les différentes étapes d'apprentissage sous la supervision d'un ou deux encadrants.

Ce projet regroupe les 5 travaux pratiques abordés lors de cette formation, et pour rendre le contenu plus lisible chacun est détaillé dans une procédure.

On estime le nombre maximum de 92 rats et 40 souris qui seront utilisés pour tous les TP pendant la durée totale du projet (2 ans) soit 4 sessions de formation. Ce chiffre est un chiffre maximum et peut varier à la baisse en s'adaptant au nombre de stagiaires.

Cet enseignement s'inscrit dans la démarche des 3R :

- Remplacement :

Nous utilisons également une alternative à l'utilisation d'animaux vivants pour ces travaux pratiques. Les techniques de sutures sont réalisées sur de la peau de cochon issu de l'industrie alimentaire (couenne, oreille, pied) pour lesquelles nous n'utilisons pas d'animaux vivants.

- Réduction:

Le nombre de rongeurs utilisés est calculé au plus juste (un animal par binôme/trinôme de stagiaires) et la quantité est toujours adaptée au nombre de stagiaires. Nous utiliserons si possible des rongeurs adultes issus de l'élevage standard (animaux dit de réforme) dont le devenir est la mise à mort dans le but de ne pas produire d'animaux destinés exclusivement à la réalisation de ces travaux pratiques.

- Raffinement :

Une attention toute particulière est portée pour la diminution des contraintes exercées aux animaux.

19539 La leucémie aigüe promyélocytaire (LAP) est un cancer du sang déclenché par une anomalie génétique caractérisée par la présence d'une protéine anormale (PML/RARA), qui est nécessaire et suffisante pour déclencher la maladie.

Les traitements actuellement utilisés sont une combinaison de deux molécules qui entraînent la destruction de la protéine anormale et l'éradication définitive de la maladie.

Notre projet s'articule autour de la caractérisation des événements en amont et en aval de la dégradation de cette protéine, afin d'identifier des mécanismes qui pourraient être activés dans d'autres types de cancer. Pour cela nous allons développer de nouveaux modèles de souris dans lesquels le gène codant la protéine PML sera inactivé ou modifié. Ces mutants du gène Pml ont déjà été caractérisés et validés in vitro en culture cellulaire. Malheureusement, ces modèles

cellulaires ne récapitulent pas toute la réponse physiopathologique. Des explorations in vivo sont donc à ce stade devenues indispensables pour appréhender la réaction d'un organisme entier et pour éprouver nos hypothèses en situation physiologique, en se rapprochant de celle retrouvée chez le patient.

Pour mener à bien ce projet d'une durée de 5 ans, nous allons produire 9 nouveaux modèles de souris génétiquement altérées, 7 modèles pour le gène Pml et 2 modèles pour deux gènes partenaires de Pml, tous ayant été validés in vitro. Cette création de modèle implique l'utilisation de souris femelles recevant un traitement hormonal (injection intra-péritonéale sur souris non anesthésiée n'entraînant pas de douleur supérieure à la piqure d'aiguille) permettant la production d'un grand nombre d'embryons et limitant ainsi le nombre de femelles « donneuses d'embryons ». Deux jours après le traitement, ces souris seront euthanasiées et les embryons (au stade 1 cellule) prélevés puis génétiquement modifiés par des techniques de biologie moléculaire avant d'être réimplantés dans l'appareil reproducteur de souris femelles « mère porteuses ». Cette étape de réimplantation se fait par une technique chirurgicale nécessitant une anesthésie générale des souris « mères porteuses », une analgésie adaptée (injection sous-cutanée pré-opératoire) et un suivi quotidien du bien-être des animaux. Après les 3 semaines de gestation des « mères porteuses », nous attendons la naissance des souriceaux génétiquement altérés. Les souris ainsi générées seront caractérisées par un suivi de leur apparence globale, de leur croissance, de l'aspect du pelage, de leur comportement afin de déterminer si l'altération génétique entraîne un phénotype anormal ou non sur le bien-être de ces animaux. Après cette étape de création de modèles de souris porteuses de formes modifiées du gène Pml ou de formes modifiées de partenaires de Pml, nous analyserons l'impact du stress oxydant (agression des cellules par des radicaux libres) par administration de molécules induisant ce stress ou par irradiation sur corps entier (rayons X). Les molécules chimiques seront administrées par voie intra-péritonéale (piqure non douloureuse dans l'abdomen de la souris éveillée) ou dans l'eau de boisson. L'irradiation sera réalisée avec un équipement spécifique permettant d'exposer les souris à des rayonnements X (souris éveillées placées dans une boîte spécifique contenant de la litière; procédure durant une vingtaine de minutes).

Ce projet respecte la règle des 3R (remplacement, réduction, raffinement).

Remplacement: L'usage des souris dans ce projet est essentiel car les tests in vitro déjà réalisés ne permettent pas de récapituler l'ensemble des interactions cellulaires au cours du développement de la LAP.

Réduction: Nous nous attacherons à limiter au minimum le nombre de souris utilisées, tout en s'assurant d'obtenir des données statistiquement interprétables. Pour la durée du projet (5 ans), nous utiliserons 2650 souris réparties de la manière suivante:

Pour la génération des 9 nouveaux modèles d'étude, 522 souris seront nécessaires :

- 135 souris « donneuses d'embryons », 135 souris « mères porteuses » pour la génération des 9 nouvelles lignées de souris présentant des mutations sur le gène Pml.
- 252 souris pour la caractérisation des souris génétiquement altérées qui se fera sur 2 générations (moitié de mâles et moitié de femelles).

L'impact du stress oxydant (agression des cellules par des radicaux libres) par administration de molécules induisant ce stress ou par irradiation sur corps entier (rayons X) nécessitera 2128 souris. En effet, les analyses après administration de molécules chimiques seront faites sur 1848 souris [4 femelles + 4 mâles de chaque lignée x 7 conditions x 11 lignées murines (9 nouveaux modèles murins comparés à des souris ayant le gène Pml normal ou n'exprimant pas ce gène) x 3 expériences indépendantes = 1848]. Le test de l'effet de l'irradiation nécessitera quant à lui 280 souris [10 femelles + 10 mâles de chaque lignée x 7 lignées murines x 2 expériences indépendantes = 280].

Raffinement: Une attention toute particulière sera portée sur le bien-être des animaux par une surveillance journalière qui sera assurée par le personnel de l'animalerie, en complément à celle des expérimentateurs. De plus, les souris seront placées dans des cages avec des enrichissements (rouleaux en carton, coton, buchettes de bois...) qui leur permettent d'exprimer leurs

comportements naturels. Chaque semaine, une grille d'évaluation des signes cliniques sera renseignée (aspect des souris, comportement, blessures, poids). Lorsque les souris présenteront une souffrance et/ou une douleur mise en évidence par une modification comportementale et/ou physique, une analgésie sera administrée et si aucune amélioration n'est observée, les souris seront euthanasiées. Cette évaluation sera quotidienne dans le cas des études sur l'effet du stress oxydant. Dans le cas des protocoles d'irradiation, les souris seront observées 3 fois par jour avec un suivi clinique quotidien.

L'ensemble des souris (2650 souris) inclus dans ce projet sera surveillé quotidiennement par le personnel de l'animalerie, en complément de celle des expérimentateurs, selon des grilles d'évaluation permettant d'évaluer le bien-être des animaux. Lorsqu'une souris atteint un point limite préalablement défini, elle sera euthanasiée. Tous les animaux seront euthanasiés au plus tard à l'âge de 18 mois.

19540 Le métabolisme est une fonction cellulaire fondamentale de la vie et son dysfonctionnement provoque des maladies humaines courantes comme l'obésité ou le diabète. Il est aussi impliqué dans des maladies hépatobiliaires plus rares qui se manifestent très tôt chez l'enfant comme l'atrésie des voies biliaires. Malgré tous les efforts scientifiques leurs mécanismes ne sont pas complètement déchiffrés ce qui empêche le développement de traitements efficaces tant dans les maladies chroniques que dans les maladies rares du métabolisme. Il y a donc un besoin de connaissances fondamentales dans le domaine du contrôle métabolique au niveau cellulaire ainsi que dans les différents organes et leur intercommunication. Afin de répondre à ce besoin nous étudions une voie de signalisation qui contrôle le métabolisme et qui est conservée dans tous les organismes vivants.

Dans ce projet nous allons créer de nouveaux modèles animaux pour générer des connaissances sur le rôle physiologique de cette voie de signalisation. Ces modèles permettront d'inactiver génétiquement ou par un inhibiteur pharmacologique une protéine centrale pour cette voie dans des organes clés pour l'homéostasie métabolique : muscles, foie, tissu adipeux. Nous utiliserons des souris de différents âges et sexes afin de comprendre comment l'inactivation de cette voie de signalisation affecte les paramètres métaboliques dans différents organes au cours du cycle circadien, lors du vieillissement et lors d'un challenge métabolique physiologique comme le jeûne. L'inactivation de cette voie lors du développement embryonnaire permettra l'étude de son implication dans le métabolisme hépatobiliaire ce qui ouvrira de nouvelles pistes thérapeutiques pour soigner l'atrésie des voies biliaires.

Dans ce projet, le respect de la règle des 3R est assuré par les procédures mise en œuvre. Pour réduire le nombre d'animaux utilisés nous analyserons différents organes et des paramètres multiples chez chaque animal. Pour le remplacement nous générerons des cellules primaires pour des études in vitro. Pour le raffinement, les souris seront hébergées dans des cages enrichies en carrés de cotons et de nids afin d'assurer leur bien-être. Des points limites seront établis entraînant l'euthanasie de l'animal si nécessaire. Dans le cas d'une procédure entraînant une douleur nous utiliserons l'anesthésie générale afin de réduire la souffrance de l'animal. Enfin, nous ne pouvons pas remplacer le modèle animal car il est nécessaire pour étudier la communication cellulaire entre différents organes et le métabolisme global d'un organisme. Ce projet de 5 ans utilisera 3967 souris.

En conclusion, ce projet a le potentiel d'inclure les nouvelles connaissances acquises sur la signalisation cellulaire et le métabolisme global d'un organisme pour mieux comprendre les maladies humaines et ouvrir la voie à des traitements innovants.

19541 Une allergie alimentaire est une réaction exagérée du système immunitaire vis-à-vis d'un aliment, en principe sans danger pour l'homme. Dans la plupart des cas, l'allergie s'exprime dans les minutes qui suivent l'exposition. Elle se présente sous différentes formes : digestives, cutanées, respiratoires. Sa forme la plus grave appelée choc anaphylactique débute souvent par une sensation de malaise, avec des démangeaisons et une gêne respiratoire. Sans intervention médicale immédiate, peut survenir une perte de connaissance associée à une chute de tension pouvant aller jusqu'à l'arrêt cardiaque. Les aliments impliqués dépendent des habitudes de

consommation et de l'âge des patients. Le lait est le premier aliment incriminé chez l'enfant. L'allergie au lait de vache est très fréquente (5 à 6 % des enfants en France) et guérit spontanément dans la majorité des cas vers 3 ans. Pour les patients non guéris, la seule solution face au risque vital est l'éviction stricte des aliments contenant du lait. Respecter ce type de régime est très contraignant car le lait est extrêmement utilisé dans notre alimentation courante. L'allergie à l'œuf est la seconde allergie après celle du lait chez les jeunes enfants. Comme l'allergie au lait, elle disparaît vers l'âge de 5 ans chez 70% des allergiques. L'allergie à l'arachide est une pathologie qui touche près de 1% de la population, notamment les enfants. Il faut savoir que contrairement à l'allergie au lait, cette allergie perdure même à l'âge adulte pour 80% des personnes allergiques. Il existe également des allergies non alimentaires, comme par exemple l'allergie aux acariens. Elle se traduit par des éternuements, une conjonctivite, une dermatite atopique. Ces symptômes peuvent être atténués par la prise d'un antihistaminique accompagné d'un nettoyage efficace des tissus.

Chez la souris, comme chez l'homme, le développement de la maladie allergique se déroule en deux étapes : la sensibilisation (étape asymptomatique), qui correspond à la fabrication d'anticorps de type IgE en réponse à l'exposition à un allergène, et la seconde étape est l'allergie proprement dite où la rencontre avec l'allergène provoque des symptômes cliniques plus ou moins sévères.

Le but de ce projet est de mettre au point un protocole de désensibilisation de différentes allergies. Pour cela, nous disposons d'une technologie qui permet d'identifier des protéines, qui une fois injectées permettent de produire des anticorps spécifiques et efficaces. De tels anticorps seraient capables de neutraliser les allergènes avant de provoquer une réaction allergique chez le patient. Nous souhaitons vérifier cette hypothèse dans des modèles d'allergies alimentaires (lait, arachide, œuf) mais aussi dans un modèle d'allergie aux acariens.

Pour cette étude, 648 souris Balbc seront utilisées. Pour chaque allergie, quatre protéines ont été identifiées. Chaque groupe de souris recevra une protéine de désensibilisation. L'injection de cette protéine entraînera la production d'anticorps spécifiques et nous souhaitons vérifier que ces anticorps sont capables de désensibiliser les souris.

Procédures : Toutes les souris seront identifiées par une bague à l'oreille. En fonction du modèle d'allergie, elles seront sensibilisées par voie intragastrique, intranasale ou intrapéritonéale. Plusieurs prélèvements sanguins seront effectués afin de récolter du sérum dans lequel se trouvent les anticorps. Les souris subiront une provocation de l'allergie afin de vérifier que la sensibilisation a été efficace. Les souris seront ensuite désensibilisées et à nouveau provoquées pour vérifier que la désensibilisation a été efficace. Lors des provocations des allergies, plusieurs paramètres sont enregistrés, la température corporelle, la fréquence respiratoire et la fréquence cardiaque.

Conditions d'hébergement : Les souris seront hébergées par groupe de 6 souris dans des cages adaptées, elles auront accès à l'eau et la nourriture. Les cages seront enrichies une semaine avec un tunnel, puis une semaine avec un igloo en plastique rouge transparent. La production d'anticorps ne peut pas être étudiée in vitro (remplacement), et le nombre de souris prévues pour ce protocole est nécessaire et suffisant pour pouvoir exploiter toutes les pistes (réduction). L'injection de protéines modifiées pour induire des anticorps spécifiques a déjà fait l'objet d'études chez les souris Balbc, et tout sera mis en œuvre pour assurer leur bien-être (raffinement). Les souris seront maintenues dans un cycle jour/nuit de 12h à une température et une hygrométrie comprise entre 20 et 24°C, 35 et 75% d'humidité. Un contrôle visuel sera effectué tous les jours. En cas de piloérection, blessure non soignable, perte de poids >15% en 2 jours, difficultés à respirer, perte d'équilibre, déplacements circulaires ou difficiles, tremblements, les souris seront mises à mort par une méthode réglementaire. Nous disposons d'une animalerie, où les souris seront hébergées dans un box dédié qui est séparé des salles d'expérimentations par un couloir.

19542 L'accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique est une pathologie neurologique survenant après l'occlusion d'une artère irriguant le cerveau. Cette pathologie est la 3ème cause de mortalité et la première cause de handicap acquis chez l'adulte dans le monde. En France, cent trente mille nouveaux cas sont répertoriés par an. L'AVC pose donc un problème majeur tant dans le domaine de la santé publique que sur le plan humain. Actuellement, la prise en charge des patients à la

phase aiguë de l'infarctus cérébral est réalisée par l'injection intraveineuse de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) associée ou non à la thrombectomie. Toutefois, seule une faible proportion des patients (<10%) peut être traitée du fait des effets secondaires de l'injection de tPA et de la relative difficulté d'accès à la thrombectomie. Ainsi, il paraît indispensable de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques innovantes visant à traiter efficacement cette pathologie.

L'objectif de ce projet est de tester cinq stratégies thérapeutiques par 3 voies d'administrations différentes afin d'étudier la diminution des volumes lésionnels ainsi que l'augmentation de la récupération fonctionnelle après un AVC. Pour cela, ces stratégies thérapeutiques seront étudiées à l'aide d'un modèle d'infarctus cérébral qui reproduit au mieux la physiopathologie de l'AVC permettant une meilleure transposabilité des résultats obtenus vers la clinique. Ainsi, l'AVC sera induit sur des souris Swiss (*Mus musculus*) mâles âgées de 10 semaines et souris C57Bl6J mâles du même âge, en utilisant le modèle d'AVC thromboembolique dont le principe repose sur l'injection d'un agent coagulant (la thrombine) directement dans la lumière artérielle. Ce modèle est aujourd'hui très bien caractérisé chez la souris et toutes les procédures seront organisées afin de se conformer à la règle des 3R, ainsi toutes les manipulations douloureuses seront réalisées sous anesthésie générale avec couverture analgésique pour éviter toutes douleurs, souffrances et angoisses. De plus, les données de la littérature ainsi qu'une étude de puissance statistique en amont permettent de nous assurer que nous utiliserons le nombre minimal d'animaux pour pouvoir conclure d'un effet ou non de notre stratégie thérapeutique. Le suivi de la récupération fonctionnelle pour chaque traitement sera réalisé sur 3 modes d'administration différents pour 10 animaux par méthodes d'administration (+ 10%). Soit un total de 990 souris pour l'étude complète (495 souris SWISS et 495 souris C57BL6J).

Cette étude, ayant recours à l'expérimentation animale, prend en compte le bien-être animal et les pratiques éthiques, et répond à la règle des 3 Rs. Ce projet correspond à l'étape de validation in vivo qui fait suite aux nombreuses validations réalisées in vitro, et ne nous permet pas d'utiliser d'autres moyens que de tester cette stratégie thérapeutique chez l'animal. L'ensemble des connaissances et des acquis dont nous disposons dans la littérature font que la souris est un modèle préférentiel pour mener à bien ce projet. En effet, la souris est une des espèces animales la plus étudiée dans le domaine de l'AVC ce qui permettra une analyse comparative et critique des résultats obtenus.

Les expériences seront réalisées par du personnel qualifié en respectant les règles de bonnes pratiques de laboratoire pour le respect des animaux, tout en veillant à ne pas dépasser les points limites fixés au préalable. Le bien-être des animaux sera suivi bi-quotidiennement par du personnel qualifié 5j/7 et quotidiennement pendant les week-ends et jours fériés et cela pendant toute la durée du projet. Les animaux seront hébergés dans des cages standards répondant aux normes européennes actuelles (Directive 2010/63/UE). Pour éviter de stresser les animaux, les cages seront isolées de tout bruit extérieur et l'accès à l'eau et à la nourriture sera ad libitum. Enfin, une importance particulière sera apportée au bien-être des animaux. Tout sera mis en œuvre pour réduire l'anxiété, la souffrance et la douleur de chaque animal, pouvant être occasionnées pendant le projet. Les principes éthiques et les standards de raffinement seront utilisés jusqu'à la mise à mort de l'animal.

19543 La prise de décision est une fonction cérébrale complexe qui consiste à faire un choix entre plusieurs options pour sélectionner la plus avantageuse. Jusqu'à présent, les tâches utilisées pour étudier la prise de décision chez le primate non-humain (PNH) consistent à effectuer des mouvements de pointage pour sélectionner des cibles qui sont présentées sur un écran faisant face à l'animal. Inversement chez le rongeur, l'animal doit se déplacer dans un labyrinthe et choisir entre différentes directions. Ainsi pour étudier un même processus les PNHs utilisent principalement leur mémoire procédurale alors que les rongeurs utilisent sa mémoire spatiale.

Le projet proposé à deux objectifs:

1/ développer une tâche pour étudier la prise de décision chez le PNH qui fait appel à la mémoire spatiale

2/ caractériser les mécanismes neuronaux/cérébraux impliqués dans les processus décisionnels faisant appel à la mémoire spatiale.

Dans notre tâche, l'animal se déplace dans un labyrinthe qui possède deux bras distincts (droit et gauche), différenciés par des symboles distincts qui prédisent différents niveaux de récompense attractive (compote/grenadine). Sur la base de ces symboles, l'animal doit pénétrer dans le bras lui offrant la récompense la plus avantageuse. Une fois la tâche apprise par l'animal, nous perturberons et enregistrerons l'activité normale du cerveau pour identifier les régions cérébrales et les mécanismes neuronaux impliqués dans ces processus décisionnels.

Cette étude sera réalisée sur 6 primates, correspondant au nombre d'animaux qui permet d'atteindre un équilibre en reproductibilité des résultats et réduction du nombre d'animaux, d'espèce *Macaca Mulatta*. Dans ce projet, le suivi longitudinal des animaux permet d'obtenir beaucoup de données avec peu d'individus. De plus, chaque animal étant son propre contrôle, cela nous permet de limiter le nombre d'animaux nécessaire. Le choix de cette espèce s'explique par le fait que l'anatomie et fonctionnement de son cerveau sont proches de ceux de l'homme et que son sens prédominant est la vision, ce qui disqualifie le recours aux rongeurs. De plus, le PNH possède un répertoire comportementale complexe et proche de celui de l'homme, ce qui est indispensable pour étudier des processus cérébraux complexes tel que la prise de décision. Les déficits de prise de décision sont classiquement observés chez les patients souffrant de la maladie de Parkinson (ou de troubles obsessionnels compulsifs). Ainsi, une meilleure compréhension des mécanismes neuronaux de la prise de décision sont essentiels et devrait permettre de développer à terme de nouvelles approches thérapeutiques. Les animaux utilisés dans cette étude seront hébergés ensemble dans une structure spécialement agréée pour l'hébergement et l'utilisation des primates en recherche, disposant d'équipements et de protocoles adaptés au raffinement du milieu pour cette espèce (nourriture variée, fruits et légumes de saison, « jouets », fonds sonore, etc.) , Pour s'assurer au mieux du bien-être de ces animaux, leur état de santé sera évalué quotidiennement par le personnel compétent, sur des critères comme la posture de l'animal, son activité, son interaction, sa nutrition etc. Enfin, pour limiter le stress des animaux, des stratégies d'habituation seront mises en place pour qu'ils participent activement et volontairement aux différentes procédures

19544 La résistance aux antibiotiques est aujourd'hui l'une des menaces pesant sur la santé mondiale. De nouvelles stratégies doivent être mises en œuvre pour lutter contre les infections bactériennes. L'une des alternatives actuelles est l'utilisation de probiotiques de nouvelle génération.

Les salmonelloses sont des infections gastrointestinales qui peuvent causer des infections généralisées ayant des conséquences graves pour les patients. Dans un modèle de culture cellulaire mimant un intestin, nous avons identifié l'effet bénéfique de *Bacteroides fragilis* (*B. fragilis*), une bactérie normale du tube digestif, dans la prévention du passage au travers de l'intestin à partir de l'intestin d'une bactérie pathogène, *Salmonella* Heidelberg. Cette observation suggère que *B. fragilis* pourrait limiter la sévérité des infections à salmonelle. Nous avons aussi mis en évidence que la production de molécules par *B. fragilis* pourrait participer à la défense contre salmonelle.

Notre projet est de valider cet effet in vivo dans un modèle murin. Nous déterminerons d'abord la dose de bactéries à administrer par voie orale optimale pour mimer une infection par salmonelle dans nos conditions, ainsi la dose la plus haute, bien tolérée de *B. fragilis*. Dans un second temps, nous traiterons des animaux recevant la salmonelle avec *B. fragilis*, ou les éléments produits par ces bactéries dans leur milieu de culture, pour prévenir la sévérité de l'infection à salmonelle. Nous jugerons de l'efficacité par l'analyse du nombre de bactéries retrouvées dans l'organisme. Cent vingt souris BALB/C femelles seront étudiées au total dans ce projet pour établir la "preuve de concept in vivo", et s'inscrit dans les axes de recherche du laboratoire.

Ce protocole est prévu pour répondre à la règle des 3R.

- Remplacer : l'étude de l'impact de *B. fragilis* sur la sévérité des infections à salmonelle nécessite d'avoir recours à l'animal entier.

- Réduire le nombre de souris en réalisant le protocole sur le nombre d'animaux strictement nécessaire pour réaliser une analyse statistique pertinente. Le nombre total d'animaux prévu est de 120.

- Raffiner. Les animaux seront placés en cage collective dans un environnement enrichi. La méthode de gavage ne devrait pas entraîner de douleur significative. Cependant, l'administration de Salmonella étant susceptible d'induire des manifestations systémiques, les animaux seront surveillés de façon rapprochée et des points d'arrêt ont été définis pour éviter toute douleur importante. Les prélèvements seront réalisés sur l'animal anesthésié.

Les résultats permettront de valider l'intérêt potentiel de *B. fragilis* au cours des infections à salmonelle pour améliorer leur prise en charge.

19545 Les lymphocytes B sont des cellules essentielles à l'immunité adaptative surtout grâce à la production d'immunoglobulines, aussi appelées anticorps. Nous nous efforçons alors de mieux comprendre les mécanismes de différenciation des lymphocytes B, et plus précisément les mécanismes de recombinaison génique conduisant à la production d'anticorps spécifiques. Le but de ce projet est alors de mettre au point un système de reconstitution hématopoïétique chez des souris déficientes en lymphocytes (BRGS), ce qui nous permettra alors d'étudier le développement des lymphocytes B dans un système physiologique complet. En effet, les résultats de la littérature montrent que les lymphocytes B sont fortement représentés dans les souris BRGS ayant reçu un greffon de CSH. Les souris déficientes seront greffées avec des cellules souches hématopoïétiques (CSH) humaines (mais aussi murines pour comparaison), les souris BRGS étant conçues pour ne pas rejeter les cellules humaines. Les CSH pourront alors être mutées au préalable afin d'étudier précisément le rôle d'un gène spécifique au développement des lymphocytes B (délétion de gènes comme AID et LRRc8) ou d'induire spécifiquement la production d'anticorps par les lymphocytes B (insertion du gène produisant des anticorps anti-HER2). Les mutations ne concerneront uniquement les lymphocytes B, seront conservées au cours de la différenciation in vivo et ainsi les lymphocytes B se développant dans les souris greffées porteront la mutation initiale. Ceci nous permettra alors de définir le phénotype de chaque gène muté (délétion du gène dans les CSH) et d'obtenir des lymphocytes B produisant spécifiquement un anticorps (insertion du gène dans les CSH).

Les procédures décrites prévoient l'utilisation de 36 lots de 15 souris BRGS (soit un total de 540 souris), en adéquation avec la règle des 3R (REPLACE / REDUCE / REFINE) :

Le Remplacement: les événements géniques physiologiquement impliqués dans le développement des cellules du système immunitaire, et tout particulièrement des lymphocytes sont à l'heure actuelle impossible à reproduire in vitro. Le recours à des animaux est donc indispensable pour cette étude.

La Réduction: afin de réduire le nombre d'animaux nécessaires, les expérimentations ont été mises en place de manière à utiliser le moins de souris possible tout en extrayant le plus d'informations, notamment en utilisant plusieurs organes (moelle osseuse, ganglions, rate, thymus et sang). Le maximum de validation in vitro a été et continuera d'être réalisé en préalable à toute injection chez l'animal. Ensuite, les différentes techniques d'injection de CSH dans la souris seront d'abord comparées les unes aux autres afin de trouver la technique la plus efficace possible et la moins intrusive et douloureuse possible. Enfin, la taille des groupes de souris est choisie de façon à permettre une interprétation des données statistiquement valides. Le nombre de 15 souris par lot est choisi assez élevé pour pallier au fait que ces expérimentations ont une reproductibilité assez faible. En effet, les traitements induisant une hypoplasie médullaire et les greffes de CSH induisant la reconstitution hématopoïétique sont des procédures avec une forte variabilité.

Le raffinement: les animaux sont élevés dans des conditions adaptées à savoir des locaux confinés, des portoirs ventilés, de l'eau et de la nourriture ad libitum, ainsi qu'un maximum de 5 animaux/cage. Également, aucun animal ne sera maintenu seul dans sa cage.

19546 Escherichia coli est une bactérie qui colonise le tube digestif de l'Homme et des animaux à sang chaud, dès les premières heures qui suivent la naissance. Un sous-groupe d'E. coli est responsable

de maladies telles que les méningites néonatales, les septicémies et les infections urinaires. Le traitement de ces infections passe par l'administration d'antibiotiques. Cependant, dans un contexte de multiplication de résistance bactérienne aux antibiotiques, la recherche d'autres voies de lutte contre ces agents infectieux est nécessaire. Parmi plusieurs stratégies, l'usage de bactéries issues d'un autre sous-groupe de *E. coli* possédant des propriétés bénéfiques, notamment la capacité de combattre les souches potentiellement pathogènes, est décrit.

Nous utiliserons un modèle murin de transmission bactérienne verticale de la mère à l'enfant (où les bactéries sont inoculées à la mère gestante et transmises aux nouveaux nés au moment de la mise bas) afin d'établir chez les souriceaux une colonisation digestive d'une souche pathogène. L'administration de souches commensales quelques semaines plus tard aura pour but de faire disparaître cette colonisation.

Aucune expérimentation alternative ne peut remplacer l'aspect *in vivo* de ce projet dont le but est d'étudier l'impact de souches commensales de *E. coli* sur la colonisation intestinale chez les nouveau-nés de souches pathogènes. Par ailleurs, ce modèle de transmission verticale de *E. coli* depuis la mère vers les souriceaux permet de mimer le véritable mode de transmission de la bactérie vers la descendance. Tous les moyens seront mis en œuvre pour respecter les règles des 3R. Le projet a été élaboré de façon à réduire au maximum le nombre de souris requises. Nous travaillerons notamment avec des souris Swiss qui, au contraire d'autres lignées de souris, donnent des portées comprenant un grand nombre de souriceaux, approximativement 12 en moyenne. Ceci permettra de réduire le nombre d'animaux reproducteurs requis, et d'obtenir une descendance nombreuse afin de réaliser des analyses statistiques robustes. Le bien être de l'animal sera en permanence au centre de nos préoccupations. Les souris sont hébergées dans des cages à 20-24°C et 30-50% d'hygrométrie, en portoirs ventilés (dans des cages d'une superficie de 500cm²), avec une alternance jour/nuit de 12h/12h. La nourriture et l'eau de boisson sont fournies *ad libitum*. Le change de la litière est réalisé chaque semaine. Du coton ou du sopalin sont ajoutés pour leur permettre de faire un nid. Les animaux ont une semaine d'acclimatation avant que le protocole ne débute. Les conditions d'expérimentations font l'objet d'une procédure de suivi du bien-être animal. Les animaux seront suivis quotidiennement. La procédure expérimentale, basée sur un gavage oral des souris avec une suspension bactérienne, n'implique aucune douleur. Le gavage oral des souris par des *E. coli* commensales et pathogènes n'occasionne qu'extrêmement rarement une réponse délétère pour l'animal. Tout animal présentant des signes de douleur, souffrance ou angoisse sera euthanasié. Sur la période de 5 ans, 3640 souris (dont 280 femelles gestantes) seront utilisées.

19547 Les défis environnementaux actuels et la place importante des coûts de l'alimentation dans l'élevage porcin encouragent la valorisation des coproduits non consommables par l'Homme. Cependant ces aliments, quoi que souvent riches en protéines, sont également riches en fibres alimentaires. Bien que les fibres alimentaires aient un rôle essentiel dans la santé gastrointestinale du porc, elles peuvent aussi compromettre la digestion et l'absorption des nutriments, en particulier celles des protéines. Les coproduits peuvent être à la fois de bonnes sources de protéines et de fibres, sans effet néfaste pour l'animal ou l'environnement, à condition de les donner sur une forme adéquate (plus ou moins structurée).

L'objectif de ce travail est d'étudier comment les fibres d'un coproduit, la farine de pois, influencent la digestion des protéines. L'approche de ce projet consiste à nourrir des porcs avec deux formules alimentaires de composition identiques mais où les protéines et les fibres seront apportées sous deux formes distinctes : farine brute obtenue par broyage de pois (protéines encapsulées par les fibres alimentaires) et farine reconstituée (dissociation des protéines et des fibres par traitement technologique). Cette étude nécessite de prélever le contenu du tube digestif et des échantillons sanguins chez les animaux de façon à pouvoir évaluer la digestibilité des protéines, l'apparition des acides aminés dans le sang, et le degré de déstructuration de l'aliment (parois cellulaires dégradées et/ou fibres libérées dans le contenu du tube digestif). Le dispositif expérimental comprendra 10 porcs de 35 kg en début d'expérience qui recevront alternativement les 2 régimes expérimentaux dans un carré latin 2x2 (2 périodes expérimentales de 14 jours x 2 régimes).

Le projet a été construit pour répondre aux exigences des 3R :

Remplacement : Cette étude sera effectuée chez le porc. En effet, bien que des progrès significatifs aient été réalisés en ce qui concerne la modélisation de la digestion, la simulation du processus physique de la digestion présente toujours un défi majeur, ce qui signifie que nos connaissances sur la relation entre les aliments, la digestion et les réponses physiologiques sont limitées. A l'heure actuelle, les travaux sur les interactions digestives des nutriments ne peuvent être réalisés sans avoir recours à des animaux proches des animaux utilisés dans les élevages commerciaux. Comme la majorité de la digestion et de l'absorption des nutriments (notamment les protéines) ont lieu dans la partie supérieure du tube digestif, prélever des échantillons à ce niveau nous est indispensable pour examiner en cinétique le flux et la composition des digestas. Des expériences de digestibilité simulées in vitro seront réalisées en parallèle afin de valider nos modèles de digestion et à terme de permettre de réduire le recours à l'expérimentation animale.

Réduction : Le nombre d'animaux (n=10) et le dispositif expérimental mis en place (carré latin 2x2) ont été déterminés sur la base d'études antérieures afin d'atteindre le niveau de précision souhaité pour l'intégration des résultats du projet dans des tables de composition nutritionnelle tout en limitant le nombre d'animaux.

Raffinement : Le bien-être des porcs sera respecté grâce à un suivi très attentif des animaux pendant toute la durée de l'expérience (visite au moins deux fois par jour) ainsi qu'en limitant la souffrance par le respect des méthodes anesthésiques et analgésiques. De plus, des points limites adaptés et des critères d'arrêt précoces ont été établis afin de mettre fin à l'expérimentation pour les animaux en souffrance. Le protocole expérimental a été optimisé de manière à obtenir un maximum de données à partir des échantillons collectés. Cette étude est une opportunité unique d'obtenir un ensemble de données qui vont permettre d'avoir un aperçu global des mécanismes se déroulant pendant la digestion de farines de pois et ainsi évaluer l'interaction des fibres avec les protéines.

19548 L'utilisation de modèles animaux en plateau d'élevage nécessite une maîtrise du statut sanitaire des animaux hébergés. En effet, il est important de connaître l'environnement sanitaire et notamment la présence ou non de pathogènes ou opportunistes. Ces agents infectieux i) peuvent être responsables de maladies transmissibles communes à l'homme et à l'animal et donc représenter un risque pour les personnels ii) agissent négativement sur l'état de santé des animaux pour impacter les conditions d'élevages iii) peuvent interférer avec les résultats expérimentaux. On comprend bien qu'une mauvaise gestion et évaluation de l'environnement sanitaire peut avoir des conséquences désastreuses dans les animaleries et pour la fiabilité des recherches scientifiques. Un programme de contrôles doit donc être mis en place selon des recommandations précises fournies au niveau Européen. Un plan de contrôle sanitaire efficace permet de répondre aux 3R en élevage car :

- L'identification des agents présents permet une meilleure anticipation et adaptation à l'élevage
- Avec des animaux en bonne santé la productivité est optimisée,
- Les résultats expérimentaux issus ensuite de ces animaux sont plus robustes

Tout ceci permet un cercle vertueux qui aboutit à une réduction au final des animaux dans les centres zootechniques pour une recherche scientifique plus fiable.

Notre plan de contrôle sanitaire est basé sur la mise en place d'animaux « sentinelles » qui reçoivent de la litière sale des autres cages de la pièce. Tous les trimestres, soit ces sentinelles sont envoyées en laboratoire pour identifier les agents soit des prélèvements sont effectués sur ces sentinelles et sur des animaux d'élevage. L'objet de cette demande est la réalisation de ces prélèvements qui sont des prises de sang (quelques microlitres) et des écouvillonnages sur différentes parties de l'animale (bouche, corps et périanal). Ces prélèvements se feront dans le respect de la règle des 3R :

- Remplacement : dans nos conditions, il n'est pas possible de complètement remplacer l'utilisation d'animaux pour les contrôles sanitaires car les méthodes utilisant la PCR ne permettent pas de rechercher tous les agents d'intérêt.

- Réduction : le plan de contrôle sanitaire par l'utilisation de souris « sentinelles » permet de restreindre à 3 souris par portoir pour évaluer efficacement le statut sanitaire de la zone.

- Raffinement : tout d'abord, l'envoi de prélèvements effectués sur le plateau en remplacement de l'envoi des animaux constitue un raffinement en évitant le stress et incidents possibles d'un transport d'animaux. Ensuite, les méthodes d'écouvillonnage et de prises de sang sont très peu douloureuses d'autant plus qu'elles sont réalisées par des zootechniciens expérimentés et entraînés pour ces gestes. Toutefois, en cas de mauvais prélèvement ou l'observation de la dégradation de l'animal après les prélèvements, un programme de suivi par grille de score et avec des points limites débute pour rapidement prendre en charge l'animal en souffrance. S'agissant uniquement de prélèvements simples les critères sont assez généraux (état général, comportement et perte de poids par exemple) pour une prise en charge allant de la désinfection d'une plaie, l'utilisation d'analgésique, à la mise à mort de l'animal.

Le plan de contrôle sanitaire concerne les souris de notre plateau et il sera utilisé au maximum 900 souris pour les prélèvements.

19549 Avec l'environnement sanitaire, les paramètres conditions climatiques sont les principaux facteurs environnementaux affectant les performances des porcs dans les principaux bassins de production mondiaux. Parmi les solutions actuellement disponibles pour l'éleveur, les stratégies alimentaires sont assez largement utilisées. L'utilisation d'additifs (acides aminés fonctionnels, molécules anti-oxydantes, probiotiques) permet généralement de réduire l'hyperthermie des animaux au chaud mais a des effets contrastés sur les performances. Des travaux récents montrent que l'utilisation d'une souche de levure probiotique *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* permet de compenser partiellement ou complètement les impacts négatifs de la chaleur sur les performances des animaux. Les objectifs de ce projet sont de valider les effets positifs d'une supplémentation avec des levures vivantes sur les performances des porcs au chaud (consommation d'aliment, gain de poids vif et efficacité alimentaire) et voir si ces effets varient selon le sexe des animaux

Un total de 64 porcs (32 mâles entiers et 32 femelles) sera utilisé dans un essai destiné à mesurer les performances zootechniques des animaux logés dans des cases individuelles

Règle des 3R. Le remplacement n'est pas possible car l'utilisation d'animaux est inhérente au type d'étude (impact de la supplémentation en levures sur les performances à la chaleur des porcs charcutiers). Nous avons réduit le nombre d'animaux au minimum statistique en fonction des mesures effectuées. Toutes les mesures seront réalisées par du personnel formé et expérimenté. Les animaux bénéficieront d'un suivi très proche par les animaliers ainsi que par les différents intervenants. Toute intervention potentiellement douloureuse ou stressante sera contrôlée, et les animaux suivis dans les minutes ou heures qui suivent. Le raffinement va consister à diminuer le risque d'inconfort thermique des animaux par un suivi régulier de leur température interne et des constantes physiologiques comme le rythme respiratoire. Le raffinement va consister à diminuer le risque d'inconfort thermique des animaux par un suivi régulier de leur température interne et des constantes physiologiques comme le rythme respiratoire. En accord avec la cellule bien-être, les points limites utilisés dans cette expérimentation seront les suivants : si le rythme respiratoire s'élève au-dessus de 150 ventilations/min et que la température rectale est supérieure à 41,5°C, le porc sera immédiatement sorti de la cellule climatisée, refroidi avec de l'eau et retiré définitivement de l'expérimentation. En cas de souci de santé, le vétérinaire sera consulté et les animaux traités en conséquence. A la fin de l'essai les 64 animaux seront gardés en vie.

19550 L'objectif du projet sera d'évaluer le potentiel thérapeutique de traitements pharmacologiques et de compléments alimentaires sur les troubles cognitifs induits par une quantité insuffisante de sommeil. Le sommeil est fondamental pour les processus de développement et d'apprentissage, il joue un rôle fondamental dans la consolidation mnésique. Le modèle de privation de sommeil est utilisé pour éviter la consolidation du mécanisme de la mémoire et induire une déficience cognitive chez les souris. Ce modèle permettra de mettre en évidence l'efficacité de traitements et de futurs médicaments sur les problèmes cognitifs induits par le manque de sommeil.

Les conséquences de la privation de sommeil et leur éventuelle réversion seront analysées par des tests comportementaux de mémoire classiques pour la neurobiologie: le test de reconnaissance d'objets, le labyrinthe en Y et l'évitement passif qui font chacun appel à un type de mémoire particulier.

Le traitement sera appliqué quotidiennement et de manière préventive par voie orale ou par injection systémique et nécessite donc un système in vivo pour obtenir des effets au niveau du système nerveux central. L'étude du sommeil ne peut être évaluée que sur un organisme vivant que l'on pourra ou au contraire empêcher de dormir. Il n'est donc pas possible de supprimer l'utilisation d'animaux pour cette étude.

L'étude prévoit 6 groupes, dont deux groupes témoins et 4 groupes recevant des traitements différents et la combinaison de ceux-ci avec 12 animaux par groupe, soit au total 72 souris analysées. Avec 2 études par an sur 5 années cela fait 720 animaux au total pour 10 études. Le nombre d'animaux par groupe a été décidé afin d'obtenir une étude fiable avec le plus petit nombre d'animaux possible. Le nombre d'animaux par groupe est le nombre minimum permettant une puissance statistique suffisante. Ce nombre est cohérent avec ce qui est décrit dans les publications scientifiques.

Pour respecter la règle des 3R, tous les animaux seront utilisés dans toutes les procédures décrites dans ce projet. L'évaluation des points limites (tels que les signes cliniques et la perte de poids) permettant d'évaluer la souffrance animale sera de rigueur tout au long du protocole pour répondre aux exigences de réduction et de raffinement. Les animaux seront hébergés dans des cages avec la présence de matériel de nidification et un accès illimité à la nourriture et à l'eau. L'observation quotidienne des animaux dans leur cage permettra de vérifier une éventuelle souffrance.

19551 Un dispositif médical est un instrument, appareil, équipement ou encore un logiciel destiné, par son fabricant, à être utilisé chez l'homme à des fins, notamment, de diagnostic, de prévention, de contrôle, de traitement, d'atténuation d'une maladie ou d'une blessure.

Un dispositif médical conçu pour être implanté en totalité ou en partie dans le corps humain, ou placé dans un orifice naturel, est dénommé dispositif médical implantable (DMI). Il s'agit par exemple des prothèses articulaires, des implants mammaires, des implants dentaires, des stents, du matériel d'ostéosynthèse (vis, plaques...), etc...

Leur mise sur le marché demande une évaluation complète permettant de garantir leur innocuité pour le patient sur le long terme.

Pour cela de nombreux tests sont réalisés in vitro: génotoxicité, cytotoxicité, hémolyse... ces tests primaires permettent d'éliminer tout dispositif ne présentant pas les qualités minimales requises.

Cependant, d'autres tests pré-cliniques doivent obligatoirement être réalisés chez l'animal, notamment en ce qui concerne la tolérance locale et les performances en conditions normales d'utilisation: il s'agit à la fois d'une exigence réglementaire pour l'obtention du marquage CE, et d'une nécessité pour s'assurer de l'innocuité et de la performance des dispositifs, aucun modèle artificiel ne permettant de reproduire complètement les réactions d'un organisme vivant complet.

Ces évaluations, lorsqu'elles sont faites dans un contexte réglementaire, sont encadrées en Europe par la norme ISO 10993.

Le présent projet a pour but l'évaluation de différents dispositifs médicaux implantables, résorbables ou non résorbables, actifs ou non.

Cette évaluation aura lieu chez la souris, le Lapin ou le Rat, espèces préconisées par la norme 10993 et/ou chez le Porc, espèce présentant de nombreuses similitudes avec l'Homme.

Au maximum 500 souris, 100 lapins, 200 rats et 150 porcs seront utilisés sur 5 ans, pour l'évaluation de différents dispositifs.

Le nombre d'animaux utilisé sera réduit autant que possible, notamment par l'utilisation de méthodes non invasives telles que l'imagerie, ainsi que par l'explantation ou biopsie de dispositifs en cours d'étude pour analyses, mais aussi (quand cela est réalisable sans dommages), par l'implantation de plusieurs dispositifs par animal.

La prise en charge des animaux suivra les bonnes pratiques vétérinaires en usage afin de leur éviter tout dommage ou douleur.

En cas d'effets secondaires liés au dispositif implanté (réaction locale, dysfonctionnement. . .), les animaux feront l'objet d'une prise en charge symptomatique immédiate par un vétérinaire, et des points limites suffisamment prédictifs sont mis en place afin d'arrêter le protocole si cela est nécessaire pour le bien-être des animaux.

Afin de limiter le stress des animaux, leur conditions de vie répondront aux besoins de chaque espèce, en ce qui concerne les contacts sociaux, l'environnement (conditions d'ambiance, enrichissement) et l'alimentation.

Des programmes de renforcement positif seront mis en place afin de faciliter les manipulations sans contraintes.

Le bénéfice attendu est la mise à disposition pour les patients de dispositifs médicaux innovants et sûrs.

19552 Le noyau subthalamique est devenue une structure centrale en neurosciences pour deux raisons: 1. l'une des hypothèses sur le développement de la maladie de Parkinson stipule que le noyau subthalamique serait hyperactif dans cette pathologie ce qui sous-tendrait les symptômes moteurs et non moteurs observés; 2. Elle est une cible privilégiée pour la stimulation à haute fréquence qui est un outil thérapeutique couramment utilisé, entre autre dans le traitement symptomatique de la maladie de Parkinson. L'effet de cette stimulation est souvent évalué sur la correction des symptômes moteurs de cette pathologie. Or, de nombreux effets secondaires sont souvent observés avec cette stimulation. La description précise du rôle du noyau subthalamique dans le traitement des signaux reçus permettrait de mieux comprendre certains symptômes observés dans la maladie de Parkinson et mieux comprendre l'effet de la stimulation. Dans ce contexte, nous avons montré que des informations visuelles et auditives étaient transmises vers le noyau subthalamique. Nous avons également montré que ces informations étaient transmises par une structure multi-sensorielle appelée le colliculus supérieur. Cette structure a un rôle important dans la détection d'évènements nouveaux et inattendus apparaissant dans notre environnement. De ce fait, la découverte que des signaux visuels et auditifs sont transmis vers le noyau subthalamique en provenance du colliculus supérieur ouvre de nouvelles perspectives quant au rôle de cette structure. Le but de ce projet est donc de mieux caractériser le rôle de ces signaux au sein du noyau subthalamique.

Cette expérience est composée de 2 procédures expérimentales et nécessitera l'utilisation de 20 rats.

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

Raffinement: Les procédures proposées seront effectuées sur des animaux anesthésiés et seront donc de classe sans réveil. Cependant, l'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de douleur. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

Remplacement: Ce projet a pour but de comprendre la transmission de signaux auditifs et visuels naturels de l'oreille/oeil au noyau subthalamique ce qui n'a jamais été effectué précédemment. De ce fait, il est impossible de remplacer notre préparation in vivo par un modèle cellulaire ou une simulation computationnelle.

19553 Le noyau subthalamique est devenue une structure importante en neurosciences pour deux raisons: 1. l'une des hypothèses sur le développement de la maladie de Parkinson stipule que le noyau subthalamique serait hyperactif dans cette pathologie ce qui sous-tendrait les symptômes moteurs et non moteurs observés; 2. Elle est une cible privilégiée pour la stimulation cérébrale profonde qui est un outil thérapeutique couramment utilisé, entre autre dans le traitement symptomatique de la maladie de Parkinson. L'effet de cette stimulation est souvent évalué sur la correction des

symptômes moteurs de cette pathologie. Or, elle semble également efficace sur les symptômes non-moteurs et de nombreux effets secondaires sont souvent observés avec cette stimulation. La description précise du rôle du noyau subthalamique dans le traitement des signaux que cette structure reçoit permettrait de mieux comprendre certains symptômes observés dans la maladie de Parkinson et mieux comprendre l'effet de la stimulation. Dans ce contexte, il a été montré que des informations nociceptives, visuelles et auditives sont transmises vers le noyau subthalamique. Ces études nous ont permis de mettre en évidence un nouveau réseau cérébral reliant des structures sensori-motrices du tronc cérébral au noyau subthalamique. Nous suggérons que le noyau subthalamique, à travers ce réseau est en position centrale pour réguler l'activité sensorielle du tronc cérébral afin d'ajuster notre comportement en réaction aux stimulations sensorielles en provenance de notre environnement. Nous suggérons aussi que ce réseau est dysfonctionnel dans la maladie de Parkinson et pourrait sous-tendre de nombreux troubles sensoriels et attentionnels. Le but général de ce projet est donc de mieux caractériser ce réseau fonctionnellement et anatomiquement pour mieux comprendre son organisation et son rôle dans l'élaboration de nos comportements et son dysfonctionnement dans le contexte de la maladie de Parkinson. Dans ce but, nous cherchons à valider les expériences précédentes effectuées chez le rat dans un modèle souris. Ce modèle offre des possibilités de manipulations cellulaires et génétique plus fines que chez le rat qui nous permettra que mieux approfondir le fonctionnement de ce réseau et son implication fonctionnel.

Cette expérience est composée de deux procédures expérimentales et nécessitera l'utilisation de 20 souris.

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

Raffinement : L'ensemble des procédures proposées seront effectuées sur des animaux anesthésiés et sera donc de classe sans réveil. Cependant, l'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de douleur. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

Remplacement: Ce projet a pour but de comprendre la transmission de signaux auditives et visuelles naturels de l'oreille/oeil au noyau subthalamique ce qui n'a jamais été effectué précédemment. De ce fait, il est impossible de remplacer notre préparation in vivo par un modèle cellulaire ou une simulation computationnelle.

19554 Les anticorps sont des molécules qui ont la propriété de se "mouler" sur leur cible. Ils peuvent être générés par des processus de vaccination. En effet, ils sont sécrétés par des cellules du système immunitaire qui peuvent être isolées, immortalisées, et clonées. Les anticorps monoclonaux sont alors utilisés comme médicament à "action ciblante", ou en recherche pour "détecter" le produit étudié ; dans des domaines très variés allant de l'agronomie à la santé humaine.

L'expérimentation animale présentée dans ce projet est effectuée dans le cadre de la recherche et le développement d'anticorps monoclonaux utilisés dans le domaine du diagnostic immuno-hématologique, et ou cancérologique. Le laboratoire est impliqué depuis plus de 30 ans dans le développement d'anticorps utilisés pour le phénotypage des hématies (groupage ABO, Rhésus, Duffy, etc).

Pour certaines spécificités, il n'est pas possible de travailler avec des prélèvements humains pour générer des anticorps monoclonaux. Dans ces cas, seul l'immunisation d'animaux, généralement la souris, permet d'obtenir ces outils précieux. C'est notamment le cas pour les antigènes des systèmes Cartwright (YT) ou Dombrock (DO) pour ne citer que les plus connus.

La génération d'hybridome ne requière l'utilisation d'animaux que pour les étapes d'immunisations, ce qui correspond à une vaccination. Les autres étapes, comme la fusion cellulaire, les clonages ou la production d'anticorps, sont réalisés sans utilisation d'animaux. D'autre part, les méthodes alternatives, qui nécessite de grandes ressources, ne permettent pas toujours d'obtenir des

anticorps dirigés contre des structures natives (ex virus). De plus, les anticorps obtenus ne sont généralement pas de haute affinité et / ou grande spécificité, en raison de l'absence du mécanisme d'hypermutation somatique qui permet la maturation des anticorps in vivo.

Pour ce projet réalisable sur 5 ans, le nombre maximal d'animaux prévu est de 315 souris blab/c, en adéquation avec la règle des 3R :

- Remplacer : Dès lors que des prélèvements humains de qualité sont disponibles pour générer des anticorps contre une cible donnée, l'utilisation d'animaux sera abandonnée.
- Réduire : l'expérience acquise par le laboratoire a permis de réduire le nombre d'animaux nécessaires par groupe. Ainsi, pour chaque antigène et par type d'immunisation, chaque lot sera constitué de 3 animaux au maximum.
- Raffinement : les animaux sont élevés dans des conditions adaptées (locaux confinés, portoirs ventilés, eau et nourriture ad libitum), avec un maximum de 5 animaux/cage (et aucun animal maintenu seul dans sa cage). Pendant les procédures expérimentales, les animaux sont surveillés par du personnel qualifié, et des injections d'analgésique sont prévus pour réduire la douleur. Lors des prélèvements sanguins, l'utilisation d'anesthésie gazeuse est prévue pour réduire le stress des animaux. Enfin, des points limites sont également décrits.

19555 Une transition nutritionnelle s'opère dans les pays industrialisés ces 50 dernières années, avec une consommation plus élevée d'aliments riches en graisses saturées et en sucres rapides, laquelle joue un rôle central dans l'actuelle épidémie d'obésité et de maladies chroniques associées (stéatose hépatique, insulino-résistance).

Ce projet vise à explorer l'impact d'une supplémentation en molécule de lipides (FuFAs) chez la souris nourrie avec un régime alimentaire riche en graisses et en sucres, ce qui induit une obésité et une insulino-résistance.

Les FuFAs sont présents en faible quantité dans les plantes, chez certains microorganismes et chez les animaux en particulier le poisson. La sève de l'arbre *Hevea brasiliensis* est une source importante de FuFAs. Dans cette gomme naturelle de latex, les FuFAs peuvent constituer plus de 70% des acides gras totaux. Ils auraient des effets potentiellement bénéfiques sur certaines complications liées à l'obésité. Les trois effets biologiques majeurs des FuFAs sont : antioxydant, antimicrobien et anti-inflammatoire.

Nous avons choisi pour cette étude le modèle souris C57BL/6J car il s'agit d'un modèle d'étude classiquement utilisé au laboratoire et décrit dans la littérature : 40 souris mâles C57BL/6J (10 animaux par groupe) seront utilisées dans ce projet. Elles recevront leurs régimes respectifs (régime standard ou régime riche en graisse et en sucre enrichi ou non en FuFAs avec deux doses différentes) pour une période de 12 semaines. Nous explorerons les désordres métaboliques associés à l'obésité tels la stéatose hépatique et l'insulino-résistance ainsi que le phénotype musculaire.

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

- « Remplacer » les modèles animaux :

Il n'existe pas de modèle cellulaire reproduisant nos procédures expérimentales puisqu'il s'agit d'analyses nutritionnelles et métaboliques.

- « Réduire » le nombre d'animaux en expérimentation

Pour nos expérimentations, nous avons prévu le nombre nécessaire d'animaux pour garder une puissance statistique dans le traitement de nos résultats.

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

Nous allons porter une attention particulière au bien-être de nos animaux. Les régimes nutritionnels proposés n'induisent pas de pathologie majeure, l'obésité induite étant modérée. L'accès à l'eau et à une nourriture adéquate est vérifié tous les jours. Le suivi journalier des animaux et du poids toutes les semaines permettent d'identifier des signes de souffrance caractérisés par l'état du

pelage, le comportement de la souris (agressivité / apathie), cris, mobilité, alimentation... En cas de souffrance, les animaux seront euthanasiés.

19556 Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), on définit l'infertilité comme l'incapacité pour un couple de procréer après deux ans de rapports sexuels non protégés. Il est généralement admis qu'environ 15 % des couples sont confrontés à des problèmes d'infertilité. L'infertilité est donc un problème majeur de Santé Publique et représente un enjeu médical et scientifique important. Les causes de l'infertilité sont multiples mais demeurent souvent inconnues. La récente identification de mutations dans plusieurs gènes de méiose dans des cas d'infertilité a mis en lumière l'importance de ce processus pour la fertilité.

La méiose est le processus central de la reproduction qui permet de former les gamètes (spermatozoïdes ou ovocytes). Cet événement cellulaire qui n'a lieu qu'une fois au cours de chaque cycle de reproduction est finement régulé à travers l'expression d'un jeu de gènes spécifiques. Ces gènes méiotiques ne sont exprimés que dans les organes reproducteurs et sont extrêmement conservés entre la souris et l'homme. En dépit de l'importance de la méiose pour assurer la fertilité, les événements cellulaires fondamentaux qui se déroulent au cours de ce processus demeurent mal compris. Au cours de la méiose des centaines de cassures double-brin de l'ADN sont générées et réparées par les cellules par un processus appelé recombinaison méiotique car celui-ci permet l'échange d'information génétique entre les chromosomes homologues. La recombinaison méiotique est un événement critique pour permettre la formation de gamètes avec un contenu chromosomique normal. Ce processus est hautement orchestré par l'expression dynamique des gènes méiotiques. Cependant les mécanismes de contrôle sont méconnus. Des données récentes ont mis en lumière l'existence d'événements de stabilisation des produits formés au cours de la transcription (transcrits) et d'arrêt complet de la transcription à certaines étapes de la méiose. Notre but est de comprendre les relations existant entre la transcription et la recombinaison au cours de la méiose. Une meilleure compréhension des mécanismes fondamentaux de la méiose permettra une meilleure prise en charge des cas d'infertilités à termes. Pour cela, nous devons caractériser le processus de transcription aux stades précoces de la méiose en suivant les transcrits synthétisés grâce à l'injection par voie intra-péritonéale d'un analogue de l'uridine (éthynyl-uridine), une des bases des transcrits. Nous emploierons des souris génétiquement modifiées existantes. Chez ces animaux, des événements spécifiques de la méiose sont altérés. Ainsi, nous pourrions étudier l'impact de ces étapes sur la transcription. Enfin nous tenterons, en sens inverse, de réactiver la transcription pour comprendre l'impact de celle-ci sur les événements méiotiques. Pour cela, des souris seront exposées par voie orale à un inhibiteur de la synthèse de l'acide rétinoïque puis recevront une unique injection d'acide rétinoïque afin de synchroniser l'entrée en méiose. Ces animaux recevront ensuite une seconde injection d'éthynyl-uridine pour analyser la transcription. D'autres souris recevront des injections de traceurs de l'ADN comme le BrdU et/ou le CldU pour le suivi des cellules méiotiques. Enfin un dernier groupe recevra des injections d'inhibiteurs des histones déacétylases et/ou des DNA méthyl transférases, pour activer la transcription en cours de méiose. Chez ces animaux, nous mesurerons la transcription et la progression de la méiose. Nous espérons que la réactivation artificiellement induite de la transcription va modifier la formation des cassures méiotiques et ainsi induire un défaut de fertilité.

Le recours aux animaux est une étape nécessaire pour étudier la fonction de Reproduction qui ne peut être mimée in vitro à partir de lignées cellulaires. En effet, aucune lignée, à ce jour, n'est capable d'entrer en méiose. 171 souris seront utilisées au cours de ce projet. Le nombre nécessaire d'animaux pour que les résultats de cette étude puissent être analysés statistiquement avec fiabilité a été déterminé sur la base d'études publiées. Les animaux sont nés et élevés dans des élevages agréés. L'état de santé des animaux est surveillé tout au long des expériences afin d'éviter l'apparition éventuelle d'une souffrance. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum. Pour leur bien-être, les animaux sont hébergés à plusieurs par cage (dans la limite réglementaire) dans un milieu enrichi comprenant du coton de nidification et des tunnels. L'application de critères d'arrêts nous permettra d'intervenir immédiatement dès le moindre signe de souffrance en utilisant des traitements

antalgiques appropriés ou de décider d'une euthanasie. Des méthodes d'enrichissement cellulaire (synchronisation méiotique) seront développées et les groupes contrôles seront mutualisés pour limiter le recours aux animaux.

L'ensemble de ces études permettra de comprendre finement le fonctionnement de la méiose et ainsi de mieux comprendre et prendre en charge certaines pathologies reproductives (infertilités).

19557 Il s'agit d'évaluer, sur des souris génétiquement modifiées, l'activité de nouvelles entités pharmacologiques issues d'une recherche chimique orientée "Structure / Activité". La sphère système nerveux central est étudiée par analyses comportementales et électro-encéphalographiques (EEG), notamment par un suivi des crises cataplectiques ou une altération du rythme éveil/sommeil.

L'orexine est un neuropeptide localisé exclusivement dans les neurones de l'hypothalamus dont les axones se projettent dans de nombreuses zones du cerveau, notamment les noyaux principaux impliqués dans la régulation du sommeil. Ainsi, des souris mâles ou femelles n'ayant plus le gène codant pour l'orexine (orexin knockout mice) présentent de façon robuste de nombreux désordres comportementaux (crises cataplectiques spontanées ou induites par une forte émotion) et électroencéphalographiques (attaques de sommeil REM survenant brutalement en période d'activité), soit un tableau clinique très proche de la narcolepsie développée par l'homme.

La lignée transgénique choisie est importée d'une animalerie d'un Centre de Recherche en France ou d'un fournisseur aux Etats Unis (mutation ciblée du gène *Hcr1 tm1Ywa*) puis développée sur plusieurs semaines par un éleveur agréé en France. Les expériences seront conduites sur les souches pures homozygotes et sauvages (wild-type, souche C57bl6/J) en condition contrôle.

Au stade adulte, les souris sont utilisées sans autre intervention (expériences comportementales de vidéo-tracking) ou bien subissent une implantation chirurgicale d'un télémètre biopotentiel (expériences EEG d'analyses du rythme éveil/sommeil). La télémétrie permet de contrôler à distance des variables physiologiques simples (pressions, température, activités électriques. . .) chez des animaux conscients, libres de leurs mouvements et gardés dans leur environnement habituel d'hébergement. En cela, elle constitue un système test de choix pour les études de pharmacologie in vivo.

Le système utilisé pour la télémétrie détecte, collecte et analyse des signaux électriques provenant d'un ou plusieurs animaux à la fois. Ici, les signaux (ondes EEG et EMG, température corporelle et activité motrice) sont captés par un implant miniature placé dans la cavité abdominale puis retransmis à un ordinateur PC via une antenne radio réceptrice puis un boîtier électronique qui digitalise l'ensemble des signaux recueillis.

Le système de vidéo-tracking permet une analyse comportementale par suivi vidéo sur un ou plusieurs animaux à la fois au moyen d'une caméra placée au dessus de l'enceinte expérimentale. En complément de la vidéo, le logiciel permet l'analyse automatique de plusieurs paramètres comportementaux tels que la distance totale parcourue par l'animal pendant une période donnée ou encore son état d'activité général.

Sur le plan expérimental, l'animal conscient et libre de ses mouvements reçoit, s'il est jugé apte à entrer dans l'étude, une injection (voies p. o. ou i. p. principalement) du véhicule ou du composé à tester à une ou plusieurs doses au cours d'expériences successives. Les paramètres d'intérêt sont enregistrés puis une analyse à posteriori des signaux est effectuée (analyse comportementale par suivi vidéo et/ou analyse de l'activité cérébrale par EEG) afin d'évaluer l'effet du produit en comparaison à son véhicule. Une même cohorte est ainsi utilisée sur une période de quelques mois (selon la durée de vie de la batterie de l'implant). Au maximum, il est prévu trois à quatre équipements de souris à l'année (à raison de 16 souris maximum équipés pour une étude EEG soit 570 souris maximum pour l'ensemble du projet).

19558 Les maladies dégénératives associées au vieillissement telles que la maladie d'Alzheimer sont devenues un problème majeur de société et malgré de nombreuses tentatives pour développer des thérapies contre ces maladies, elles restent sans traitement. Un enjeu important est de détecter très

tôt les dommages du cerveau associés à l'âge afin de prévenir leur propagation. De nombreuses études suggèrent que le système immunitaire périphérique, dont le rôle protecteur contre les infections et le cancer est bien connu, pourrait protéger le cerveau de sa dégénération au cours du vieillissement. Les mécanismes impliqués dans ce processus restent mal compris. Une des questions majeures est comment le système immunitaire périphérique interagit avec le cerveau alors qu'ils sont virtuellement en territoires séparés. Les cellules immunitaires les plus proches du cerveau se situent au niveau des barrières du cerveau, à l'interface entre le système sanguin périphérique et le cerveau.

Notre but est d'étudier comment les cellules immunitaires situées au niveau d'une de ces barrières, les plexus choroïdes, agissent sur le cerveau, en condition physiologique et au cours du vieillissement. Nous souhaitons prélever le cerveau de souris adultes jeunes et âgées afin d'analyser et comparer l'expression des gènes des cellules des plexus choroïdes en fonction de l'âge. Cette analyse permettra d'identifier les facteurs produits par les plexus choroïdes et potentiellement impliqués dans la modulation de l'activité neuronale au cours du temps et contre lesquels la mise au point d'immunothérapie pourrait permettre à terme de mieux lutter contre les maladies dégénératives associées au vieillissement. Le recours à l'animal est nécessaire car il n'existe aucun système *in vitro* qui puisse reproduire la complexité cellulaire de l'interface barrière du cerveau que nous étudions. De plus, les différents facteurs variant selon l'âge et influant sur la fonction barrière de ce tissu ne peuvent être étudiés *in vitro*.

Le nombre d'animaux que nous estimons nécessaire repose sur notre expérience d'études des cellules immunitaires des plexus choroïdes et s'appuie sur des tests statistiques spécifiques qui nous permettent d'utiliser le nombre minimal d'animaux nécessaire pour atteindre l'objectif fixé. 1500 souris mâles et femelles, adultes jeunes et âgées de plus de 18 mois seront utilisées sur 5 ans. Ces animaux suivront une seule procédure qui est sans réveil. Au cours de cette expérience finale qui entraînera la mise à mort par exsanguination après anesthésie et analgésie, les animaux pourront éprouver un peu de stress au moment de l'injection d'anesthésique et analgésique mais peu ou pas de douleur.

19559 Les lymphomes cutanés primitifs (LCP) sont des cancers rares dont la fréquence augmente avec l'âge. Les patients atteints de cette maladie présentent une accumulation de lymphocytes au niveau de la peau que l'on retrouve sous forme de plaques rouges avec démangeaisons et apparition de tumeurs chez certains patients. Il existe plusieurs types de LCP dont certains restent confinés à la peau et d'autres dont les cellules circulent dans le sang. Ces pathologies ont pour origine les lymphocytes T (lymphomes cutanés primitifs T, LCP-T) ou les lymphocytes B (lymphomes cutanés primitifs B, LCP-B). Dans les formes les plus agressives de la maladie, la survie des patients est faible (entre 20 et 50% à 5 ans). Cette faible survie des patients est due au développement de mécanismes de résistance aux chimiothérapies qui peuvent survenir au cours du traitement ou être présents d'emblée. Il est donc nécessaire de développer et tester de nouveaux médicaments pour améliorer le pronostic des patients. Un des principaux écueils au développement de nouveaux médicaments pour traiter les LCP, est l'absence de modèles d'études pertinents capables de reproduire la maladie. En effet, en absence de modèles d'étude appropriés, les connaissances sur l'origine des LCP ainsi que sur les mécanismes mis en jeu lors de leur progression ou lors de l'apparition de mécanismes de résistances aux traitements, restent limités empêchant ainsi la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Notre objectif est donc de développer des modèles qui mimeraient la maladie chez la souris permettant ainsi la compréhension des phénomènes responsables de la croissance tumorale et la mise au point de modèles d'évaluation de thérapies. La réussite de ce projet nécessite de tester différentes voies d'injections de lignées et d'échantillons de cellules issues de biopsies ou de prélèvements de sang de patients. En effet, les capacités de développement des cellules cancéreuses dans les modèles de xénogreffes varient selon les échantillons et les sites d'injection. Une fois ces modèles établis, nous pourrions tester de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Nous demandons 2320 souris pour réaliser ce projet sur 5 ans. Nous utiliserons les tests statistiques adaptés et nous combinerons nos lots témoins dans le but de restreindre le nombre d'animaux utilisés comme le veut la règle des 3R.

Remplacement : Dans notre démarche d'établissement de nouveaux modèles d'études des LCP, nous allons développer en parallèle des approches in vivo et in vitro. Une fois les greffes de patients prises chez la souris, les cellules seront récupérées pour effectuer des expériences sur le fonctionnement des cellules tumorales et tester des molécules thérapeutiques in vitro.

En parallèle nous développons de nouvelles approches de culture tridimensionnelles que nous comparerons à ceux in vivo afin de les valider. Ce qui permettrait à terme de remplacer en partie l'utilisation d'animaux.

Néanmoins, l'oncogenèse est un processus intégré qui fait intervenir un grand nombre de mécanismes physiologiques et de tissus avoisinants qui ne peuvent être modélisés in vitro. Nous devons donc avoir recours à un modèle physiologique complet et fonctionnel pour compléter nos études.

Réduction : Nous combinerons nos lots témoins et injecterons une dose unique maximale de cellules dans le but de restreindre le nombre d'animaux. La croissance tumorale sera suivie de manière longitudinale tout au long de l'expérience. Pour le développement des modèles, quand le mode de greffe donnant le meilleur taux de réussite pour les LCP-B aura été identifié, celui-ci sera systématiquement utilisé et les autres protocoles seront abandonnés. L'ensemble des moyens mis en place permettra de réduire le nombre d'animaux utilisés.

Raffinement : Le bien-être de nos animaux sera pris en compte de leur naissance à leur mort. Les animaux seront hébergés en groupe et l'enrichissement de leur milieu de vie sera systématique. Les animaux recevront une surveillance quotidienne et des soins adaptés (administration d'analgésiques et anesthésiques en pré et/ou postopératoire, mesure hebdomadaire du poids des souris et du volume tumoral, définition de points limites suffisamment précoces et mise en place de critères d'arrêt).

19560 L'alimentation des poulettes doit répondre à leurs besoins de croissance, afin de préparer leur future vie de poule pondeuse. Les besoins des poulettes diffèrent en fonction des souches de poules et de leur âge. Dans ce contexte, l'objectif de ce projet est d'évaluer les besoins nutritionnels des poulettes. Actuellement les modèles in vitro et tissulaires ne sont pas suffisants pour appréhender les variations inter-individuelles, l'effet des souches ou encore de l'environnement (Remplacer).

Ce projet, d'une durée de 1 an, emploiera un nombre total de 128 poulettes âgées de 0 à 18 semaines. Le nombre d'animaux concernés est nécessaire pour obtenir des résultats significatifs (Réduire). Les poulettes sont logées en intérieur, dans des parquets au sol. Dans chaque parquet on retrouve une litière en copeaux de bois, un point d'alimentation, et un point d'abreuvement. Les poulettes sont nourries en quantité suffisante au regard de leurs besoins nutritionnels.

Durant ce projet des mesures non invasives peuvent être réalisées : score d'emplument, état de santé, comportement, analyse des fientes et performances zootechniques. Des mesures de bio-impédance seront réalisées sur 32 animaux à 4 périodes (soit 128 animaux différents). Ces mêmes animaux seront utilisés pour réaliser des suivis de paramètres sanguin (moins de 10% du volume sanguin de l'animal par prise de sang). Les animaux ayant eu la mesure de bio-impédance et le prélèvement sanguin sont ensuite euthanasiés (par électroanesthésie suivie d'une exsanguination) pour réaliser des prélèvements d'organe afin d'étudier les relations entre les différentes mesures réalisées et la composition corporelle réelle des animaux.

Les différents paramètres étudiés (poids des poules, paramètres sanguins, composition corporelle) sont analysés à l'aide d'ANOVA sur le logiciel de statistiques R®.

Les animaux sont élevés dans des conditions proches de l'élevage avec en plus une attention particulière du suivi des animaux (passage d'animalier minimum 2 fois/jour) et contrôle de l'environnement. Les manipulations sont réduites au minimum afin de limiter le stress des animaux.

De plus, lors de la mesure de bio-impédance, et lors du prélèvement sanguin, 2 tentatives maximum sont autorisées (Raffiner).

19561 Notre laboratoire étudie les mécanismes physiopathologiques impliqués dans une maladie rare, l'holoprocéphalie (HPE). Cette pathologie est décrite comme un défaut de clivage des 2 hémisphères cérébraux pendant le développement embryonnaire précoce. Elle concerne 1 naissance sur 10 000 et elle possède une origine génétique. Il existe de nombreuses formes de cette maladie. La forme la plus sévère est l'holoprosencéphalie alobaire qui est associée à une cyclopie. Les formes moins sévères présentent une microcéphalie associée à des anomalies de la face tel que par exemple une fente labio-palatine, un hypotélorisme, une incisive médiane unique. Une déficience intellectuelle et un retard psychomoteur sont observés chez ces patients. Des anomalies de l'axe hypothalamo-hypophysaire sont également constatées.

De nombreuses études utilisant des modèles animaux vertébrés ont montré que c'est une déficience de la voie de signalisation Sonic Hedgehog (SHH) au cours du développement précoce qui est responsable de l'apparition de l'holoprosencéphalie. Nous avons récemment montré qu'une altération du gène RBPJ est également responsable de ce syndrome.

Nous utilisons des souris transgéniques dans lesquelles les gènes *Shh* et *Rbpj* sont mutés. Notre objectif est d'étudier l'impact de ces mutations sur le développement embryonnaire et ceci dans 2 fonds génétiques différents. La procédure qui justifie cette demande est le prélèvement de foetus au dernier tiers du développement (entre 14,5 et 18,5 jours post coitum). Le nombre de foetus prévu pour la réalisation de ce projet est de 200/an, soit 1000 sur 5 ans.

Ce projet respecte les 3R :

Remplacer : Le projet est mené in vivo parce qu'un modèle in vitro tel que le modèle cellulaire ne permet pas de reproduire le développement embryonnaire vertébré. Le développement du cerveau étant très conservé entre les mammifères, le modèle murin est un modèle de choix pour étudier la physiopathologie de l'HPE.

Réduire : Nos études préliminaires nous permettent de réduire le nombre de foetus de souris à prélever au strict nécessaire. Par ailleurs, comme seules 70% des femelles fécondées (présence d'un bouchon vaginal) sont gestantes, nous avons mis au point un suivi du poids des femelles fécondées afin de n'utiliser que les souris gestantes.

Raffiner : Les foetus seront anesthésiés par hypothermie dès le prélèvement effectué.

19562 Le cancer du foie est un des cancers les plus mortels et les plus répandus dans la population humaine. Peu d'options thérapeutiques sont disponibles. Dans 9 cas sur 10, le cancer se développe dans les foies déjà malades des patients souffrant d'hépatites aggravées en cirrhose. Ces hépatites peuvent être d'origine virale, ou liées à la consommation excessive d'alcool ou encore de régime riche en graisses. Afin de pouvoir étudier le développement cette maladie, l'hépatite et le cancer du foie en particulier, une équipe japonaise a trouvé les conditions de traitement pour obtenir des souris malades d'hépatite et développant un cancer du foie comme chez l'Homme. Ce traitement combine l'administration d'un agent chimique à une alimentation très riche en lipides de souris mâle. Notre équipe a récemment obtenu des données qui suggèrent qu'une protéine impliquée dans le contrôle de la mort des cellules, la kinase RIPK1, pourrait être impliquée dans les processus de déclenchement et/ou de prolifération du cancer du foie. Notre projet est d'étudier le rôle de cette protéine dans le cancer du foie en comparant le développement de la maladie induite par le traitement/régime alimentaire riche en lipides chez des souris normales, des souris n'exprimant pas la kinase RIPK1 dans les cellules du foie, ou exprimant la protéine RIPK1 mutée qui a perdu une de ses fonctions. Pour atteindre le stade cancéreux, le protocole devra durer 27 semaines, les animaux seront étudiés après 4, 5, 7, 9, 12, 16, 20 et 27 semaines de traitement pour comparer les évolutions de la maladie chez les différents types d'animaux. Les organes prélevés seront analysés par différentes méthodes pour quantifier l'atteinte hépatique, les dysfonctionnements métaboliques et l'avancée du cancer. Le nombre de souris engagées dans ces expériences est évalué au nombre de 832, nous avons pensé ce protocole en suivant la règle des 3 R « Remplacer, Réduire, Raffiner

» : Nous avons réduit le nombre de souris à celui requis pour obtenir une validation statistique des résultats, les congénères de la première lignée de souris déficientes sont considérées comme des contrôles pour les 2 lignées modifiées génétiquement.

- L'étude a été raffinée en développant un suivi rigoureux des souris tout au long du protocole en mesurant la quantité de nourriture absorbée ainsi que le poids de chacune des souris, il est attendu que les souris perdent jusqu'à 20% de poids corporel sans que ceci ne soit un indice de souffrance ou de danger pour les souris. Le bien-être des animaux sera donc évalué de façon complémentaire et hebdomadaire en observant leur comportement et les indices pouvant suggérer une douleur au moyen du score de grimace. A noter que dans le travail publié ayant utilisé ce traitement, aucune souffrance ou mortalité des souris n'est mentionnée. Il faut noter qu'il n'existe aucun moyen de remplacer de telles études qui englobent l'ensemble de l'organisme dans sa réponse physiopathologique, et que seule l'expérimentation animale permet un suivi complet de la maladie depuis ses phases les plus précoces.

Ce travail permettra de préciser le rôle de la molécule RIPK1 dans l'évolution de la maladie « hépatite » conduisant au cancer du foie chez la souris. A terme, les données de ce travail pourraient permettre de développer de nouvelles stratégies préventives du cancer basées sur l'utilisation de nouveaux inhibiteurs pharmacologiques de la molécule RIPK1.

19563 Les plaquettes jouent un rôle clef dans l'arrêt du saignement. Elles sont également impliquées dans la thrombose artérielle. Suite à la rupture d'une plaque d'athérosclérose dans une artère malade, les plaquettes adhèrent au site de lésion, s'activent et agrègent. Elles forment un caillot qui peut bloquer l'écoulement du sang et entraîner des pathologies comme l'infarctus du myocarde ou l'accident vasculaire cérébral, qui représentent la première cause de mortalité dans le monde. Comprendre les mécanismes qui régulent l'adhésion et l'activation des plaquettes permettrait d'identifier de nouvelles cibles anti-thrombotiques.

Les plaquettes expriment des récepteurs d'adhérence mais également des récepteurs d'activation. Le rôle combiné de certains de ces récepteurs reste mal compris. L'objectif de ce projet vise à évaluer l'importance de l'activation conjointe des récepteurs plaquettaires d'une classe appelée les intégrines et qui sont impliqués dans l'adhérence et l'activation des plaquettes.

Ceci permettra de déterminer si ces récepteurs pourraient constituer de potentielles cibles anti-thrombotiques lorsqu'ils sont ciblés simultanément.

Respect de la règle des 3 R :

Remplacement

Le but de ce projet est d'évaluer le rôle des intégrines beta1 et beta3 dans les fonctions plaquettaires, notamment dans des processus complexes et intégrés que sont la thrombose, l'arrêt des saignements, l'intégrité vasculaire ou encore l'endotoxémie. Les modèles in vitro n'étant pas assez sophistiqués pour reproduire toute la complexité de ces processus, des modèles in vivo seront également utilisés. De plus, les plaquettes sont des cellules anucléées qui ne peuvent être cultivées, empêchant tout modèle reposant sur la culture cellulaire.

Réduction

Une première partie de l'étude sera réalisée en utilisant un modèle de thrombose ex vivo, disponible au laboratoire. Il s'agit d'un système de perfusion composé de chambres microfluidiques de très petite taille couplé à un système de microscopie. L'utilisation de ce système permet de diminuer le volume de sang utilisé, diminuant par la même occasion, le nombre d'animaux. Toutefois, ce système s'avère incomplet, ne pouvant reproduire totalement les conditions de circulation du sang dans les vaisseaux. Ainsi, des expériences complémentaires nécessitant des données in vivo seront nécessaires pour compléter et vérifier les résultats obtenus. Le nombre d'animaux utilisés lors de cette étude est réduit au minimum, ce nombre étant fixé à 16 souris/groupe au maximum pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs. Nous utiliserons des tests de Mann-Whitney pour la comparaison de 2 groupes testés et un test Kruskal-Wallis post-test Dunn pour les comparaisons multi-groupes.

Raffinement

L'utilisation de modèles d'animaux a été établie en raffinant au maximum les conditions de travail, afin de limiter leur angoisse, stress et douleur lors des manipulations. Pour ce faire, des points limites ont été établis pour les procédures décrites. Ces points limites permettront de soustraire l'animal aux procédures expérimentales permettant de limiter la souffrance et l'inconfort de l'animal. Pour chaque procédure, les animaux sont anesthésiés, maintenus à une température de 38°C par l'utilisation d'une plaque chauffante (tout au long de la procédure) et un traitement approprié contre la douleur leur est administré.

Pendant toutes les expérimentations, les animaux sont surveillés par du personnel entraîné.

Cette étude nécessitera l'utilisation de 962 souris.

19564 Les lymphocytes T régulateurs jouent un rôle central dans le contrôle des réponses immunitaires. Ils ont, par conséquent, un potentiel très important dans des approches thérapeutiques innovantes contre le cancer, les maladies auto-immunes, et le rejet des organes transplantés. Le développement des lymphocytes T dans le thymus est sous contrôle de signaux issus de plusieurs récepteurs de surface et de leurs ligands. Nos analyses génétiques suggèrent des rôles importants des récepteurs de surface CTLA4 et de CD28 dans le développement des lymphocytes T régulateurs. Afin de confirmer ou infirmer ces rôles potentiels, nous souhaitons étudier le développement des lymphocytes T régulateurs dans les thymus des souris déficientes pour l'une ou l'autre de ces deux molécules. A partir de quatre semaines de vie, ces souris développent des pathologies auto-immune très sévères, voire létales. Afin d'éviter la souffrance de ces souris, nous les euthanasierons avant l'âge de deux semaines, prélèverons des organes (thymus, rate, noeuds lymphatiques), et les analyserons dans le laboratoire. Afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs et donc exploitables, et vu que le nombre des lymphocytes T régulateurs dans le thymus est très faible (quelques milliers par thymus de nos jeunes souris), nous comptons avoir besoin de 180 souris en total. Vu la complexité du thymus nous ne pouvons analyser ce processus qu'in vivo. Les connaissances issues de ce projet nous permettront d'élucider d'éventuels défauts dans le développement des lymphocytes T régulateurs sous-jacents des pathologies auto-immunes, tels qu'indiqués par nos résultats récents.

19565 La prise en charge de la douleur est une priorité sanitaire. Par son rôle dans la prise en charge des patients, le pharmacien doit avoir une expertise de pharmacologie afin de pouvoir argumenter et valider une stratégie thérapeutique impliquant des médicaments antalgiques. Dans le cadre d'un module sur la prise en charge de la douleur au cours des études de pharmacie, nous proposons des travaux pratiques de pharmacologie afin de mettre en évidence et de caractériser l'effet antalgiques de Principes Actifs. L'effet thérapeutique d'un médicament résulte de multiples effets moléculaires, cellulaires et systémiques et à ce jour, ni la modélisation virtuelle ni l'expérimentation in vitro ne permettent d'anticiper l'ensemble de ces effets. Une évaluation in vivo demeure ainsi indispensable. Dans le cursus de pharmacie, le nombre de séances impliquant de l'expérimentation animale a été fortement réduit au cours des dernières années. A ce jour, une grande partie des connaissances en pharmacologie que nous avons des médicaments sont issues de l'expérimentation animale, et il est indispensable que les futurs pharmaciens, professionnels de santé expert du médicament, aient une connaissance précise et pratique des méthodes d'obtention de ces connaissances. Ces séances sont également l'occasion pour les étudiants d'acquérir des notions fondamentales du sujet complexe qu'est le recours à l'animal dans le domaine biomédical. Ainsi, ces séances représentent l'unique opportunité de sensibiliser les futurs pharmaciens à l'expérimentation animale et aux aspects réglementaires et éthiques associés.

Ainsi, les travaux pratiques que nous proposons utilisent quatre tests comportementaux permettant d'étudier la capacité de substances à modifier les seuils de perception douloureuse. Ces tests n'ont pas pour but d'induire une douleur, mais de provoquer une réaction de l'organisme dont l'inhibition permet de comprendre le rôle du médicaments dans le circuit physiologique de la transmission de la douleur.

Chacun des quatre tests fait l'objet de techniques publiées et validées par la communauté scientifique pour l'étude et le traitement de la douleur. Le nombre d'animaux est réduit à minima, c'est à dire trois animaux par lot soit 21 souris et 6 rats par séance. A chaque séance, deux médicaments de classes thérapeutiques différentes sont utilisés par test. L'animal participe à une séance par semaine pendant 5 semaines. Au total, 98 souris et 28 rats sont nécessaires par an. Soit 490 souris et 140 rats pour 5 ans.

Les médicaments sont administrés par voie intrapéritonéale. Le lot de 3 animaux est volontairement faible et satisfait au R de réduire. Compte tenu de la taille d'effet attendue dans les différents tests, les résultats des tests statistiques peuvent être significatifs.

Les séances sont réalisées dans des salles de TP agréées par les services vétérinaires et les étudiants sont encadrés par du personnel compétent et formé réglementairement, à raison de 3 encadrants pour 16 étudiants. Les animaux sont hébergés dans des locaux agréés à raison de 3 rats ou 10 souris par cage avec un enrichissement (tunnel et carrés de coton pour les souris; tunnels et frissure pour les rats)

19566 Les maladies neurodégénératives sont une préoccupation croissante en santé publique. Malgré d'importants efforts de recherche, il n'existe encore aujourd'hui aucun traitement capable de combattre de façon efficace la progression de ces maladies. Des dysfonctionnements du métabolisme cérébral du cholestérol jouent un rôle clé dans plusieurs maladies neurodégénératives, dont la maladie de Parkinson (MP). La MP est la deuxième maladie neurodégénérative la plus commune dans le monde. L'accumulation d'inclusions cytoplasmiques de protéines insolubles dans les corps de Lewy, dont l'alpha-synucléine est un constituant essentiel, induit une perte spécifique de neurones dopaminergiques (DA) de la substance noire du cerveau, à l'origine de la symptomatologie de la MP. De nombreux arguments suggèrent un lien étroit entre le cholestérol membranaire et les fonctions ou la capacité d'agrégation de l'alpha-synucléine.

Notre projet a pour but d'étudier finement une approche thérapeutique basée sur une thérapie génique qui consiste en l'administration d'un gène thérapeutique impliqué dans le métabolisme du cholestérol au moyen d'un vecteur adéno-associé (AAV) par injection intracérébrale dans le striatum et la substance noire.

Restaurer le métabolisme cérébral du cholestérol par thérapie génique pourrait constituer une piste thérapeutique pertinente pour la MP pour stopper le processus de neurodégénérescence.

Remplacement: Le recours aux modèles animaux de la MP est essentiel, car aucun type de culture cellulaire ou système synthétique ne permet à ce jour de reproduire la complexité architecturale des cellules du cerveau dans cette maladie, en particulier leurs interactions structurelles et fonctionnelles. L'équipe a déjà utilisé des souris sauvages pour mettre au point des protocoles de thérapie génique. Les animaux utilisés dans le cadre de ce projet sont nés et élevés en captivité dans des élevages agréés.

Réduction: Le nombre d'animaux utilisés est optimisé pour obtenir des résultats statistiques. Leur nombre **502** a été restreint au minimum indispensable de façon à obtenir des données nécessaires pour valider l'efficacité d'une stratégie thérapeutique innovante qui peut être considérée comme cible dans plusieurs maladies neurodégénératives. En effet, des travaux précédents ont permis d'établir les doses de vecteurs à injecter et les temps d'analyses.

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

19567 - Contexte : Les pathologies métaboliques (obésité, diabète de type 2, stéatose hépatique ou maladie du « foie gras » et leurs complications vasculaires (athérosclérose) sont la première cause de mortalité dans les pays industrialisés et sont en augmentation constante dans les pays en voie de développement. Ils représentent donc un enjeu majeur de santé publique et la compréhension

fine des mécanismes cellulaires et moléculaires qui ont lieu au sein de l'organisme est indispensable pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques puis mettre au point de nouveaux médicaments. Alors qu'il a très longtemps été considéré que ces maladies étaient seulement dues à des dérèglements du métabolisme des glucides (« sucres ») et des lipides (« graisses »), il est aujourd'hui admis que les cellules du système immunitaire (qui circulent dans le sang) sont présentes dans pratiquement tous les organes du corps, en particulier dans certains tissus spécialisés comme la rate et les ganglions) et l'inflammation jouent un rôle très important dans le déclenchement et la persistance de ces maladies. De manière assez inattendue – mais logique à l'aune de ces découvertes récentes-, parmi les facteurs aggravant les pathologies, on trouve des maladies associées au système immunitaire comme l'asthme allergique, affectant principalement les poumons, et des maladies fréquentes de la peau comme la dermatite atopique et le psoriasis

Aussi, comme, les cellules immunes sont donc des acteurs centraux à la fois des pathologies métaboliques et des pathologies inflammatoires de la peau et des poumons, élucider leur rôle précis dans ces deux groupes de pathologies et dans leurs interactions pourrait permettre, à terme, de traiter l'un et l'autre type d'affections. But: Ce projet vise donc à d'étudier la contribution des cellules immunes dans les deux types de pathologies et dans l'aggravation de l'une par l'autre. Il s'agira notamment de déterminer comment certains facteurs régulent le développement et la fonction des cellules immunes dans le contexte de ces maladies. Ces facteurs sont d'une part certains récepteurs nucléaires (il s'agit de récepteurs à des dérivés de lipides qui, lorsqu'ils fixent ceux-ci, interagissent avec l'ADN dans le noyau de chaque cellule pour réguler leur fonction) et certains récepteurs membranaires (présents à la surface des cellules et sensibles aux molécules qui circulent dans les fluides corporels que sont le sang et la lymphe ou sont situées à la surface des cellules voisines.)- Recours à l'expérimentation animale : Les pathologies métaboliques et/ou immunes impliquent de nombreux organes du corps et de nombreux types cellulaires circulant entre ces organes. Comme il est impossible de reproduire la complexité de ces interactions in vitro, l'expérimentation animale in vivo est indispensable pour reproduire de manière aussi réaliste que possible ces pathologies. En raison du grand nombre de lignées génétiquement modifiées disponibles et de la facilité relative avec laquelle il est possible d'en créer de nouvelles, la souris a été choisie comme modèle d'étude. Un nombre maximal de 25680 animaux sera utilisé pour ce projet.

- Respect de la législation (Règle des 3 R). Le nombre d'animaux qui sera utilisé au cours de ce projet a été réduit au minimum en agissant à plusieurs niveaux. Remplacement : S'il est impossible de remplacer l'expérimentation in vivo pour étudier les pathologies dans toute leur complexité, certains mécanismes cellulaires et moléculaires seront étudiés in vitro. Réduction : L'utilisation de conditions les plus standardisées possibles (conditions d'hébergement, âge et sexe des animaux, groupes contrôles appariés, horaires de réalisation des expériences...) et l'entraînement et la dextérité du personnel impliqué dans l'expérimentation permettent de diminuer la variabilité individuelle des réponses des animaux et par voie de conséquence le nombre d'animaux nécessaires par groupe pour obtenir des résultats significatifs. De plus, un maximum d'organes est prélevé sur chaque animal afin d'obtenir un maximum de paramètres pour chaque expérience et ainsi éviter la répétition d'expériences pour l'obtention d'organes non initialement ciblés. Raffinement : L'hébergement dans des conditions sanitaires optimales (exemptes d'organismes - opportunistes et- pathogènes spécifiques), l'enrichissement de l'environnement dans les cages (abris et « jeux »), le maintien des interactions sociales, l'utilisation de techniques non invasives, des produits anesthésiques et analgésiques optimaux, et la dextérité du personnel contribuent à réduire le stress durant toute la vie des animaux y compris durant l'expérimentation. Une surveillance quotidienne est également pratiquée.

19568 Le but de ce projet est de déterminer si l'altération de l'activité neuronale des neurones dopaminergiques a une influence sur l'expression des gènes dans ces neurones, en particulier les gènes codant les canaux ioniques responsables de l'activité de ces neurones. Nous souhaitons en particulier définir le rôle des miARNs dans ces modifications d'expression génétique. Pour cela, nous utiliserons plusieurs lignées de souris transgéniques qui nous permettront de modifier l'activité

neuronale (en l'augmentant ou la diminuant) des neurones dopaminergiques. Cela inclut des souris DAT-Cre/hM3Dq, DAT-Cre/hM4Di, DAT-Cre/Nav1. 2f et KO Kv4. 3. A notre connaissance, aucune de ces lignées de souris ne présente de troubles comportementaux particuliers ou de phénotype évident, suggérant que ces manipulations génétiques n'induisent pas de souffrance particulière chez l'animal.

RAFFINER : la seule intervention pouvant éventuellement provoquer une souffrance est l'injection intra-péritonéale (ip) de CNO (ou de saline chez les contrôles). Toutefois, cette procédure sera réalisée par du personnel formé à l'expérimentation animale. Les animaux seront mis à mort 24 heures après l'injection par décapitation après sédation profonde (anesthésie à l'isoflurane en boîte d'induction avec système de concentration d'O₂ pour empêcher l'asphyxie). Les animaux DAT-Cre/Nav1. 2 et KO Kv4. 3 subiront la même mise à mort sans injection ip préalable. Notre protocole expérimental est donc optimisé de manière à réduire la souffrance animale, et répond donc en ce point à la nécessité de raffiner les protocoles pour réduire la souffrance.

Une fois les animaux mis à mort, des tranches de mésencéphale seront préparées afin de réaliser des enregistrements électrophysiologiques par la technique de patch-clamp et de collecter les neurones pour une analyse transcriptomique (analyse des ARNm et des miARNs exprimés par ces neurones). Les enregistrements en patch-clamp serviront à collecter des données électrophysiologiques mais également le matériel génétique (ARNm et microARNs). Ainsi, ce projet combine l'analyse de l'activité neuronale (patch-clamp) et l'analyse de l'expression génétique (transcriptomique sur neurone unique).

REDUIRE : la combinaison des quantifications de matériels de nature différente (ARNm, microARNs, paramètres électrophysiologiques) à partir des mêmes échantillons permet de réduire significativement le nombre d'animaux utilisés. Les protocoles de qPCR ont été également optimisés de manière à réduire la taille des échantillons (et donc le nombre d'animaux) nécessaires pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Grâce à ces optimisations visant à réduire le nombre d'animaux, le nombre final de souris utilisées pour ce projet est évalué à N=270.

REMPACER : malgré l'utilisation importante de méthodes computationnelles dans notre équipe, ce projet ne peut être réalisé *in silico*, et ne peut pas être réalisé sur l'homme. Ainsi, nous sommes dans l'impossibilité de remplacer l'utilisation d'animaux de laboratoire par une méthode alternative.

19569 L'asthme allergique est une maladie chronique inflammatoire fréquente des voies respiratoires qui atteint 5 à 10 % de la population mondiale. Les corticoïdes contrôlent la maladie, mais induisent des effets secondaires et ne permettent pas toujours de prévenir les exacerbations menant parfois à un asthme de phénotype aigu, grave et au décès des malades. A long terme, la maladie induit des modifications structurales de la paroi des tissus pulmonaires, dit remodelage bronchique, qui est à l'origine du déclin de la fonction respiratoire pouvant aboutir à une insuffisance respiratoire chronique. Pour des soucis pratiques et d'éthique, de nombreuses manifestations liées à l'asthme, ne peuvent pas être étudiées chez un patient asthmatique humain. A contrario, la mise en place et l'utilisation de modèles murins présentent de nombreux avantages pour l'expérimentation et l'exploration des différents mécanismes pathologiques. Nous avons mis au point un modèle murin d'asthme allergique avec remodelage utilisant les acariens comme pneumallergènes pour induire ces mêmes manifestations. L'objectif de ce projet est testé de nouvelles stratégies thérapeutiques dans ce modèle original. Ces nouvelles stratégies sont basées sur l'injection de complexe formée entre une cytokine et son anticorps afin d'améliorer la fonction biologique de la cytokine et de diminuer ses effets indésirables. De plus, dans le même temps nous éluciderons les mécanismes immunologiques au cours de l'asthme allergique. Ce projet sera effectué sur un nombre estimé de 960 souris sur 5 ans. Il n'existe actuellement aucun modèle d'asthme allergique avec remodelage remplaçant le modèle animal (Remplacement). Le nombre d'animaux estimé dans ce protocole est suffisant pour justifier d'une pertinence scientifique (Réduction). Le protocole prend en compte au mieux du bien-être des animaux par un suivi régulier des animaux asthmatiques et par une mise à mort la plus éthique possible des animaux (Raffinement).

19570 L'objectif de ce projet est de développer des agents présentant à la fois une activité anti-tumorale et la capacité d'être suivi par imagerie. En effet, cette dernière décennie a vu le développement de thérapies anti-cancéreuses basées sur l'utilisation d'anticorps, activant le système immunitaire et ainsi éliminant les cellules cancéreuses. Ces traitements bien que montrant des résultats très intéressants chez les patients atteints de cancer métastatique, ne sont cependant efficaces que sur 1/3 de la population. Ce projet a deux buts qui sont (1) de développer des anticorps imageables par fluorescence et/ou imagerie nucléaire, dirigés contre des biomarqueurs prédictifs de l'efficacité de ces nouvelles thérapies et (2) d'associer à ces nouveaux agents une molécule cytotoxique capable de tuer les cellules cancéreuses. Cette double thérapie devrait permettre d'obtenir des traitements plus efficaces tout en conservant une bonne sélectivité.

Ce projet qui va durer 5 ans nécessite d'utiliser 1 140 souris Balb/C, C57Bl/6, Balb/C nude ou NOD SCID réparties comme suit :

(1) La mise au point d'anticorps imageants dirigés contre des biomarqueurs prédictifs de l'efficacité des immunothérapies nécessite l'utilisation de 150 souris, réparties en groupe de 5 souris, qui permettront d'identifier les meilleurs agents visualisables dans la souris entière. Selon les anticorps utilisés ces expériences nécessiteront ou non des souris déficientes dans leur système immunitaire (Balb/C nude ou NOD SCID).

(2) La détermination de l'effet anti-tumoral des cytotoxiques nécessite 900 souris, qui seront réparties en 2 groupes (contrôles versus traitées) de 5 souris. Différents cytotoxiques élaborés par une équipe de chimistes et testés préalablement sur des cellules tumorales en culture (2 lignées de cellules de cancer du côlon, 2 lignées de cancer du sein, 1 lignée de cancer du poumon et 1 lignée de mélanome) seront testées chez la souris syngénique de ces différents modèles. Les résultats obtenus à partir de ces expériences nous permettront de sélectionner la molécule cytotoxique à utiliser dans l'expérience suivante.

(3) La création de l'agent thérapeutique visualisable et cytotoxique nécessite 90 souris, qui seront réparties en 3 groupes (contrôle visualisable, agent sans cytotoxique mais visualisable, agent avec cytotoxique et visualisable) de 5 souris. Deux lignées tumorales différentes seront testées en fonction des résultats obtenus lors du point (2).

Remplacement : Ces travaux, ne peuvent pas être réalisés sur des cellules en culture ou à partir de méthodes alternatives puisque nous cherchons à visualiser la présence de la cible de notre traitement dans la tumeur de l'animal entier et que ce traitement nécessite la présence d'un système immunitaire efficace.

Réduction : Pour obtenir des résultats robustes et statistiquement significatifs, ces expériences devront être réalisées sur des groupes de 5 souris. Dans le cas de la détermination de l'effet anti-tumoral des cytotoxiques (2) et la création de l'agent thérapeutique visualisable et cytotoxique (3), ces expériences devront être réalisées trois fois, comme nous l'ont démontrées les précédentes études.

Raffinement : L'hébergement des souris se fera en groupe pour éviter le stress. Du matériel d'enrichissement permettant la construction de nid sera fourni et le calme sera maintenu tant que possible dans la salle d'hébergement. Les différentes lignées de cellules tumorales murines seront injectées dans le flanc de souris anesthésiées, par voie sous-cutanée. Les différents traitements seront administrés par voie intraveineuse. Les animaux seront suivis tous les 2-3 jours pour vérifier leur bien-être et déterminer la progression tumorale par mesure du volume de la tumeur. En cas d'apparition de nécrose les tumeurs seront traitées avec une crème cicatrisante, si la nécrose dépasse 2 mm de diamètre ou si la taille de la tumeur dépasse 2000 mm³ ou si d'autres signes de souffrance apparaissent (ex : perte de 10% du poids de la souris), les animaux seront mis à mort.

19571 *Anaplasma phagocytophilum* est une bactérie se multipliant dans les cellules sanguines. Sa culture in vitro est fastidieuse. Cette bactérie est pathogène pour certains animaux et pour l'Homme. Il n'existe actuellement pas de marqueurs pour suivre l'infection ou pour identifier les molécules cellulaires avec lesquelles la bactérie interagit. Nous proposons donc d'élaborer des aptamères à partir de bactéries le plus purifiées possible. Les aptamères sont des outils biochimiques pouvant

être utilisés dans des applications biotechnologiques, diagnostiques ou thérapeutiques. Ce sont des molécules synthétiques dont les propriétés biochimiques peuvent être comparées aux anticorps monoclonaux mais dont la fabrication permet d'éviter de sacrifier des souris.

L'étape de purification des bactéries d'*A. phagocytophilum* passe par l'isolement des bactéries grâce à un sérum polyclonal de lapin anti-*A. phagocytophilum*. Le présent projet concerne donc la production de ce sérum anti-*A. phagocytophilum* par des lapins. Il ne peut être effectué sans utilisation d'animaux vivants. Les lapins seront immunisés par 2 injections intramusculaires. Des prises de sang hebdomadaires seront effectuées pour suivre le taux d'anticorps et un prélèvement de 25 ml de sang par lapin sera effectué sous anesthésie générale en fin de protocole. Pour cela, le projet nécessitera 2 lapins, permettant d'obtenir le volume de sang suffisant (avec in fine un total de 20 à 30 ml de sérum hyperimmun) pour réaliser le projet. L'immunisation des animaux sera réalisée en dix points compte tenu du volume total à injecter (1 ml) afin de minimiser une éventuelle douleur localisée liée au volume injecté). L'immunisation des animaux ne devrait pas affecter de façon importante le bien-être et la santé des lapins, compte tenu de l'adjuvant utilisé (saponine) qui est employé pour la vaccination humaine et animale. Les deux lapins utilisés pour ce projet proviennent d'une expérimentation précédente (lapins donateurs de sang pour culture bactérienne). Ils seront hébergés dans des cages enrichies. Lorsque cela sera possible, ils pourront bénéficier de deux cages communicantes. Les deux lapins seront ensuite proposés à l'adoption.

19572 Mki67 est un gène qui code pour la protéine Ki-67, une protéine présente chez les vertébrés dans toutes les cellules qui prolifèrent, et qui est utilisé comme biomarqueur pour la prolifération cellulaire dans des biopsies des patients atteints de cancers. Comme la tumorigénèse est un processus complexe qui ne peut pas être récapitulé sans utiliser des modèles animal, nous étudions le rôle de ce gène dans la tumorigénèse avec des souris, dont les étapes de la maladie sont similaires chez l'humain. Nos données récentes indiquent une protection par l'absence de Mki67 contre les tumeurs induites chimiquement dans l'intestin, ce qui mime le développement des cancers colorectaux chez l'homme. Pour analyser les mécanismes par lesquels les souris déficientes pour Mki67 protègent contre cette tumorigénèse (notre hypothèse est que le système immunitaire joue un rôle prépondérant) nous avons besoin de croiser les souris dépourvues de Ki-67 avec les souris mutantes pour le gène *Apc*, qui est génétiquement prédisposée à développer des tumeurs dans l'intestin, afin de générer des souris génétiquement modifiées à la fois pour Mki67 et *Apc*. Ces souris seront ensuite transférées vers un établissement utilisateur afin de réaliser une analyse en profondeur de la réponse immunitaire anti-tumorale dans les souris normales ou dépourvues de Ki-67. Il y aurait un total de 140 souris à produire qui sont susceptibles de présenter un phénotype dommageable (tumeurs dans l'intestin). Cependant, le phénotype dommageable n'apparaît qu'à partir d'environ 4-6 mois; dès sevrage, 96 souris (tous sauf les 44 souris nécessaires à la reproduction de la lignée) seront transférés vers l'établissement utilisateur, et ne devraient pas présenter un phénotype dommageable au sein de l'animalerie d'élevage. L'élevage de toutes les souris se fera dans une animalerie avec un environnement enrichie dans les conditions du respect du bien être animal, et les souris seront surveillées quotidiennement par des animaliers qualifiés selon des critères bien définis d'état de bien-être.

Nos expériences avec les animaux seront aussi complétées par des expériences complémentaires en utilisant uniquement des cellules en culture (3R : remplacement). Afin de réduire le nombre de souris à produire, nous utiliserons les deux sexes. Le nombre de souris nécessaires est calculé pour avoir une validité statistique suffisante, et ainsi éviter la répétition inutile des expériences, afin de limiter le nombre d'animaux utilisés (3R : réduction). Les modèles ont été choisis et conçus (points limites) pour répondre à la question des fonctions de Ki-67, une cible thérapeutique potentielle dans le cancer, tout en étant le moins délétère possibles pour les animaux (3R : raffinement). Ainsi, le projet est entièrement conçu pour être en accord avec les règles 3R. Ce projet est un préalable essentiel pour développer des moyens thérapeutiques de bloquer les fonctions de Ki-67, qui a un intérêt pour la santé humaine.

19573 L'efficacité de la majorité des traitements anti-tumoraux réside dans l'élimination de la totalité des cellules tumorales par des effets cytotoxiques directs. Cependant, les thérapies conventionnelles ne remplissent pas toujours ce critère et sont associées à une lourde morbidité. Récemment a été démontré que la mort cellulaire induite par certains médicaments anti-tumoraux conventionnels (anthracyclines) pouvait générer une réponse immunitaire anti-tumorale participant de façon synergique à l'efficacité thérapeutique. L'utilisation de méthodes de génotypage à haut débit a permis d'identifier un polymorphisme (terme désignant la coexistence de plusieurs allèles pour un gène ou locus donné, dans une population animale, végétale, fongique, bactérienne), du gène FPR1 (Formyl Peptide Receptor 1), impliqué dans l'efficacité de la chimiothérapie. La présence de ce polymorphisme a été corrélée à une plus faible survie chez des patients atteints de cancer du sein et colorectal recevant des anthracyclines ou de l'oxaliplatine ainsi qu'à un diagnostic précoce de cancers colorectaux notamment. Le but de ce projet est de caractériser l'impact de défauts de l'axe FPR1, sur la capacité d'un anti-inflammatoire non stéroïdien (le sulindac) à protéger de l'apparition de cancer colorectaux spontanés. La conception de ce projet a été mis au point afin de respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement.

Remplacement : La question scientifique ne peut être abordée qu'in vivo car il n'est pas possible d'étudier l'implication du système immunitaire sur le développement du cancer dans des systèmes in vitro.

Réduction : Nous souhaiterons effectuer cette étude sur un total de 360 souris pour permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal. Notamment, les expérimentations seront regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. L'étude sera arrêtée si la procédure initiale invalide l'hypothèse de travail. Le modèle choisit est très bien documenté dans la littérature et les protocoles solidement établies au sein de notre laboratoire, permettant ainsi de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés.

Raffinement : Nous utiliserons des souris transgéniques viables, fertiles, de taille normale et ne présentent pas d'anomalies physiques ou comportementales. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification et/ou tunnels en cartons). Les animaux seront observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être. La mise en place d'une grille de suivi strict des points limites permettra d'éviter au maximum le stress et/ou la douleur au cours de l'expérimentation. De plus, le personnel impliqué dans ce projet est qualifié sur le plan technique et formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale. Il assure également une veille scientifique continue, évitant toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature.

19574 Les patients diabétiques et hypertendus présentent des lésions des microvaisseaux qui causent la dégénérescence de certains organes comme les yeux ou les reins. Le diabète et l'hypertension artérielle sont d'ailleurs les deux premières causes de mise sous dialyse en Europe.

Nous avons constaté récemment que des protéines, les calpaïnes, pourraient jouer un rôle défavorable dans cette atteinte microvasculaire associée au diabète et à l'hypertension. Nous allons maintenant étudier le rôle d'une protéine bloquant l'action des calpaïnes, la calpastatine, pour voir si la calpastatine pourraient protéger de ces lésions.

Nous utiliserons différentes lignées de souris génétiquement modifiées pour étudier les mécanismes impliqués dans les lésions vasculaires rénales, cardiaques et rétiniennes au cours du diabète et de l'hypertension. Nous cherchons ainsi à valider in vivo des cibles thérapeutiques préalablement identifiées par des études in vitro.

En premier lieu, nous traiterons les souris à la streptozocine afin de les rendre diabétiques et nous analyserons la fonction cardiaque et rénale en réalisant des prélèvements sanguins, urinaires et par échographie. Après 10 semaines, les souris seront euthanasiées pour prélèvement d'organes afin d'étudier les lésions vasculaires. AMENDEMENT : Nous mettrons en place un deuxième modèle de diabète où nous traiterons également les souris à la streptozocine après leur avoir enlevé le rein gauche et nous étudierons les mêmes paramètres décrit dans le premier modèle. Les souris

seront cette fois euthanasiées pour prélèvement des organes. Nous utiliserons également un modèle de diabète de type II, induit par modulation génétique, sur des souris OB/OB. Enfin, nous utiliserons un modèle d'hypertension artérielle induit par la perfusion continue d'une molécule, l'angiotensine II. Chez ces deux modèles, les mêmes suivis de pression artérielle, fonction cardiaque et fonction rénale seront réalisés avant sacrifice des souris pour prélèvement et analyse des organes. Dans ces modèles nous bloquerons les calpaïnes, soit génétiquement en surexprimant la calpastatine, soit pharmacologiquement.

Le diabète et l'hypertension sont des maladies complexes et seule l'expérimentation animale, mimant le plus fidèlement possible le microenvironnement diabétique ou hypertensif, permettra d'étudier les mécanismes impliqués dans les lésions vasculaires rénales, cardiaques et rétiniennes.

La souris est un modèle de choix car elle développe des complications vasculaires du diabète et de l'hypertension proches de celles de l'homme. De plus, nous tirerons parti de la transgénèse, c'est à dire le fait de pouvoir modifier les gènes des souris, afin d'étudier les cibles identifiées in vitro. Afin de prévenir toutes formes de souffrance et d'angoisse, ce projet sera mené dans le respect des 3R:

Remplacer : L'utilisation d'un modèle animal est une nécessité car il n'y a pas de méthode alternative pour l'étude du rôle des calpaïnes dans les complications microvasculaires associées au diabète et à l'hypertension.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est le minimum nécessaire permettant une analyse statistique robuste des résultats grâce aux données collectées au cours d'expériences précédentes.

Raffinement : Pour éviter toute souffrance, les procédures de chirurgie se feront sous analgésie et anesthésie générale. Les souris seront observées régulièrement et une grille précise d'évaluation des points limites sera utilisée. Tout signe de douleur, souffrance, angoisse ou stress chez les animaux sera soulagé avec des analgésiques.

L'environnement des animaux sera enrichi par du coton de nidation, des bâtonnets à ronger.

Ce projet s'inscrit sur une durée de 5 ans. Le nombre de souris utilisées sera de $1260 + 216 = 1476$.

A terme, les résultats de ce projet permettront de comprendre plus précisément les mécanismes impliqués dans le développement des lésions microvasculaires au cours du diabète. Ils pourraient permettre le développement de nouveaux médicaments ciblant les voies mises en causes, permettant ainsi de prévenir ou freiner le développement des maladies vasculaires chez les patients diabétiques et hypertendus.

19575 L'Ataxie de Friedreich (AF) est une maladie neurodégénérative héréditaire rare caractérisée par des troubles progressifs de la coordination des mouvements (ataxie).

Cette maladie est due à une mutation génétique qui débute habituellement dans l'enfance ou à l'adolescence. Le début de la maladie se traduit par une faiblesse générale, ataxie de la démarche et des membres supérieurs, et une dysarthrie (un trouble de l'articulation de la parole). Dans un second temps, les patients développent souvent une cardiomyopathie et un diabète et l'espérance de vie moyenne est d'environ 40 ans.

A ce jour, aucun traitement médical n'est capable d'arrêter la maladie ou de ralentir sa progression. L'objectif de ce projet est de développer un traitement curatif par thérapie génique. Nous allons utiliser des virus pour apporter la séquence fonctionnelle de l'ADN humaine dans un modèle murin déficient. La pénétration de ces virus dans les cellules malades permettra de récupérer leur fonctionnalité et donc d'arrêter la maladie.

Le modèle animal murin semble le plus probant pour suivre l'effet de la thérapie et démontrer son efficacité.

Ce projet aura une durée de 5 ans et le nombre maximal des souris utilisées sera 560 (128 souris sauvages, 264 souris malades, 168 souris contrôles). Ce nombre a été estimé sur la base des études antérieures en fonction du nombre minimal nécessaire pour réaliser des analyses statistiques. Le projet se décompose en 2 parties : la première partie sera effectuée pour sélectionner les meilleurs produits thérapeutiques, la voie d'injection et le type de virus. La deuxième partie ne

sera faite que si la première partie a apporté des résultats intéressants et aura comme but l'évaluation de l'effet thérapeutique.

Les injections des virus contenant le produit thérapeutique seront réalisées avant et après l'apparition des signes de la maladie, et par deux voies différentes, intraveineuse et/ou dans la colonne vertébrale, pour établir la voie permettant de mieux envoyer le produit thérapeutique dans les cellules cibles.

L'injection intraveineuse sera administrée dans la veine caudale, et ne nécessite pas d'anesthésie. Dans le cas d'injection dans la colonne vertébrale les animaux seront anesthésiés avant la procédure.

L'efficacité du traitement sera évaluée par l'analyse des défauts de la coordination et de l'activité locomotrice avec des tests de comportement non invasifs, une fois par semaine jusqu'au sacrifice.

Nous allons respecter le principe des 3R:

- Remplacement : nous avons analysé plusieurs produits thérapeutiques à l'aide de modèles cellulaires in vitro et validé leur fonctionnalité ; toutefois nous devons utiliser des modèles in vivo pour sélectionner les produits qui cibles au mieux les tissus et les organes. De plus l'évaluation chez l'animal, in vivo, des virus contenant le produit thérapeutique est indispensable pour établir leur efficacité avant que leur utilisation ne soit envisagée chez l'homme.

- Réduction : le nombre de souris utilisé sera réduit à son minimum en utilisation de tests statistiques adaptés.

- Raffinement : les injections dans la colonne vertébrale auront lieu sous anesthésie et des antalgiques sont prévus en phases pré et post-opératoire. Pour assurer le bien-être des souris, elles seront placées en cage groupée dans un milieu enrichi avec des carrés de coton, des maisonnettes et des bâtonnets à ronger. Pour faciliter l'alimentation des souris qui ont des difficultés à marcher, nous allons ajouter une alimentation en gel et des croquettes directement sur le sol. Les souris seront sous surveillance journalière pour détecter un éventuel état de souffrance et d'angoisse afin d'y remédier rapidement. Des points limites ont été établis conduisant à la mise à mort anticipée si nécessaire.

Les résultats de ce projet seront exploités pour déposer une demande d'essai clinique de thérapie génique pour l'Ataxie de Friedreich auprès des autorités compétentes.

19576 Les pathologies respiratoires des jeunes enfants sont un problème majeur de santé publique car elles constituent la première cause de mortalité chez l'enfant en bas âge. Le virus respiratoire syncytial (VRS) humain est l'agent principal des bronchiolites du nourrisson, dont la sévérité engendre un risque accru de développer de l'asthme en grandissant. Obtenir un traitement efficace contre ces infections est une priorité de l'OMS. L'infection VRS a pour particularité de causer des atteintes sévères des voies respiratoires inférieures chez le nouveau-né. Cette sensibilité du jeune à une infection VRS est intrinsèquement liée aux caractéristiques immunologiques de la muqueuse pulmonaire en période néonatale. Ces caractéristiques dépendent de la mise en place de l'immunité et de l'installation de bactéries primo-colonisatrices dans les poumons qui vont composer un microbiote bactérien.

Depuis plusieurs années, il est démontré que le microbiote participe à la maturation, au développement et à l'orientation des réponses immunitaires. Ce dialogue instauré entre le microbiote et le système immunitaire peut influencer la susceptibilité ou l'exacerbation des pathologies (comme les infections virales et bactériennes). Dans des travaux antérieurs nous avons démontré les effets bénéfiques de l'administration in vivo d'une bactérie primo-colonisatrice du poumon sur un modèle murin d'asthme, pathologie très similaire à la bronchiolite. Ainsi, la période périnatale constitue une fenêtre d'opportunité d'intervention importante où il serait possible d'orienter et/ou accélérer la maturation du système immunitaire, notamment par le microbiote, pour avoir un effet préventif sur des susceptibilités à des pathologies virales.

Les probiotiques sont des microorganismes qui confèrent un bénéfice à la santé de l'hôte. Chez l'humain, des probiotiques (dont des *Lactobacillus*) ont été administrés par voie orale (gavages)

pour prévenir des pneumonies acquises sous ventilation mécanique en milieu hospitalier. Leur action bénéfique par voie orale a aussi été démontrée contre des infections pulmonaires virales telle que le virus de la Grippe ou le VRS dans des modèles

murins. De plus, certains traitements par des extraits de plantes (phytothérapie) aux propriétés médicinales capables de stimuler le système immunitaire sont proposés pour soulager les symptômes d'infections respiratoires telles que rhume, grippe ou irritation des bronches. Certains composants des plantes (prébiotiques) peuvent aussi être des aliments pour les bactéries probiotiques. C'est pourquoi il est intéressant de combiner le probiotique avec les produits prébiotiques pour créer une synergie (la synbiotique) des effets bénéfiques pour la santé.

Devant le manque d'antiviraux spécifiques contre le VRS, il est capital de rechercher des alternatives thérapeutiques et les probiotiques en association avec des produits de phytothérapie sont des candidats intéressants. Notre hypothèse est qu'une intervention sur le microbiote peut modifier les réponses immunitaires au niveau des voies respiratoires. Dans ce contexte, nous pensons que l'infection VRS en période néonatale peut être impactée par cette stratégie d'immunomodulation.

Nous proposons dans ce projet de traiter préventivement par gavage quotidien des souriceaux BALB/c (modèle murin de référence pour étudier l'infection par le VRS) avec des probiotiques associés à des extraits végétaux plusieurs jours avant l'infection des animaux par le VRS humain. La protocole de gavage sur souriceaux fera l'objet d'un apprentissage préalable sur des animaux surnuméraires des élevages de l'établissement utilisateur (procédure 1). Les souriceaux seront infectés par voie intra-nasale après une anesthésie à l'âge de 21 jours par le virus VRS ou de la solution contrôle. La séquence du virus utilisé code la luciférase qui permettra de mesurer la multiplication/propagation du virus par un système d'imagerie du petit animal après injection intrapéritonéale d'un substrat luminescent (bioluminescence). L'effet du traitement sera ainsi évalué au cours du temps sur les animaux vivants en quantifiant la réplication virale par dosage de l'activité luciférase par bioluminescence (procédure 2).

Le VRS peut se répliquer dans les poumons des souris mais ne les rend pas cliniquement malades. Cependant, il est possible de mettre en évidence la réponse inflammatoire et immunitaire dans le poumon. La souris est un excellent modèle pour notre étude, de par sa sensibilité au VRS humain ainsi que la très forte similarité de la réponse immunitaire entre l'homme et la souris observée après infection. Des animaux seront euthanasiés à 1 ou 4 ou 10 jours post-infection pour permettre l'analyse de la réponse immunitaire dans les poumons et les fosses nasales. Nous définirons ainsi si le traitement préventif possède une activité anti-VRS.

Il n'existe pas à ce jour de modèles in vitro permettant l'étude de l'effet de probiotiques, agissant au niveau intestinal, sur la réponse immunitaire à une infection virale respiratoire. Le recours aux animaux est donc indispensable pour répondre aux questions scientifiques du projet.

La procédure n°1 nécessitera 10 souriceaux élevés avec 4 mères. La pertinence du succès d'une expérience repose sur la réalisation de tests statistiques bilatéraux sans a priori type ANOVA ou T-test. Ainsi, le nombre d'animaux estimé pour obtenir des résultats de la procédure n°2 et répondre à ces contraintes statistiques est de 18 animaux par groupe de traitement (6 groupes différents) et par temps d'analyse (3 temps post-infection) soit 324 souriceaux et 72 mères. Le projet s'étalera sur une période de 5 ans et nécessitera au maximum 334 souriceaux et 76 mères soit un total de 410 souris (individus nouveau-nés + mères).

Les souriceaux élevés avec leur mère (2 portées/cage) ainsi que les souris adultes auront à disposition du matériel pour nidifier (mouchoirs en papier et un igloo en carton par cage) depuis leur naissance jusqu'à leur sevrage. Ils seront alors sexés, sevrés et répartis dans de nouvelles cages (effectif 5 souris au maximum par cage) jusqu'à la fin de l'expérimentation. Les animaux seront observés quotidiennement avant le gavage à partir du 5^{ème} jour de vie et jusqu'à leur euthanasie par le personnel de l'animalerie, ce qui nous permettra d'intervenir rapidement si des signes de souffrance étaient constatés. Afin de réduire au maximum la douleur et le stress lors des analyses de bioluminescence, les animaux seront anesthésiés. Les animaux seront euthanasiés par une surdose d'anesthésiques. Avant l'euthanasie, les fèces seront récoltées. A l'autopsie, des lavages

broncho-alvéolaires seront réalisés et les poumons ainsi que les fosses nasales seront prélevés afin d'analyser différents paramètres immunologiques.

19577 **Objet :** la chirurgie bariatrique est de plus en plus fréquemment utilisée chez l'homme pour assurer un contrôle du poids et des co-morbidités associées. Il est remarquable de constater que certaines techniques de chirurgie bariatrique ont des effets spectaculaires sur le diabète de type 2 permettant une disparition rapide (en termes de quelques jours après la chirurgie) et indépendante de la perte de poids sans que les mécanismes exacts en soit connus. Mieux connaître les mécanismes d'amélioration post-chirurgicale du diabète indépendant de la régulation pondérale est important afin de a) mieux connaître la physiopathologie du diabète de type 2 et b) trouver de nouvelles cibles thérapeutiques futures qui bien individualisées pourraient bénéficier d'une stratégie pharmacologique et alors être mises en oeuvre sans avoir recours à la chirurgie.

Comme publié chez l'homme, la chirurgie d'anneau gastrique et de bypass-gastrique (les deux interventions les plus pratiquées chez l'homme) ont des effets différents. L'amélioration métabolique des souris diabétiques est dépendante de la perte de poids en cas d'anneau gastrique alors que la normalisation glycémique est observée en quelques jours après le bypass gastrique avant même toute perte de poids significative. Pour expliquer cet effet spécifique du bypass gastrique, nous avons démontré l'existence d'un certain nombre de mécanismes novateurs mis en jeu [changements du métabolisme intestinal, effets particuliers du GLP-1 sur la prise alimentaire, sur la sensibilité à l'insuline et sur la sécrétion d'insuline, importance du nerf vague dans cet effet métabolique et implication nécessaire du transporteur de glucose GLUT2].

Objectifs : Poursuivre le travail initial et caractériser les mécanismes mis en oeuvre dans la disparition du diabète après chirurgie avec 3 axes de recherche que nous souhaitons développer plus particulièrement. L'axe 1 comportera l'étude de la flore intestinale, de l'inflammation tissulaire en corrélation avec la restauration de la sécrétion d'insuline in vivo et in vitro (remodelage du pancréas endocrine). L'axe 2 comporte l'étude des facteurs sécrétés vers la circulation générale par les différents segments d'intestin, en particulier les protéines sécrétées qui seront identifiées dans les différents segments d'intestin et également dans le sang circulant. Parmi ces facteurs circulants nous étudierons dans l'axe 3 un candidat intéressant ACBP dont une publication récente issue du laboratoire montre sa régulation lors de l'obésité. Il s'agira d'analyser pour la première fois les variations de sa concentration circulante lors de la chirurgie bariatrique et d'étudier les effets de sa neutralisation par anticorps (injectés en intrapéritonéal pendant 30 jours) sur les effets bénéfiques de la chirurgie bariatrique sur les souris ob et les souris au régime gras.

Perspectives : Ce projet pré-clinique a pour but de déterminer par quels mécanismes biologiques, la chirurgie bariatrique corrige le diabète de type 2 en poursuivant le travail initialement réalisé. Dans cette étude, nous avons besoin d'intégrer les paramètres physiologiques dans leur ensemble et il est donc nécessaire de travailler sur un modèle vivant tel que la souris comme nous l'avons fait précédemment pour nos publications. Cette recherche est menée en parallèle à des recherches menées sur l'homme avant et après chirurgie bariatrique comportant des sérothèques qui permettront d'analyser et de valider des candidats circulants identifiés dans les modèles murins ainsi que des analyses des tissus intestinaux prélevés lors de la chirurgie.

Nombre d'animaux utilisés : 298 souris au total sur une période de 5 ans qui se répartissent en 160 souris ob/ob, 138 souris C57Bl6 (54 chow diet et 84 high fat diet). Le nombre de souris des groupes bypass (ob/ob et C57Bl6) est systématiquement supérieur au nombre de souris dans les autres groupes (sham ob/ob, et C57Bl6 sham) du fait des risques qu'impliquent cette opération. En effet, le modèle d'étude choisi est celui de la souris ob/ob qui est hyperobèse et diabétique. Ce modèle présente une fragilité concernant l'anesthésie que nous maîtrisons actuellement suite à la mise au point des paramètres opératoires dans ce modèle. Le nombre de souris a été calculé en tenant compte de la mortalité post-opératoire précoce de 30% dans ce modèle (dans les 3 jours post-opératoires par infection le plus souvent par infection prévenue par l'administration d'une antibiothérapie pré-opératoire). Le modèle de la souris ob/ob est essentiel pour l'étude du diabète de type 2 du fait de la présence d'anomalies anatomiques et fonctionnelles du pancréas endocrine, d'une insulino-résistance et d'une obésité observée également dans le diabète de type 2 humain.

Ces anomalies ne peuvent être reproduites complètement dans le modèle de souris C57Bl6 nourries au régime gras. D'autre part, des souris C57Bl6 non diabétiques et de poids normal seront également étudiées sur le plan métabolique dans cette recherche en tant que groupe contrôle non obèse (nous avons déjà réalisé cette chirurgie dans ce modèle et montré qu'il n'y a pas de détérioration métabolique induite, publication en préparation). A noter que dans ces modèles, la mortalité post-opératoire précoce (3J) est de 15% pour l'EGA et 10% pour le sham. La stratégie des 3R sera respectée. Avant la chirurgie, les animaux sont acclimatés à l'animalerie 7 jours et sont habitués à être manipulés dans les jours précédents. Les souris seront opérées avec une anesthésie à l'isoflurane. Lors et après la chirurgie un traitement analgésique sera administré pendant au moins 72 heures afin de réduire la souffrance des animaux (évaluée quotidiennement). Les animaux sont euthanasiés en post-opératoire chaque fois qu'une souffrance est évoquée (animal prostré, marchant avec difficultés, alité, ne s'alimentant plus). Enrichissement du milieu envisagé : les animaux restent groupés par 4 à 5 (comme à leur arrivée dans l'animalerie) et l'enrichissement de leur milieu s'effectuera avec du coton.

19578 Les anticorps sont des molécules qui ont la propriété de se "mouler" sur leur cible. Ils peuvent être générés par des processus de vaccination. En effet, ils sont sécrétés par des cellules du système immunitaire qui peuvent être isolées, immortalisées, et clonées. Les anticorps monoclonaux sont alors utilisés comme médicament à "action ciblante", ou en recherche pour "détecter" le produit étudié ; dans des domaines très variés allant de l'agronomie à la santé humaine.

La génération d'hybridome ne requière l'utilisation d'animaux que pour les étapes d'immunisations, ce qui correspond à une vaccination. Les autres étapes, comme la fusion cellulaire, les clonages ou la production d'anticorps, sont réalisés sans utilisation d'animaux. D'autre part, les méthodes alternatives, qui nécessitent de grandes ressources, ne permettent pas toujours d'obtenir des anticorps dirigés contre des structures natives (ex virus). De plus, les anticorps obtenus ne sont généralement pas de haute affinité et / ou grande spécificité, en raison de l'absence du mécanisme d'hypermutation somatique qui permet la maturation des anticorps in vivo.

Le principe de la vaccination est utilisée pour générer ces outils, mais lorsque les antigènes sont très conservés entre les espèces, il est souvent difficile d'induire une réponse immunitaire. Plusieurs stratégies ont été proposées pour contourner ce problème, dont l'immunisation soustractive. Cette méthode repose sur un procédé en deux étapes : provoquer une tolérisation avant d'immuniser avec la protéine d'intérêt.

Nous avons pour objectif de mettre en place un protocole permettant d'utiliser cette technique pour des projets dont l'antigène d'intérêt est hautement conservé entre les espèces. A terme, il est envisageable que ce protocole soit généralisé à l'ensemble des projets si son utilisation permet de réduire le nombre d'animaux nécessaires à l'obtention d'anticorps monoclonaux de haute spécificité.

Pour ce projet réalisable sur 5 ans, le nombre maximal d'animaux prévu est de 180 souris, en adéquation avec la règle des 3R :

- Remplacer : une recherche bibliographique exhaustive a été réalisée pour définir les conditions expérimentales de cette nouvelle méthode d'immunisation contre des antigènes hautement conservés. Le recours à des animaux est donc indispensable pour valider ce protocole.
- Réduire : afin de réduire le nombre d'animaux nécessaires, le nombre d'animaux est calculé pour garantir des résultats statistiques significatifs, sans perte de puissance des tests. Ainsi, pour chaque antigène et par type d'immunisation, chaque lot sera constitué de 6 animaux au maximum.
- Raffinement : les animaux sont élevés dans des conditions adaptées (locaux confinés, portoirs ventilés, eau et nourriture ad libitum), avec un maximum de 5 animaux/cage (et aucun animal maintenu seul dans sa cage). Pendant les procédures expérimentales, les animaux sont surveillés par du personnel qualifié, et des injections d'analgésique sont prévus pour réduire la douleur. Lors des prélèvements sanguins, l'utilisation d'anesthésie gazeuse est prévue pour réduire le stress des animaux. Enfin, des points limites sont également décrits.

19579 Au cours de la dernière décennie, le nombre de transplantations pulmonaires a largement augmenté dans le monde. Cependant, le nombre de patients éligibles à une transplantation pulmonaire dépasse largement le nombre d'organes disponibles. Cela s'explique, d'une part, par la pénurie de donneurs d'organes et, d'autre part, par un faible taux d'utilisation des poumons de ces donneurs.

La PPEV (perfusion pulmonaire ex-vivo) utilisée en routine clinique a montré que la méthode était sûre et reproductible pour une optimisation de la fonction pulmonaire de greffons dont toutes les caractéristiques ne sont pas optimales. Cette technique permet aussi l'évaluation des greffons pulmonaires provenant de donneurs décédés après arrêt circulatoire (DDAC) de la catégorie 3 de la classification de Maastricht, considérés comme étant à risque élevé de dysfonction post-transplantation pour n'avoir pas été vascularisés durant une période prolongée à température ambiante. Cependant la PPEV, est limitée à quelques heures car le greffon se dégrade au cours de la procédure. Une des explications de la détérioration des greffons pulmonaires réside dans l'absence de maîtrise des désordres biochimiques (perturbation du taux de sodium, potassium, chlore...) induits par cette méthode de perfusion d'organe isolé dans un circuit clos. Nous allons donc tester dans un modèle porcin de donneurs décédés après arrêt circulatoire l'impact de la normalisation du contenu hydro-électrolytique du perfusât en branchant en parallèle au circuit classique de PPEV une dialyse régulatrice pour stabiliser l'homéostasie en cours de la procédure et ainsi essayer d'augmenter la durée de survie et la qualité des greffons. Nous procéderons de deux façons distinctes avec trois groupes dans chaque. L'une avec prélèvement et perfusion immédiate du poumon et l'autre avec prélèvement et mise sur glace pour 24 heures puis perfusion du poumon. Dans un premier groupe témoin nous utiliserons au maximum 10 porcs pour chaque branche (20 animaux) qui seront perfusés avec un liquide sur lequel aucune modification ne sera apportée au cours de la procédure, tandis que dans un deuxième groupe composé de 10 porcs maximum pour chaque branche (20 animaux) nous utiliserons un liquide de Steen avec PPEV identique à la routine humaine (renouvellement d'un tiers du liquide toutes les deux heures). Le troisième groupe de 10 porcs maximum pour chaque branche (20 animaux) sera perfusé selon une technique d'ultrafiltration, soit un total de maximum 60 animaux. Après un court séjour dans nos locaux (moins de 15 jours) avec repas deux fois par jours avec surveillance, chaîne et jouet à disposition, les animaux sont euthanasiés après anesthésie pour prélèvement du cœur et des poumons en mono bloc.

19580 Les acides gras polyinsaturés (AGPI) sont des constituants majeurs des membranes des neurones. Ce sont des lipides essentiels qui ne peuvent être fournis que par l'alimentation. Des altérations des taux d'AGPI ont été décrites dans plusieurs pathologies psychiatriques, en revanche, l'implication de ces altérations dans les symptômes reste à démontrer. Ces dernières années, nous avons pu montrer qu'une déficience en AGPI n-3 chez la souris durant le développement prénatal induit des déficits de motivation à l'âge adulte. Cette altération comportementale est directement liée à un dysfonctionnement d'un système cérébral central pour la motivation, le "système mésolimbique". Le but de ce projet est de déterminer quelles sont les populations de neurones au sein de ce système de neurotransmission qui sont impliquées dans ces déficits comportementaux observés. Pour cela, nous utiliserons une approche transgénique qui permettra de manipuler les taux d'AGPI uniquement dans certaines populations neuronales.

Afin de tester la motivation, les souris adultes seront soumises à des tests comportementaux de conditionnement opérant.

Nous prévoyons d'utiliser 576 souris C57BL/6J (288 mâles et 288 femelles), ce projet s'étendant sur une durée de 3 ans et nécessitant l'utilisation de 4 génotypes pour chaque croisement.

L'ensemble des procédures proposées est en conformité avec les directives européennes 2010/63/UE et françaises, dans le respect des nouveaux standards de soin et de bien-être des animaux (règle des 3Rs), appliqués dans notre équipe de recherche : régulation de la température, de l'hygrométrie, raffinement de l'enrichissement des cages pour améliorer leur hébergement. Ce projet ne peut être réalisé sans l'utilisation de modèles animaux puisqu'il s'intéresse à des dimensions comportementales, non modélisables sur des modèles in vitro ou in silico. Les recherches seront réalisées en accord avec les recommandations institutionnelles pour le bon

traitement des animaux de laboratoire. Tous les efforts seront faits pour réduire le nombre et la souffrance des animaux utilisés afin d'éviter les répétitions inutiles.

19581 Les chevaux sont infestés par une faune variée de strongles digestifs, responsables d'amaigrissement, de coliques. La gestion de cette faune repose sur l'administration de vermifuges. L'efficacité de ces molécules est aujourd'hui réduite en raison de l'émergence de parasites résistants. Pour pallier à ce problème, la mise en œuvre de schéma de vermifugation sélective ciblée des chevaux les plus sensibles reste la stratégie la plus durable. Nos travaux ont démontré que certains chevaux étaient intrinsèquement plus sensibles que d'autres à l'infestation par les cyathostomes. Cette réponse différentielle semble tenir à des variations dans leurs populations de globules blancs (monocytes, neutrophiles). Notre projet vise à qualifier les différences fonctionnelles des populations cellulaires des deux groupes d'animaux. Cela nécessite la réalisation de prise de sang pour extraire les globules blancs et concernera 4 ponettes résistantes et 6 ponettes sensibles aux infestations.

Réduction: l'étude cible les seuls individus aux profils les plus divergents afin de maximiser les effets observés tout en minimisant les effectifs.

Raffinement: Les animaux sont maintenus afin de préserver leur groupe social. Afin de minimiser le stress et de ne pas isoler les animaux durant les procédures, les animaux sont gérés au minimum en paire. Le projet s'appuie sur les observations d'un précédent projet.

Remplacement: il n'existe pas de méthode alternative comprendre les déterminants sous-jacents aux différences de potentiel de sensibilité aux strongles entre des individus sélectionnés.

19582 La césarienne est un acte couramment réalisé chez les ruminants en pratique vétérinaire rurale. Il est donc important qu'un étudiant vétérinaire puisse apprendre et pratiquer cet acte chirurgical au cours de ses études avant de devoir le réaliser sur des animaux de propriétaires. De manière plus large, cet enseignement de 4ème année permet la mise en pratique des gestes et attitudes de base de la chirurgie des grands animaux (tranquillisation, anesthésie - analgésie, nettoyage - désinfection, conditions d'asepsie, incisions, sutures. . .), dont la théorie est enseignée en 2ème et 3ème année du cursus (Art. R. 214-105 - alinéa 1 - f du code rural modifié par le décret 2013-118). Le projet présenté s'inscrit également dans l'apprentissage de la gestion de la douleur animale, de son évaluation à son traitement. Il suit ainsi les recommandations éthiques et scientifiques les plus récentes pour permettre l'enseignement et la mise en œuvre des protocoles d'anesthésie et d'analgésie adaptés au statut des animaux et à l'intervention réalisée.

Afin de limiter le nombre d'animaux, il est prévu de n'utiliser qu'1 brebis par groupe de 2 ou (plus souvent) 3 étudiants, soit environ 60 à 70 brebis par an, soit maximum 350 brebis sur 5 ans.

19583 Les petits ruminants (ovins et caprins) s'adaptent naturellement aux conditions extrêmes, en particulier dans les zones montagneuses ou fortement vallonnées. Ils disposent d'une résilience naturelle, c'est-à-dire d'une capacité à maintenir ou récupérer rapidement une production et une bonne santé après une exposition à diverses épreuves nutritionnelles et infectieuses. Leur élevage valorise des territoires souvent défavorisés où aucune autre agriculture d'élevage ou de culture n'est possible. Aujourd'hui, les élevages ovins et caprins souffrent néanmoins d'un manque d'innovation et d'attractivité, en particulier pour améliorer l'efficacité de l'animal, c'est-à-dire ses capacités à mieux valoriser les ressources alimentaires à sa disposition (mobilisation des réserves corporelles, limitation des émissions de gaz, ...). Actuellement, en période de conditions climatiques extrêmes, l'utilisation de céréales, au coût élevé et fluctuant, devient parfois indispensable pour compléter la ration des animaux. Dans ce cas, il y a conflit entre les ressources nécessaires à l'alimentation animale et humaine. La sélection génétique des animaux est un levier pour prendre ces problématiques en compte, en intégrant dans les objectifs de sélection la résilience et l'adaptation à un élevage extensif.

Le projet s'appuie sur de nouvelles approches afin d'améliorer la résilience et l'efficacité de l'élevage ovin. Celles-ci seront développées par prise en compte de nouveaux caractères

phénotypiques et génétiques, puis l'établissement de nouvelles stratégies de sélection pour différentes races et environnements.

Ces caractères clés concernent principalement l'efficacité nutritionnelle, la résistance aux maladies et le bien-être.

Le projet évalue la variabilité génétique et génomique structurant les caractères liés à la résilience et à l'efficacité. Cette variabilité sera associée à l'efficacité et la rentabilité dans différents environnements (systèmes conventionnels, agro-écologiques et agricultures biologiques).

Il en résultera des prédictions génomiques précises pour les caractères de résilience et d'efficacité dans les différents environnements à travers différentes races et populations.

L'impact global du projet sera la création d'outils de sélection pratiques et efficaces pour rendre résiliente la production de petits ruminants.

Le projet comporte le suivi continu de 170 ovins (137 brebis et 33 agnelles) dont les caractéristiques de santé et de production sont mesurées avec précision. Des prises de sang seront effectuées au cours de la carrière de l'animal pour mesurer certains paramètres physiologiques indiquant le bilan énergétique ou le diagnostic de gestation.

Le projet s'efforce de réduire le nombre d'ovins utilisés. Ainsi, seulement une partie du troupeau expérimental de brebis est intégrée dans le dispositif.

Le protocole s'efforce également d'améliorer les procédures. Ainsi, les animaux ne sont pas logés en stalle individuelle mais vivent en groupe. Enfin, pour cette étude à visée agricole, des méthodes alternatives ne peuvent pas être envisagées.

19584 La douleur est un processus physiologique nécessaire à la survie : elle prévient l'organisme d'un danger imminent et permet la mise en œuvre de réponses adaptées qui visent à en limiter les effets délétères. Cependant, lorsque la douleur est chronique ou persistante, elle devient alors pathologique car elle n'offre plus aucun avantage mais provoque au contraire une extrême souffrance. C'est notamment le cas des douleurs neuropathiques ou inflammatoires qui apparaissent suite à une lésion ou inflammation du système nerveux périphérique ou central. Les traitements disponibles ne sont souvent que partiellement efficaces et peuvent s'accompagner d'effets secondaires importants. Il est donc essentiel de découvrir de nouveaux traitements, et pour ce faire, de disséquer les mécanismes responsables de la genèse d'une douleur chronique. Parmi les symptômes douloureux, il existe l'allodynie qui correspond à une douleur provoquée par une stimulation normalement non douloureuse qui peut être déclenchée suite à une inflammation. En temps normal, les informations tactiles et douloureuses n'aboutissent pas au même niveau de la moelle épinière ou du tronc cérébral, les deux modalités sensorielles (tact et douleur) sont donc normalement séparées. En conditions pathologiques, par exemple lors d'une allodynie, l'information tactile devient capable d'activer des neurones nociceptifs, grâce à un circuit qui implique plusieurs cellules. Le tact va alors devenir douleur (allodynie mécanique). Ce processus va provoquer l'activation de plusieurs populations neuronales et implique également une population spécifique de cellules gliales, les astrocytes. Cependant, peu de choses sont connues sur ces cellules et leur implication dans le déclenchement de l'allodynie lors d'une inflammation. L'objectif général de ce projet va consister à étudier l'implication des astrocytes et plus précisément l'expression de marqueurs spécifiques des astrocytes (notamment des canaux potassiques astrocytaires), dans un modèle de douleur inflammatoire chronique faciale. Ce projet combinera des études comportementales et de quantification protéique chez la ratte et le rat (minimum 4 semaines). Le but de cette étude est de comparer les résultats obtenus chez le mâle et chez la femelle. Il présente donc un intérêt fondamental, et également un intérêt plus appliqué en permettant éventuellement de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques visant à diminuer les douleurs pathologiques chez l'homme. Cette étude nécessitera l'utilisation de 60 animaux sur 1 an, afin de s'assurer une étude significative réalisée sur des animaux femelles (cycle hormonal à prendre en compte) et d'effectuer un décours temporel dans l'apparition et le maintien de l'allodynie mécanique. Pour respecter la règle des 3R, le nombre d'animaux a été réduit au maximum à partir de l'expérience dans le domaine et des tests statistiques donnant le nombre nécessaire pour la discrimination des effets.

De plus, comprendre la physiologie de la douleur nécessite l'utilisation du modèle animal. Ainsi, aucune méthode alternative actuelle ne permet de remplacer les protocoles nécessaires à la réalisation de ce projet. Au cours des procédures expérimentales, les animaux seront anesthésiés. Et pendant l'expérimentation, une observation régulière des points limites, tels qu'une perte de poids et/ou un déficit moteur, sera effectuée. En cas d'atteinte de ces points, l'animal sera retiré de l'expérimentation, par euthanasie de l'animal afin de lui éviter toute souffrance. Enfin, les animaux seront 3 par cage de 800 cm² (enrichissement social) dans l'animalerie thermorégulée (22±1 °C), avec hygrométrie contrôlée et cycle de lumière inversé (lumière de 19h à 7h). L'accès à la nourriture et à l'eau sera ad libitum et un changement de litière sera effectué 2 fois par semaine.

19585 Les populations de truites communes, espèce autochtone des ruisseaux de têtes de bassin, sont fortement affectées par de nombreuses pressions anthropiques : pratiques agricoles, assainissement, réchauffement climatique, déficit de continuité écologique. . . Les études génétiques préalablement réalisées montrent que la connexion entre les milieux est un paramètre essentiel de la résistance d'une espèce sur un bassin versant.

L'objectif du présent projet est d'évaluer la franchissabilité d'un nouvel aménagement piscicole (passe à poisson et bras de contournement d'un ouvrage transversal), par la population autochtone de truites communes. Le cours d'eau ciblé par cette étude n'héberge que la truite commune (*Salmo trutta*) comme espèce piscicole.

Aussi, il est proposé de procéder au marquage d'individus de truites (>10 cm) et de suivre leur déplacement aux abords de cet ouvrage au moment de la reproduction (déplacement des géniteurs, facteurs déclencheurs, comportement des différentes cohortes), mais aussi en dehors de cette période afin d'observer différents aspects de la dynamique de l'espèce (colonisation de zones refuges en cas d'étiage sévère, survie et croissance des juvéniles).

Afin de suivre ces déplacements, des individus de truites communes (*Salmo trutta*) seront capturés au moyen d'opérations de pêche puis pesés, mesurés et marqués sous anesthésie générale, via l'emploi de marques semi-actives de petite taille (12 à 23mm) adaptées à la taille des individus. Après marquage et réveil, les individus seront relâchés sur le site de capture afin d'en suivre les déplacements par recherche mobile et fixe (au moyen d'antennes).

Ces observations se feront en lien avec le suivi de facteurs abiotiques pouvant influencer cette dynamique (température de l'eau, variations de débit). Il est en effet établi que la truite commune réalise des migrations plus ou moins longues afin de réaliser son cycle de vie, notamment pour la reproduction. Toutefois peu de données existent sur les déplacements effectués par les individus en période de stress hydrique ou de réchauffement.

Cette étude rentre non seulement dans le cadre d'évaluation de la franchissabilité d'un obstacle équipé, mais aussi dans un objectif d'amélioration des connaissances de l'espèce.

Nous avons veillé au respect de la règle dite des " 3R " :

- "R" de "Remplacement"

La question écologique posée est d'étudier le comportement individuel de déplacement des individus de truite commune sauvage d'une même population notamment en phase de migration de reproduction, de remplacement post reproduction et de phase d'étiage. Ces déplacements pouvant être longs, il n'est pas envisageable de réaliser cette étude en conditions contrôlées avec des poissons d'élevage qui ne reproduiraient pas le comportement des poissons sauvages. De même, les calculs théoriques de fonctionnalité d'une passe à poissons ne sont absolument pas une garantie d'efficacité, et l'obligation de résultat sur ce dispositif est essentielle.

- "R" de "Réduire"

La taille de l'échantillon doit être suffisante pour dégager des résultats fiables et statistiquement interprétables. Aussi, la capture de 300 individus de truites (>10 cm), pour marquage, répond à ces exigences. Le nombre d'individus est relativement important afin de pouvoir étudier précisément la réponse de chaque cohorte aux variations des conditions abiotiques et de déplacement de reproduction.

- "R" de "Raffiner"

Toutes les manipulations se feront sous anesthésie par du personnel qualifié sur le site d'étude. Les points limites sont suffisamment prédictifs et précoces pour limiter la souffrance de l'animal au cours de l'expérimentation. En amont de la procédure chirurgicale, les poissons choqués lors de la pêche électrique ou présentant une dépigmentation anormale seront remis directement au milieu naturel et seront exclus du protocole.

L'ensemble des poissons ne sera remis à l'eau qu'après contrôle de l'état sanitaire et récupération totale de l'anesthésie.

19586 La transplantation d'organe consiste à remplacer un organe non fonctionnel par un organe provenant d'un donneur (vivant ou décédé) de la même espèce mais génétiquement différent. Un des principaux risques après une transplantation est le rejet de l'organe greffé. Celui-ci résulte de la capacité du système immunitaire du receveur à reconnaître comme étranger le tissu transplanté. Actuellement, on considère que les lésions de rejet sont principalement le fait des effecteurs de l'immunité adaptative, spécifiques du greffon : les lymphocytes T et les anticorps dirigés contre le greffon. Les lésions causées par les anticorps sont considérées actuellement comme la première cause de perte des greffons. La voie classique de production des anticorps dépend uniquement des cellules du receveur de la greffe.

Récemment, il a été mis en évidence, dans un modèle de transplantation cardiaque, une nouvelle voie permettant la génération d'anticorps et impliquant les lymphocytes T du donneur contenues dans le greffon au moment de la transplantation. Cependant, les mécanismes moléculaires qui régissent cette voie sont peu connus, et notamment les mécanismes par lesquels les cellules du donneur et les lymphocytes B du receveur coopèrent pour permettre la production d'anticorps par cette voie.

Ce projet vise à explorer les mécanismes moléculaires impliqués dans cette voie de production d'anticorps.

Pour réaliser ce projet, il est prévu de mimer l'immunisation induite par une transplantation cardiaque par l'injection de cellules et de protéines étrangères du donneur par voie intraveineuse à des souris, après anesthésie, et de suivre la production d'anticorps par prélèvement de sang veineux chez les souris receveuses.

Ce projet devrait permettre, en se passant de la chirurgie, d'acquérir des données nouvelles pour comprendre comment sont produits les anticorps après transplantation. Ceci permettra de développer à l'avenir des moyens de prévenir l'apparition de ces anticorps, limiter leurs effets délétères sur les greffons et augmenter la durée de vie des greffons. Il s'agit d'un objectif prioritaire en transplantation compte tenu de la pénurie d'organe.

Ce projet ne peut être mené sans l'utilisation d'animaux car le système immunitaire est un système biologique extrêmement complexe, et les interactions cellulaires qui aboutissent à la production d'anticorps ne peuvent avoir lieu qu'au sein de l'architecture d'un ganglion ou de la rate, ce qui est impossible à reproduire in vitro.

Les prélèvements sanguins et injections seront réalisés sous anesthésie afin de limiter la souffrance et le stress chez les animaux.

Des calculs d'effectifs ont permis d'établir le nombre minimal d'animaux par groupe pour que les résultats soient significatifs.

Le bien-être des animaux sera analysé et pris en compte tout au long du protocole avec un suivi adapté en termes de fréquence et de détermination des points limites (comportement notamment). Bien qu'aucune douleur ne soit attendue dans ce protocole, les points limites ont tout de même été définis afin d'intervenir en cas de nécessité.

Au total, le nombre d'animaux nécessaires à ce projet est de 66 souris (*mus musculus*).

19587 Le système immunitaire est activé en cas d'infection par les bactéries et les virus mais également au cours du développement de cancer. Plusieurs études se sont déjà attachées à identifier le rôle

des différents globules blancs au cours d'un cancer et d'autres études ont montré que la chimiothérapie pouvait moduler les proportions des différentes populations de globules blancs. Des résultats préliminaires obtenus dans l'équipe montrent que le Cisplatine (une chimiothérapie utilisée dans le traitement des cancers du poumon) recrute des populations particulières de globules blancs, appelés ILC3. Les données de la littérature indiquent que les ILC3 pourraient être à l'origine d'une réponse immunitaire anti cancéreuse efficace. C'est pourquoi nous souhaiterions étudier l'impact de ces cellules sur la réponse anti tumorale.

Les ILC3 partageant l'expression de nombreuses molécules avec un autre type cellulaire, les lymphocytes Th17, il est primordial de pouvoir discriminer ces deux types cellulaires. A travers différents modèles de souris, nous développerons des souris possédant soit uniquement des ILC3 soit des Th17. Nous pourrions alors vraiment discriminer l'impact de ces deux types de cellules sur l'efficacité antitumorale du cisplatine lors d'expériences de croissance tumorales. Les résultats seront mis en perspective avec ceux obtenus dans des souris de type sauvages C57Bl6, possédant des ILC3 et des Th17. Nous utiliserons un modèle de tumeur : TC-1 (lignée de cancer du poumon) qui possède un fort infiltrat en globules blancs après traitement par cisplatine. La croissance tumorale sera suivie 3 fois par semaine et les souris seront mises à mort à la fin de la croissance tumorale, lorsque les tumeurs auront atteint un grand axe de 20mm.

La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R. Tout d'abord, les expériences ne seront répétées que deux fois et nous avons fait appel à une méthodologiste afin de déterminer au mieux le nombre minimal de souris requis pour que nos tests statistiques soient suffisamment puissants ce qui permet donc de réduire le nombre d'animaux de l'étude. Des études préliminaires ont été réalisées sur les cultures de cellules in vitro limitant ainsi l'utilisation d'animaux (remplacement). Enfin, la totalité des procédures impliquant un inconfort potentiel des animaux (injections sous-cutanées des tumeurs, traitements et sacrifice) seront réalisées sous anesthésie, les souris bénéficieront de cages enrichies en jouet et elles seront habituées aux méthodes de contention et aux mesures par pied à coulisse avant le début de l'expérimentation permettant ainsi le raffinement de l'étude. Les souris seront suivies quotidiennement et évaluées grâce à une grille de notation spécifiant les points limites. Les soins post-opératoires seront arrêtés après reconstitution complète du système immunitaire, soit 10 semaines après irradiation. Les souris seront maintenues dans des cages ayant un milieu enrichi. Cette étude nécessitera 240 souris C57Bl6.

19588 Le cancer de l'estomac peut disséminer à d'autres organes (poumons, foie) formant des métastases. Celles-ci atteignent fréquemment le péritoine, qui est la membrane recouvrant tous les organes intra-abdominaux et les muscles de la paroi abdominale. Ce niveau d'atteinte métastatique rend le pronostic très sombre car souvent non accessible à la chirurgie et aux chimiothérapies par voie intraveineuse. Une technique thérapeutique récente propose l'administration de chimiothérapie sous forme d'aérosol directement au contact de ce péritoine au cours d'une vidéochirurgie mini-invasive (ou coelioscopie). Cette technique appelée PIPAC laissant l'aérosol au contact du péritoine pendant 30 mn (temps de pose) a déjà été validée par de nombreuses études et est actuellement utilisée chez l'homme en clinique. Un nouveau procédé vise à intensifier l'action de la PIPAC en utilisant un champ électrostatique au moment de l'injection d'aérosol, la ePIPAC, et permettrait de diminuer le temps de pose de 30 min à 6 min. Aucun travail n'a actuellement étudié la durée optimale et le but de notre projet est de déterminer cette durée en utilisant un modèle de métastases chez le lapin. Les procédures seront réalisées sous anesthésie générale et en accord avec les règles de bien-être animal. L'efficacité des différents temps de pose sera jugée sur la régression tumorale par analyse microscopique après prélèvements. Pour des raisons techniques (physiologiques et anatomiques), cette étude ne peut se réaliser que sur modèle animal, la culture cellulaire ne pouvant être suffisamment informative. De nombreux travaux en amont ont déjà été réalisés (in vitro, sur modèle rat ou lapin) pour définir les posologies et la technique de PIPAC en elle-même.

Le projet d'une durée de 3 ans utilise 55 femelles (lapin) nourries et abreuvées à volonté : 5 animaux feront partie du groupe porteur pour le maintien du modèle tumoral et permettront d'obtenir une tumeur supra-centimétrique injectée dans la patte arrière nécessaire pour ensemençer par voie

gastrique les 48 autres lapins. 2 lapins supplémentaires ne sont pas attribués en cas de décès prématuré. Les 48 lapins sont répartis dans 8 groupes traités par Dox-Cis et témoins (sérum physiologique) de façon à ce que la taille des échantillons permette la réalisation de tests statistiques de type ANOVA à 2 facteurs en limitant les biais et diminuant le risque de non significativité. Toute la démarche scientifique a été établie afin de respecter la règle des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer) et obtenir des résultats en utilisant le moins d'animaux possible. Le raffinement des expériences est assuré par la mise en place de points limites pour éviter l'inconfort et la douleur des lapins. Ainsi, toutes les dispositions visant à prévenir le stress et la douleur seront prises en compte et en charge par un suivi quotidien des animaux sur la base d'une grille d'évaluation établie avec les expérimentateurs et les animaliers. Après la chirurgie, l'analgésie couvrira au moins les premières 72h, et un type multimodal est privilégié. L'administration d'analgésiques peut être répétée lorsque nécessaire.

Cette étude permettra d'optimiser la technique chez l'homme et d'améliorer les résultats thérapeutiques pour cette maladie non curable actuellement.

19589 Les nématodes parasites du tube digestif, dont les strongles gastro-intestinaux (SGI), sont une contrainte majeure pour l'élevage des ovins et caprins en système pâturant en raison des pertes de production et de la mortalité qu'ils occasionnent. Plus précisément, ils peuvent entraîner une réduction significative de l'ingéré se traduisant par des pertes de gain de poids moyen quotidien (GMQ). Leur contrôle repose actuellement sur l'emploi systématique de molécules à activité anthelminthique (AH). Toutefois, l'utilisation intensive de ces molécules pendant des décennies a conduit à l'émergence de résistances voire de multirésistance (résistance à plusieurs familles d'AH en même temps) chez certaines populations de parasites. De plus, l'écotoxicité d'une classe particulière d'AH, les lactones macrocycliques, est maintenant bien documentée et acceptée de tous, laboratoires producteurs compris.

Dès lors, il nous faut repenser complètement notre approche du contrôle de ces parasites. Une lutte intégrée combinant une utilisation rationnelle et prudente des AH avec des méthodes non chimiques (conduite du pâturage, sélection génétique d'animaux résistants, alicaments...) est actuellement proposée pour permettre un contrôle durable des SGI et une moindre diffusion de la résistance aux AH.

L'utilisation rationnelle des AH consiste à n'appliquer un traitement AH qu'aux seuls animaux qui en ont vraiment besoin (traitement ciblé sélectif). En effet, dans un troupeau ovin, le parasitisme par les SGI est réparti de façon très hétérogène entre les individus : certains hébergent peu voire très peu de parasites et n'en souffrent pas ou très peu quand d'autres en hébergent beaucoup. Afin de freiner la diffusion de la résistance aux AH dans les élevages, il faut donc pouvoir identifier les individus qui nécessitent un traitement. Un outil permettant de contrôler régulièrement le poids et l'embonpoint des animaux serait alors d'une grande utilité pour développer une stratégie de traitement ciblé sélectif.

L'objectif initial de ce projet est d'évaluer le potentiel de l'auto-pesée pour détecter les animaux parasités par les SGI qui présenteraient des trajectoires de gains de poids quotidien déficitaires par rapport à des individus témoins non infestés. Toutefois, s'agissant d'agneaux, des contraintes techniques ne sont pas encore résolues à l'heure actuelle car beaucoup se montrent réticents à pénétrer dans le dispositif d'auto-pesée. Aussi, en attendant que cette difficulté technique soit levée, l'expérimentation du début de l'année 2021 permettra d'obtenir des valeurs de référence utiles à l'aide de pesées fixes quotidiennes lorsqu'on abordera dans un deuxième temps un dispositif d'auto-pesée rénové et plus facile d'utilisation par les agneaux.

Pour cela, une infestation expérimentale avec une espèce de nématode, *Haemonchus contortus*, sera réalisée sur la moitié des animaux de l'expérience tandis que l'autre moitié recevra un placebo. Des mesures hématologiques et coprologiques permettront de confirmer que le parasite s'est bien implanté dans le lot infesté. L'évolution des poids quotidiens sera comparée dans les deux groupes sur une période de 35 jours.

Le nombre d'agneaux mâles et femelles dans chaque lot (infesté et non infesté) doit-être suffisant pour permettre une comparaison statistique des données de pesées lors de l'infestation. Au total, nous utiliserons 2 x 30 animaux, soit 60 en tout. 3 R : 1- Remplacer : On ne peut pas remplacer l'hôte (le mouton) pour la réalisation du cycle parasitaire et l'étude de l'impact de l'infestation sur le gain de poids des animaux. 2- Réduire : Le nombre d'animaux prévus dans l'expérimentation a été limité au maximum pour avoir un effectif garantissant l'interprétation des données. 3- Raffiner : Les agneaux sont hébergés sur une litière paillée et en lots de manière à pouvoir exprimer leurs comportements sociaux. Petit à petit, ils vont s'habituer à être manipulés et les prélèvements seront réalisés par du personnel expérimenté.

19590 Les anticorps monoclonaux (AcM) sont des molécules dérivées du système immunitaire qui ont un fort potentiel thérapeutique (thérapies ciblées). Une quarantaine sont utilisés pour traiter le cancer et les maladies inflammatoires et plus de 300 sont en cours de test clinique. Ils sont maintenant aussi considérés avec un intérêt grandissant pour traiter les infections virales graves comme celles par le VIH (virus de l'immunodéficience humaine), Virus de la grippe, Ebola, Zika, Cependant, leurs conditions d'utilisation ne sont pas encore optimisées. L'amélioration des immunothérapies par des AcM est donc un enjeu médical majeur. L'une des découvertes importantes de ces dernières années a été la mise en évidence que le traitement par des AcM des animaux infectés et/ou développant des tumeurs, peut induire une immunité protectrice à long-terme. En d'autres termes, les animaux infectés, ou présentant des tumeurs, et traités par AcM survivent sans signes pathologiques grâce à l'induction d'une forte réponse immunitaire protectrice dirigée contre le virus et/ou la cellule tumorale. Dans ce cadre, il est maintenant important d'identifier les mécanismes impliqués afin d'optimiser, à terme, l'efficacité thérapeutique des futures immunothérapies par AcM. Ceci, qui est le but principal de l'ensemble de nos recherches, n'est pas réalisable chez l'Homme. Pour progresser dans cette perspective, les expérimentations animales sont donc indispensables.

Notre projet, qui vise à réaliser une étude des mécanismes impliqués dans l'induction d'une immunité protectrice par les AcM, se déroulera sur 1 an. Il inclura 1 procédure permettant d'étudier le rôle des interférons de type I (IFN-I) via l'inactivation fonctionnelle du récepteur de cette cytokine (souris génétiquement invalidées pour le récepteur à l'IFN-I)

Nos études portent sur des modèles animaux (rongeurs) d'infections virales. Les animaux utilisés sont des souris pour lesquels des données scientifiques de la réponse immunitaire sont bien établies et de nombreux outils sont disponibles pour étudier de façon approfondie la réponse immunitaire, ceci avec un recul statistique. En utilisant ces modèles, nous évaluons les mécanismes d'action des AcM chez des animaux infectés et traités par AcM thérapeutiques. Des études sont bien entendu réalisées en parallèle chez des animaux contrôles qui servent de référence. La compréhension des mécanismes impliqués dans l'induction d'une telle réponse immunitaire protectrice à long-terme par les AcM permettra le développement de thérapies antivirales et anticancéreuses plus efficaces. Ceci se traduira par un bénéfice direct pour les patients.

Nos travaux combinent des approches immunologiques et histologiques, ainsi qu'un suivi clinique afin de disposer d'une compréhension intégrée de la réponse immunitaire et des mécanismes impliqués dans l'induction d'une immunité protectrice. Cette évaluation in vivo est indispensable, car il n'est pas possible d'étudier la propagation virale ni la mise en place d'une réponse immunitaire protectrice (cellules et molécules impliquées, effet de l'inflammation,) dans des expériences in vitro (Remplacement).

Le nombre d'animaux prévus est basé sur les recommandations des textes de référence, sur des études préliminaires et sur des contraintes scientifiques. Les effectifs sont fixés à 12 animaux par groupe expérimental. L'effectif de chaque groupe a été calculé pour assurer que les résultats soient statistiquement significatifs tout en limitant le nombre d'animaux utilisés (Réduction). Il est important de mentionner, que la totalité de nos expériences sera réalisée à des temps précoces après infection et traitement, et donc dans la phase asymptomatique de la pathologie pendant laquelle les animaux ne présentent aucun signe pathologique. Par ailleurs, tous les animaux bénéficieront d'un suivi régulier strict, d'une attention et des soins réguliers pour assurer leur bien être tout au long des études. Le milieu d'hébergement sera enrichi : carrés de cellulose, copeaux de litière (Raffinement).

Le point limite établi pour éviter la souffrance des animaux lors du développement de la pathologie suite à l'infection virale est un pourcentage d'hématocrite inférieur à 37%.

La réalisation du projet nécessitera au maximum l'utilisation de 216 souris sur 1 an.

19591 Un prédateur impacte la dynamique des populations de ses proies via la mortalité qu'il induit. Au-delà de cet effet dit « direct », largement documenté, la littérature récente montre que le stress engendré par le seul risque d'être prédaté a également un effet sur la proie, parfois même supérieur. Nous nous intéressons ici à cet effet « indirect » engendré par un prédateur non-natif récemment introduit, le chat, sur des albatros hurleurs. Au-delà de l'apport visé dans le domaine scientifique concerné, ce projet, concernant une espèce emblématique et classée « vulnérable » permettra d'apporter des éléments utiles dans la prise de décision par les gestionnaires du territoire.

Le risque de prédation (fréquence de passage et comportement des prédateurs) sera mesuré via des pièges photographiques disposés devant les nids. Nous relierons ensuite ce paramètre à l'évolution de la condition des poussins d'albatros, mesurée en particulier via des paramètres physiologiques, biométriques, comportementaux et génétiques. 55 poussins, répartis dans deux zones contrastées en densité de prédateurs, seront suivis mensuellement pendant 5 mois. Les captures 1, 2 et 5 donneront lieu à des prélèvements sanguins, des mesures biométriques et des prélèvements de microbiote cloacal. Lors de la cinquième capture, deux plumes de couverture seront également prélevées (dosage de la corticostérone). Les poussins seront également bagués, afin d'étudier l'influence de la condition à l'envol sur leur probabilité de survie. Enfin, les captures 3 et 4 permettront d'assurer un suivi biométrique. Un lot supplémentaire de 20 poussins témoins sera capturé une seule fois afin de tester un éventuel effet des captures.

Mesures :

Remplacer : l'approche ayant pour objectif de quantifier les effets du risque sur les individus de cette espèce nouvellement cible, il n'est pas possible de la substituer par une approche située à une échelle infra-individuelle ou *in silico*.

Réduire : l'effectif choisi est le minimum nécessaire pour répondre à nos questions, considérant la prédation constatée dans cette population (et donc la décroissance attendue de l'effectif au cours du temps) et la présence de facteurs autres que le risque de prédation pouvant affecter les paramètres mesurés. Le nombre de captures par individu correspond au minimum nécessaire pour obtenir les paramètres de croissance. Selon l'effectif obtenu, des tests paramétriques ou non, à l'échelle de la zone (comparaison de deux échantillons) ou du nid (modèles linéaires, corrélations) seront utilisés.

Raffiner : la durée des manipulations sera réduite au maximum. Les individus auront un masque sur les yeux pour limiter le stress et les points limites seront contrôlés. Les individus blessés ou faibles ne seront pas inclus dans le protocole. Le volume de sang prélevé sera bien en deçà des valeurs maximales autorisées (<0.1% du poids de l'individu). Les points limites sont : l'apathie, l'agitation / le rythme respiratoire excessif, l'intégrité du plumage et l'intégrité des membres inférieurs et supérieurs. Les points limites pouvant amener à une euthanasie sont un membre cassé par accident lors de la manipulation, ce qui est extrêmement rare.

19592 Les maladies inflammatoires / infectieuses ou les traumatismes peuvent entraîner d'importants défauts osseux craniofaciaux, aux conséquences esthétiques et fonctionnelles, rendant la réadaptation des patients compliquée. Le traitement de ces lésions est compliqué. Les substituts osseux synthétiques ou biologiques utilisés actuellement ne permettent souvent pas une réparation osseuse "ad integrum".

L'objectif principal de ce projet est de pouvoir recréer un os fonctionnel, c'est-à-dire un tissu vascularisé ayant la capacité de se minéraliser. Aussi notre première étape sera de promouvoir la vascularisation en étudiant l'impact d'une prévascularisation *in vitro* de matrices de collagène cellularisées implantées en sous cutanée chez la souris. En effet, si des matrices cellularisées sont déjà utilisées en ingénierie tissulaire de l'os, l'intérêt de matrices cellularisées et prévascularisées, avant implantation dans des défauts cranio-faciaux, n'a encore été que peu investigué chez l'animal.

Dans ce but, des cellules souches de pulpe dentaire humaine cultivées avec (ou sans) pré-traitement pour promouvoir la survie des cellules, seront combinées avec des cellules endothéliales, ensemencées dans des matrices de collagène et implantées dans une tranche de dent ou au sein d'un biomatériau inerte permettant leur implantation et leur analyse au cours du temps. Des expériences *in vitro* préalables ont montré l'intérêt d'associer ces deux types cellulaires pour créer un réseau vasculaire mature implantable. Le modèle de la tranche de dent est un modèle classique bien décrit dans la littérature et maîtrisé au laboratoire sur des souris immunodéprimées pour permettre l'implantation de cellules humaines. Il permet une analyse précise de l'angiogenèse par des techniques d'imagerie différentes selon les temps d'observation comme la tomographie par émission de positon (TEP) à un temps précoce et l'écho-doppler et microtomographie haute résolution à des temps plus tardifs. Cette étude comportera donc 4 procédures qui permettront de suivre l'évolution du réseau vasculaire implanté sur 4 semaines. Elle nécessitera 60 animaux répartis en différents groupes et temps afin de conclure sur l'intérêt de prévasculariser les matrices avant implantation, permettant de progresser dans le domaine de la recherche en chirurgie reconstructrice maxillo-faciale avec l'obtention d'implant pré-vascularisé augmentant leur chance de survie après chirurgie. Ces implants sont bien tolérés par les animaux, et (passée la phase de chirurgie) n'entraînent pas de douleur ou de stress particuliers.

Nous appliquerons la règle des "3R" avec:

1- Réduction : le nombre minimal d'animaux a été calculé par un test d'analyse de variance pour avoir la puissance statistique nécessaire pour pouvoir conclure.

2- Raffinement : Afin de limiter au maximum la souffrance des animaux, les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux. Les analyses se feront sous anesthésie générale avec une médication anti-douleur systématique *en per* et également *post-opératoire*. Les animaux seront attentivement surveillés et des points limites ont été définis au-delà desquels les animaux seront mis à mort.

3-Remplacement : Dans un contexte de recherche physiopathologique, l'expérimentation animale ne peut en aucun cas être remplacée par des expériences *in vitro*, où les cellules sont sorties de leur environnement. La régénération vasculaire et osseuse présente une biologie complexe impliquant participation et interaction de différents types cellulaires. Ces processus complexes ne peuvent être mimés en utilisant uniquement des cultures *in vitro* ou des modèles informatiques. Il n'existe donc pas de méthodes alternatives.

19593 Au sein de l'élevage avicole, la coccidiose aviaire qui est une maladie parasitaire fréquente, conduit à des pertes économiques importantes (Blake et al 2020). La coccidiose aviaire est causée par l'infection par le parasite *Eimeria* dans les cellules épithéliales des caeca de poulet. L'infection par *Eimeria* conduit à la formation de lésions intestinales au niveau du caecum pour *E. tenella*. L'infection par *Eimeria* conduit à une baisse de la consommation et à une perte de poids plus ou moins importante suivant les espèces. Les animaux infectés développent une réponse inflammatoire inadaptée et un stress oxydatif associés à la formation de lésions.

Les principaux moyens de lutte actuels contre la coccidiose reposent sur l'utilisation des anticoccidiens principalement chez les poulets de chair. Cependant, l'utilisation de ces additifs coccidiostatiques résulte plus en plus fréquemment en l'apparition de résistances. De plus, l'utilisation de ces molécules dans l'alimentation animale est de moins en moins bien perçue par les consommateurs d'où l'encouragement de l'Europe vers le développement de nouvelles solutions pour le contrôle des coccidioses.

Afin de maintenir l'animal en bonne santé, l'apport en nutriments et en particulier en acides aminés (AA) spécifiques et en polyphénols est essentiel pour le maintien d'une réponse immunitaire optimale et limiter le stress oxydatif trop important. Ainsi, optimiser la réponse immunitaire par la supplémentation de la ration alimentaire en ces composés pourrait être bénéfique en diminuant les lésions causées par l'infection par *Eimeria tenella*. Cette nouvelle stratégie prophylactique pourrait favoriser le contrôle de la maladie. Dans ce projet, nous testerons, sur le modèle d'infection expérimentale du poulet infecté par *Eimeria tenella*, un supplément en AA et polyphénols pour

lequel nous mesurerons le poids des animaux, la consommation alimentaire, les scores lésionnels, l'excrétion parasitaire et des paramètres inflammatoires.

Les acides aminés et les polyphénols étant des composants naturels de l'alimentation et étant répertoriés et déjà utilisés pour l'alimentation animale, nous ne nous attendons pas à des effets délétères sur les animaux. Pour ce faire nous utiliserons au maximum 64 poulets.

Ce protocole a été établi dans le respect de la règle des 3R :

Dans ce projet la règle des 3R est respectée comme suit :

Remplacement : l'étude de l'effet d'une supplémentation sur le développement de lésions et des paramètres de l'inflammation ne peut être réalisée in vitro.

Réduction : Le nombre d'animaux par lot est adapté aux buts de cette expérimentation pilote, preuve de concept. Les effectifs sont basés sur les études du laboratoire portant sur les scores lésionnels lors de supplémentation et pour lesquelles il faut en moyenne 18 animaux / groupe entre deux groupes pour avoir une différence significative avec une puissance de 96% avec un seuil alpha de 0.05 pour un test t non paramétrique (2 groupes infectés supplémentés ou non).

Raffinement : Les poulets seront hébergés en cages adaptés à leur taille, dans des conditions environnementales contrôlées, avec nourriture et eau à volonté et disposeront d'un enrichissement social et comportemental (dans les cages : petites plaques en inox suspendues ce qui permet aux animaux de piquer dedans et tapis plastique pour soulager les pattes). Pour cette étude, l'utilisation de cages est nécessaire pour la mesure de l'excrétion parasitaire dans les fientes.

19594 La malnutrition chronique chez l'enfant est un problème majeur de santé publique dans les pays en développement, touchant aujourd'hui plus de 150 millions d'enfants dans le monde. Les conséquences à long terme sont particulièrement délétères, notamment marquées par un retard de croissance ainsi que des déficits neurocognitifs qui persistent à l'âge adulte. De nombreuses études suggèrent que les macronutriments critiques dans cette période de la vie sont les protéines. Une alimentation appauvrie en protéines induit notamment un retard de croissance chez le rongeur. Un des problèmes des pays en voie de développement est l'existence du « double fardeau de la malnutrition », c'est-à-dire la coexistence au cours de la vie de périodes de sous-nutrition et d'obésité, en raison de régimes riches en graisses et sucres. Des études récentes suggèrent un lien fort entre composition du microbiote intestinal et régime nutritionnel. En particulier, une intervention probiotique chez le rongeur dans un contexte de malnutrition permet de compenser partiellement le retard de croissance chez le juvénile. Un probiotique se définit comme un micro-organisme vivant qui, lorsqu'il est ingéré en quantité suffisante, exerce des effets positifs sur la santé, au-delà des effets nutritionnels traditionnels.

L'objectif de cette étude est de mettre en place chez la souris un protocole mimant les situations de double fardeau de la malnutrition chez l'enfant et d'étudier la dynamique de croissance dans ce contexte. Pour cela, les souriceaux seront alimentés avec un aliment appauvri en protéines pendant 3 semaines puis réalimentés avec un aliment riche en graisse, appauvri ou non en protéines. Nous étudierons ensuite si l'administration d'un probiotique pendant la période de réalimentation est susceptible d'améliorer la dynamique de croissance et le métabolisme des animaux. Nous réaliserons des prélèvements de sang et procéderons à des tests de tolérance au glucose et à l'insuline de manière à rechercher les modifications métaboliques induites par ces modifications de régime. Cette étude permettra donc l'établissement d'un modèle préclinique ouvrant la porte à de possibles visées thérapeutiques chez l'Homme. Le projet a été conçu pour respecter la règle des 3R: raffiner, réduire, remplacer. En effet, le nombre d'animaux et de groupes a été réduit au maximum sans toutefois mettre en péril une interprétation statistique des résultats. Cette étude implique une réponse intégrée au niveau de l'organisme (interactions nutrition/microbiote), ce qui justifie une étude chez l'animal. Des points limites bien définis et suffisamment précoces et prédictifs pour prévenir tout stress et toute douleur de l'animal ont été mis en place. Différentes mesures de raffinement sont mises en place pour améliorer le bien-être des animaux : mesures de taille sous anesthésie légère pour limiter le stress, délivrance du probiotique à la pipette plutôt que par gavage, régime appauvri en protéine isocalorique du régime contrôle pour éviter toute sensation de faim....

Les conditions d'hébergement, les soins et les procédures seront réalisées par du personnel qualifié.

Cette étude se fera sur 290 souris.

19595 La Directive Cadre Européenne sur l'eau fixe le bon état écologique des cours d'eau et la libre circulation des espèces piscicoles. Les propriétaires d'ouvrages transversaux doivent ainsi se mettre en conformité en équipant ou effaçant leur(s) ouvrage(s). Certains maîtres d'ouvrage sont ensuite tenus d'évaluer l'efficacité de ces actions en mettant en place des suivis des comportements des poissons aux abords des ouvrages, avant et/ou après restauration. L'outil RFID est de plus en plus couramment utilisé pour quantifier ces comportements. En effet, il permet de mesurer la proportion d'individus qui cherchent à migrer vers l'amont et ceux qui parviennent effectivement à franchir l'obstacle. Il faut pour cela procéder au marquage d'individus à l'aide de micro-puces RFID appelées PIT tags et équiper les ouvrages à l'aide d'antennes de détection reliées à un lecteur-enregistreur.

Cette étude a pour objectif l'évaluation de la franchissabilité d'une passe à poissons construite au niveau d'un barrage hydroélectrique en rivière de montagne. L'étude cible principalement la truite de rivière, mais également trois autres espèces de poissons caractéristiques du cours d'eau étudié (ombre commun, blageon, chabot). Elle vise à vérifier que les individus atteignant l'entrée de la passe à poissons sont capables d'y pénétrer et de franchir avec succès cet aménagement.

Les poissons seront capturés par pêches électriques, méthode couramment employée pour les inventaires des peuplements de poissons en rivières. Au total 1'500 individus de taille supérieure à 80 mm seront capturés et marqués à l'aide de PIT tags de 13 et 23 mm selon leur taille, pendant 3 années consécutives: 600 truites, 300 ombres, 300 blageons et 300 chabots. A minima la moitié de ces individus seront capturés en amont de l'aménagement et relâchés en aval pour forcer le comportement de migration vers l'amont. Leurs déplacements dans la rivière seront suivis uniquement à l'aide d'antennes de détection fixes préalablement installées à l'entrée et à la sortie de la passe à poissons.

Le modèle animal ne peut pas être remplacé pour répondre à la question posée (règle des 3 R : Remplacement) ; en outre, il est indispensable d'avoir recourt à des poissons sauvages pour étudier leur comportement in natura. L'effectif d'individus marqués, est le minimum pour obtenir un échantillon représentatif des comportements migratoires des quatre espèces ciblées au niveau de l'aménagement hydroélectrique, tout en limitant au maximum les atteintes sur la population (Règle des 3R : Réduction). En effet, seule une fraction minoritaire des individus cherchera à migrer, l'autre fraction ne cherchera pas nécessairement à remonter la rivière. Les marques PIT tags seront implantées chirurgicalement dans la cavité péritonéale des poissons. Les animaux seront anesthésiés avant les opérations de marquage, leurs constantes vitales seront surveillées et leur réveil post-marquage assuré avant de les relâcher dans leur cours d'eau d'origine (règle des 3R : Raffinement).

19596 Le chlordécone est un insecticide utilisé aux Antilles pour lutter contre le charançon noir, un insecte ravageant les bananeraies. Compte tenu notamment de sa neurotoxicité à des doses élevées cet insecticide a été interdit dans les années 90. Malheureusement, cet insecticide est très persistant et a contaminé durablement l'environnement, les animaux et la population Antillaise. Pour l'heure les effets neurologiques éventuels d'une exposition à long terme sont mal connus. Toutefois, plusieurs éléments suggérant un effet délétère existent, notamment sur le neuro-développement chez les jeunes garçons nés de mères exposées. De plus, l'heptachlore, un autre insecticide à l'origine d'une contamination environnementale et humaine à Hawaï a un effet délétère chez la souris dans les régions du cerveau atteintes lors de la maladie de Parkinson et a été associé à des lésions cérébrales chez l'homme. Les objectifs scientifiques du projet sont d'étudier : 1/ l'effet d'une exposition chronique au chlordécone ou à l'heptachlore sur la viabilité et la physiologie des neurones du système nerveux central chez des souris sauvages ; 2 les effets de ce mode d'exposition sur le modèle murin de la maladie de Parkinson. La finalité de ces approches est d'évaluer un lien potentiel entre une exposition au chlordécone et le déclenchement ou

l'accélération de la maladie de Parkinson. Pour ce faire, les souris des deux lignées sont exposées à l'une ou l'autre des 2 substances par injections intra-péritonéales répétées (2/semaine) pendant 19 semaines. Au cours du protocole d'exposition, les souris sont soumises à des tests comportementaux, cognitifs et moteurs. Les animaux des deux lignées sont mis à mort une semaine après la fin des expositions et font alors l'objet de prélèvements post-mortem destinés à des analyses biochimiques et histopathologiques. Ces analyses permettront d'étudier les effets neuropathologiques en particulier l'agrégation de l'alpha-synucléine, la neuroinflammation et l'atteinte du système nerveux central sur la base des critères actuellement reconnus dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson. Le projet nécessite au total 104 animaux dont 52 souris mâles de la lignée sauvage et 52 de la lignée modèle de Parkinson. Le nombre de souris est réduit jusqu'au nombre d'animaux minimal permettant d'attendre des résultats statistiquement significatifs dans les différentes approches proposées. Conformément aux exigences de raffinement, les expérimentations ont été optimisées afin de réduire la douleur au minimum, les animaux sont suivis quotidiennement et hébergés dans un environnement enrichi. Enfin, la surveillance des animaux s'appuie sur une grille d'évaluation clinique précise mise en œuvre pour la définition de points limites dans chaque procédure de ce projet. Ces études seront réalisées en parallèle d'expérimentations équivalentes sur des lignées de cellules, malheureusement, à ce jour, le remplacement complet n'est pas envisageable.

19597 La sclérose latérale amyotrophique (SLA), ou maladie de Charcot, est une maladie neurodégénérative. Elle se déclare à l'âge adulte (40-80 ans) et évolue, en 3 à 5 ans, vers la paralysie complète et le décès du patient. Elle est causée par la mort des motoneurones (cellules contrôlant les mouvements du corps), entraînant un affaiblissement progressif et une atrophie des muscles. C'est la plus fréquente des maladies du motoneurone chez l'adulte. A ce jour, il n'existe pas de traitement contre la SLA car les mécanismes physiopathologiques sont méconnus. La SLA touche les deux sexes et son incidence augmente avec l'âge à partir de 40 ans. Elle peut dans certains cas être associée à des troubles cognitifs de type démence fronto-temporale (DFT). Dans une cohorte humaine de patients souffrant de la forme DFT-SLA, une mutation a été identifiée sur le gène d'une protéine mitochondriale. La mitochondrie est un petit organite indispensable dans les processus énergétiques cellulaires. Notre projet de recherche a pour but de comprendre comment un dysfonctionnement mitochondrial conduit à une atteinte du motoneurone. Pour répondre à cet objectif, nous voulons caractériser la cinétique d'apparition des atteintes musculaires et neurodégénératives observées dans le modèle murin porteur de la mutation d'intérêt. Les organes seront récupérés après la mort de l'animal pour des analyses biologiques, biochimiques et histologiques. La compréhension de la cinétique d'apparition de l'atteinte musculaire et de l'atteinte neurodégénérative est primordiale dans le but de développer une stratégie thérapeutique.

Dans un but de remplacement, des expériences, réalisées précédemment sur des cellules de patients, présentent un potentiel important pour remplacer et réduire l'utilisation de l'animal. Cependant, la pathologie touchant plusieurs organes, seul un modèle animal permettra de comprendre la cinétique d'apparition des atteintes musculaires et neurodégénératives. Un maximum de 1990 souris sera utilisé pour ce projet, en fond génétique mixte C57BL/6N et C57BL/6J, qui se déroulera sur une durée de 5 ans. Parmi ces 1990 animaux, 900 animaux (exprimant la mutation d'intérêt) présenteront un phénotype dommageable, les autres animaux ne présenteront pas de phénotype dommageable. Dans un but de réduction du nombre d'animaux à utiliser pour cette étude, des statistiques prédictives ont été réalisées dans le but d'utiliser le minimum d'animaux nécessaires. Les animaux obtenus par élevage seront utilisés pour la cinétique d'apparition des atteintes musculaires et neurodégénératives. Dans un but de raffinement, l'utilisation d'une fiche d'observation détaillée (en lien avec le phénotype attendu de DFT-SLA) permettant un suivi optimal des animaux sera mise en place. Les animaux seront observés de manière bimensuelle (7 premiers mois de vie) puis hebdomadairement, ce qui permettra d'identifier précocement tout signe clinique, de stress ou de douleur. Le phénotype de DFT-SLA étant associé à une perte de poids, les animaux seront pesés deux fois par mois (7 premiers mois de vie), puis une fois par semaine. Lorsqu'une perte de poids sera observée, une surveillance accrue sera réalisée (2 fois par semaine ou tous les jours suivant le pourcentage de perte de poids), de la

nourriture gélifiée sera également ajoutée dans la cage. Si, lors de cette surveillance hebdomadaire, un stress est observé, un enrichissement de la cage sera réalisé et une surveillance accrue sera effectuée.

19598 Le traitement ou la prévention des hémorragies chez les patients hémophiles A repose sur l'injection intraveineuse de facteur VIII (FVIII) thérapeutique. La complication majeure de ce traitement est l'apparition d'une réponse immunitaire anti-FVIII qui neutralise le FVIII thérapeutique. Actuellement, la seule approche permettant une éradication des anticorps anti-FVIII consiste en l'injection quotidienne de fortes doses de FVIII sur des périodes pouvant atteindre plusieurs mois à plusieurs années. Outre son coût (supérieur à 200 k€ par an et par patient) et son extrême lourdeur, ce traitement, appelé « Induction de Tolérance Immunitaire » (ITI), n'est efficace que chez 60 à 80% des patients. L'apparition d'anticorps anti-FVIII représente donc une impasse clinique et un problème sociétal majeur.

Plusieurs stratégies destinées à induire une tolérance au FVIII thérapeutique ont été développées chez la souris déficiente en FVIII. Récemment, il a été démontré que le transfert materno-fœtal (de la mère aux fœtus) des domaines immunodominants du FVIII couplés au domaine Fc de l'Immunoglobuline G, protège partiellement les souriceaux du développement d'une réponse immunitaire dirigée contre le FVIII thérapeutique à l'âge adulte. Notre hypothèse est que la protection était partielle car seuls les domaines A2 et C2, qui représentent 30% de la taille du FVIII, étaient utilisés.

Ici, notre objectif est de transférer la molécule entière de FVIII présente dans la circulation maternelle vers la circulation fœtale, et ainsi de conférer une protection immunologique complète. Pour cela, des molécules capables de fixer le FVIII et de traverser le placenta (que nous nommons 'Exfiltrines') seront injectées dans le sang maternel.

Aux vues de la potentielle translation de notre stratégie en clinique, nous souhaitons travailler sur un modèle de souris déficientes pour le FVIII murin et exprimant le FVIII humain suite à l'injection de particules virales de type AAV codant pour le FVIII humain.

Pour ce projet d'une durée de 3 ans, nous utiliserons un nombre maximum de 1242 animaux. Les expériences sont planifiées en accord avec la règle des 3R :

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

Réduction : Des analyses de puissance seront effectuées pour calculer le nombre minimum d'animaux par groupe tout en garantissant la solidité statistique des résultats. Le nombre de répétition des expériences sera défini de manière rationnelle : si une expérience donne des résultats statistiquement significatifs avec une puissance appropriée, elle ne sera pas répétée, sinon elle sera répétée une à deux fois maximum. Les organes, sérum et cellules des souris sacrifiées en fin d'expérience sont conservés; ainsi, aucune expérience supplémentaire ne doit-elle être faite si des questions nouvelles surviennent.

Raffinement : les souris seront hébergées en accord avec les lois d'éthique françaises. Les animaux seront contrôlés quotidiennement pour évaluer et réduire au maximum tout risque de douleur. Les animaux malades seront soignés ou euthanasiés. Les conditions de vie seront améliorées au maximum (5 souris maximum par cage, ajout de nids végétaux et de tunnels en carton). De plus, l'ensemble des procédures susceptibles d'entraîner une douleur seront réalisées sous anesthésie générale (anesthésie gazeuse) et des critères d'arrêts (points limites) seront mis en place.

19599 2. 1. Intitulé du projet :

Etude de l'effet anti-stress post traumatique de la cariprazine chez le rat : rôle de la médiation des récepteurs dopamine D3.

2. 2. Durée du projet

La durée totale du projet est de 60 mois.

2. 3. Mots-clés

- Trouble du stress post-traumatique
- Cariprazine et Paroxétine
- Vocalises d'Ultrason, activité locomotrice
- Electrophysiologie

2. 4. Finalité du projet

- Recherche appliquée

2. 5. Objectifs et bénéfices escomptés du projet

Notre objectif est double :

- 1) Vérifier si cette molécule est capable de potentialiser l'action d'antidépresseurs classiques et ainsi d'améliorer la réponse des patients atteints de trouble de stress post traumatique résistants aux traitements actuels ;
- 2) Comprendre par quels récepteurs passe l'effet potentialisateur de la cariprazine, si un tel effet est observé pour, à terme, proposer des molécules ciblant uniquement les récepteurs en cause. Il s'agit donc d'une recherche translationnelle.

Contrat de recherche industriel validé par la direction scientifique qui finance ce projet.

2. 6. Nuisances prévues

Les animaux seront soumis à des injections intra-péritonéales répétées ou non, à des chocs électriques répétés ou non, à un isolement puis à une mise à mort par injections systémiques.

Le modèle neurologique qui convient le plus à la compréhension du trouble de stress post-traumatique (TSPT) est celui présenté comme le conditionnement de la peur. Ce conditionnement est une forme d'entraînement ou d'apprentissage associé à un ou plusieurs stimuli qui provoquent la peur. Il a été montré que les chocs électriques inévitables (IFS) d'intensité variable produisent des changements comportementaux et neurochimiques reflétant le TSPT chez l'homme. Aussi, les animaux ne s'habituent pas aux IFS par rapport à d'autres facteurs de stress, y compris le bruit fort, la lumière vive et les températures chaudes et froides. En outre, ce modèle offre un avantage expérimental très pertinent et rigoureux de contrôle sur l'intensité et la durée. De même, le conditionnement de la peur sous forme d'exposition IFS suivi de rappels situationnels a été le plus utilisé pour élaborer le modèle de TSPT. La vocalisation ultrasonique induite par la peur des IFS est le plus pharmacologiquement utilisé afin de dépister les nouveaux agents anti-TSPT

Au cours de cette étude le rat est placé dans un environnement qui lui est tout d'abord inconnu. Ensuite, une peur exacerbée est induite à l'aide de chocs électriques répétés aléatoirement. Le rat va associer l'environnement nouveau avec la peur ressentie à la suite des chocs. Enfin, l'animal est placé une nouvelle fois dans cet environnement sans subir de choc. On observera un comportement de peur conditionnée caractérisé par l'émission de vocalises associé à un « freezing ».

Les effets néfastes attendus sur les rongeurs seront le développement d'un comportement anxio-dépressif caractérisé par une peur exacerbée qui diminue au cours du temps.

Cette étude requiert l'utilisation de 240 rats mâles avec un poids de 125-175g de l'espèce « Wistar ». L'ensemble des procédures est de degré de gravité 3 : contrainte sévère.

Tous les animaux seront mis à mort suite au stress post traumatique infligé et aux dommages cérébraux causés par la procédure pour les enregistrements électrophysiologiques qui sont irréversibles.

Pour la procédure 1), les animaux seront sédatisés avec une dose de kétamine, puis une dose létale d'euthasol Vet leur sera injectée par voie intrapéritonéale.

Lors de la procédure 2), les animaux seront déjà sous anesthésie générale après une infusion d'Alfaxan. Leur mis à mort se fera après l'injection d'une dose létale d'euthasol Vet à la fin de l'enregistrement.

2. 7. Application de la règle des « trois R »

1- Remplacement :

La majorité des alternatives à l'expérimentation animale peut consister en la modélisation informatique de leur physiologie dans des études *in silico*. S'agissant d'une étude comportementale, nos observations reposent sur l'expression de la peur conditionnée qui peut être difficilement être modélisée. Seul le modèle vivant en capacité d'exprimer l'ensemble de ses comportements peut donc être utilisé. Dans la présente étude, le rat exprime sa peur par des vocalises qui peuvent facilement être analysées ce qui en fait un modèle très pertinent pour notre étude.

2- Réduction :

Le nombre de rat utilisé correspond adéquatement aux différentes études (incluant les nôtres) retrouvées dans la littérature. Il s'agit du nombre minimum d'individus permettant une plage de données suffisante pour obtenir des résultats interprétables. Il n'y a pas malheureusement de pratiques possibles pour diminuer le nombre d'animaux ni de les réutiliser lors de l'expérimentation.

3- Raffinement :

Tout au long de l'étude, les rats seront manipulés par un manipulateur assigné. Un temps d'adaptation de 1 semaine sera appliqué. Une procédure d'habituation au manipulateur sera mise en place durant les trois jours précédant l'expérimentation. L'habituation consiste en une pesée quotidienne et une répétition des gestes de manipulation sans injection. Les cages contiendront chacune deux animaux selon les normes en vigueur. Chaque cage est enrichie d'un igloo. Les animaux seront observés et pesés régulièrement pendant tout le temps de l'expérience. Ils seront pesés

quotidienne avant et après l'administration du stimulus stressant. La consommation alimentaire et l'exploration sociale seront surveillées 2 fois, 1h et 2h après le stress. En cas de douleur celle-ci sera évaluée par une grille de scoring de la douleur (1h et 4h, voir le lendemain après le stress) permettant d'analyser différents critères (apparence, comportement naturel, signes cliniques, hydratation). Pour un score supérieur à 4, une surveillance accrue sera effectuée.

19600 Le paludisme, responsable de plus de 400 000 décès par an, est la maladie parasitaire la plus meurtrière au monde. Cette maladie est causée par un parasite appelé Plasmodium, dont il existe de nombreuses espèces. Malheureusement, à ce jour, aucun vaccin commercial hautement efficace n'est disponible pour lutter contre cette maladie insidieuse.

L'infection paludique comporte deux phases. La première, asymptomatique, suit la piqûre infectante par le moustique vecteur, et précède l'infection des globules rouges. Cette première phase consiste essentiellement en un cycle de multiplication dans le foie des quelques parasites injectés dans la peau par le moustique. Ce cycle de multiplication dans le foie génère la forme du parasite qui infecte les globules rouges. La seconde phase consiste en des cycles répétés de multiplication du parasite à l'intérieur des globules rouges et est responsable des symptômes et complications de la maladie.

Les axes majeurs de notre recherche portent sur l'étude de la biologie du parasite et l'immunobiologie de l'hôte dans la première phase de l'infection afin de développer un vaccin. Notre but est (i) de mieux comprendre les premières étapes de l'infection en utilisant des approches de biologie cellulaire et moléculaire ainsi que la microscopie intra-vitale pour identifier les composants essentiels du parasite susceptibles de constituer des cibles pour de nouveaux médicaments et vaccins, (ii) de mieux comprendre comment une immunité protectrice contre le parasite peut se développer et d'identifier de nouvelles cibles vaccinales, et (iii) de développer un vaccin plus efficace contre le paludisme.

Les processus conduisant à l'infection de l'hôte par les différents stades parasitaires ou à la protection de l'hôte contre ces stades par le biais de la vaccination sont extrêmement complexes. Dans la phase initiale de l'infection, ils impliquent des interactions multiples et dynamiques entre le parasite et plusieurs types cellulaires dans la peau, les ganglions, les vaisseaux, le sang, la rate et le foie, qu'il est impossible de répliquer dans leur ensemble dans un système *in vitro*. L'étude approfondie de cette phase nécessite donc l'utilisation de modèles animaux pour appréhender cette

incroyable complexité. Depuis les années 1950, les espèces de Plasmodium qui infectent les rongeurs, *P. berghei* et *P. yoelii*, sont devenues les espèces de choix pour étudier cette phase, et ont notamment permis la découverte des candidats vaccins les plus importants contre le paludisme. Une deuxième difficulté réside dans la production du stade parasitaire inoculé dans la peau de l'hôte par le moustique vecteur. Il n'existe pas actuellement de système qui permette de reproduire le cycle de vie complet de Plasmodium in vitro. Par conséquent, pour réaliser l'ensemble des études proposées, des infections hebdomadaires de rongeurs et de moustiques sont nécessaires pour l'obtention de ce stade parasitaire.

Nous avons conçu les procédures expérimentales avec l'aide de statisticiens de façon à optimiser le nombre d'animaux nécessaires. Nous estimons le nombre d'animaux de laboratoire auxquels nous devons avoir recours afin de produire les parasites nécessaires à la réalisation de notre projet scientifique à 55 rats et 1662 souris par an soit un total d'environ 8585 animaux sur 5 ans.

Ce projet concerne spécifiquement l'utilisation d'animaux de laboratoire pour générer les parasites à travers sept procédures expérimentales. Les procédures expérimentales utilisant des animaux pour évaluer les problèmes évoqués ci-dessus dans nos axes de recherche seront décrites dans un projet complémentaire.

Toutes nos procédures sont de sévérité légère. L'inconfort et la souffrance des animaux seront limités par le recours à des anesthésiques, et l'arrêt des expériences avant l'apparition des symptômes du paludisme chez les rongeurs infectés.

19601 Les anticorps monoclonaux ont révolutionné, par leur approche ciblée, la manière de traiter des pathologies majeures incluant les cancers et les maladies auto-immunes. Ces anticorps monoclonaux sont en très grande majorité des immunoglobulines de type G (IgG) qui sont décorés par motifs sucrés, aussi nommés glycannes. Ces glycannes affectent considérablement les fonctions effectrices et la demi-vie plasmatique des IgG. Les études structurales et fonctionnelles portant sur les glycannes des IgG ont non seulement permis de décrypter des mécanismes fondamentaux liés à l'apparition et au développement de certaines maladies mais également d'améliorer, par une synthèse contrôlée des glycannes, l'efficacité des anticorps monoclonaux thérapeutiques. Dans ce contexte, ce projet vise à évaluer I) l'effet de la présence de glycannes particuliers sur la demi vie sérique d'IgG recombinants thérapeutiques et II) la contribution d'un récepteur particulier (i. e. le récepteur au mannose nommé MRC-1), recyclant les protéines sériques, dans l'élimination plasmatique de ces IgG. Pour ce faire, des IgG monoclonaux ayant des glycannes « naturels » ou « modifiés » seront injectés par voie intraveineuse dans des souris dites sauvages (WT) et déficientes pour le récepteur au mannose (Mrc1-KO) et leur disparition/présence dans le plasma sera mesurée à la suite de prélèvements du plasma au cours du temps. Le nombre maximal d'animaux utilisé sera de 120 souris (60 souris C57BL/6 WT et 60 C57BL/6 Mrc1-KO). Les résultats de cette étude, et l'extrapolation des résultats des animaux de laboratoire vers l'humain, aideront à mieux définir l'impact de la N-glycosylation sur le comportement pharmacocinétique des anticorps thérapeutiques. En fonction des résultats obtenus, d'autres expériences seront nécessaires pour étayer les conclusions. Afin de s'inscrire dans la logique des 3R, nous avons intégré 4 étapes dans notre raisonnement. Tout d'abord, les expériences réalisées font suite à des étapes de validation dans des modèles cellulaires : ainsi les expériences proposées sont réalisées au stade où les méthodes de remplacement de l'expérimentation animale ont été exploitées et s'avèrent suffisamment prometteuses pour utiliser le modèle intégré murin. Ensuite, certaines étapes de nos projets (clairement identifiées dans les procédures détaillées) pourront en effet être suivies de décisions de poursuite ou d'arrêt de l'étude en fonction des promesses offertes par les résultats. De plus, nous avons développé des approches expérimentales permettant d'analyser sur un même lot d'animaux, des paramètres qui étaient avant mesurés sur des lots d'animaux séparés (i. e. l'analyse de la quantité d'anticorps, des sous-types d'IgGs et de leurs motifs de glycosylation seront réalisés sur un seul échantillon plasmatique de petit volume). Finalement, l'expérience des années précédentes nous a fourni des indications sur la taille des lots d'animaux à respecter pour obtenir en première intention des résultats statistiquement significatifs. La souffrance et/ou le stress animal sont présents à deux niveaux dans nos expériences : I) lors de l'administration par voie

intraveineuse des IgG recombinants et II) lors des prélèvements de sang par voie retro-orbital. Afin de réduire la douleur ou la souffrance de l'animal, ces étapes seront réalisées sous anesthésie et feront l'objet d'une prise en charge spécifique indiquée dans les procédures respectives.

19602 Les fonctions du système nerveux central sont principalement expliquées par le rôle prépondérant que jouent des cellules nerveuses. De plus en plus de preuves scientifiques indiquent qu'outre les cellules nerveuses, les cellules immunitaires résidentes du système nerveux central pourraient jouer un rôle prépondérant dans l'équilibre du système nerveux central et sa capacité à modifier son fonctionnement pour maintenir un fonctionnement optimum en cas de changement de l'environnement (Ex perte de goût ou d'odorat...). Pourtant les mécanismes et les voies de signalisation par lesquelles les cellules nerveuses et immunitaires interagissent sont peu connus. Le but de ce projet est de déterminer le rôle des cellules immunitaires dans ces mécanismes de plasticité et du maintien de l'équilibre du système nerveux. Nous étudierons les cellules immunitaires grâce à un modèle de souris transgénique. Les mouvements des prolongements des cellules immunitaires seront étudiés par imagerie cellulaire sur des animaux vigiles habitués à la contention. L'étude des mouvements des cellules immunitaires nous permettra de mieux comprendre les mécanismes cellulaires qui se produisent pendant la réorganisation du système nerveux suite à des privations sensorielles.

Il s'agit d'un projet de recherche fondamental dont les résultats bénéficieront à la connaissance générale du système nerveux central, et permettront de mieux comprendre les interactions entre le système nerveux et le système immunitaire. Les résultats attendus de cette recherche permettront de mieux comprendre les processus cellulaires conduisant aux pathologies neurodégénératives du système nerveux central et aux troubles engendrés par l'auto-immunité.

Chaque animal recevra une chirurgie sous anesthésie générale permettant la pose d'un implant crânien, une analgésie est prodiguée aussi longtemps que nécessaire jusqu'à la récupération totale de la chirurgie en général 48 heures maximum. Les souris seront ensuite habituées à l'immobilité par renforcement positif (récompenses) afin d'être imagées au travers du crâne, notre approche est donc non invasive et à ce titre très bien tolérée par les animaux. Les différentes molécules seront injectées par voie intrapéritonéale. Les molécules sont issues de la pharmacopée utilisée chez l'homme et donc avec peu d'effets secondaires indésirables. Afin d'entraîner une plasticité des modalités sensorielles de façon physiologique, une privation de la vue temporaire sera réalisée. La procédure est classée modérée.

Cette étude sera réalisée en respectant la règle des 3R. Le nombre de souris utilisé sera contenu (280 souris pour 5 ans). Notre étude impose des conditions physiologiques et une absence d'inflammation ce qui nous contraint à l'utilisation d'un modèle in vivo non-invasif. Une fois les voies de signalisations identifiées, l'étude des mécanismes sera réalisée in vitro (Remplacer et Réduire). En termes de raffinement, il est à noter que ce modèle peu invasif ne semble pas induire de stress ou de souffrance des souris. Néanmoins, nous veillerons à limiter le mal être des animaux par un enrichissement de leurs conditions de vie, en raffinant notre procédé de contention et en réalisant des habituations de nos souris à la manipulation. En complément, le bien-être des animaux sera évalué de façon quotidienne (posture, poids, toilettage). Les privations visuelles peuvent être obtenues par différentes méthodes nous avons porté une attention particulière à cette procédure et choisi l'approche la moins traumatisante possible pour l'animal. Nous allons privilégier la prise orale des composés pharmaceutiques quand c'est possible, au lieu de l'administration par injection qui peut être une source de stress pour l'animal. Avec cette approche nous voulons tirer parti des avantages qu'apporte la souris (les modèles génétiques) pour améliorer notre compréhension des mécanismes cellulaires mis en jeu durant les sollicitations sensori-motrices.

19603 La cocaïne est la deuxième drogue illégale la plus consommée en Europe et son utilisation a augmenté au cours des 10 dernières années. Parmi les utilisateurs de cocaïne, tous ne développent pas une addiction ; seule une minorité vulnérable semble touchée (i. e. , 15-20%). Ce qui frappe le plus dans l'addiction, c'est son apparente irrationalité. Les personnes affectées continuent de consommer la cocaïne, malgré un désir récurrent d'arrêter pour s'engager dans d'autres activités

moins toxiques et plus acceptées socialement. De manière intéressante la consommation compulsive de drogue n'apparaît pas de manière permanente est absolue. Les personnes diagnostiquées comme présentant une addiction sont capables de choisir d'autres activités non focalisées sur la drogue, en particulier elles sont capables d'un certain degré de contrôle sur leur choix quand elles ne sont pas sous les effets de la drogue. Par contre, lorsque ces individus font leur choix sous influence de la drogue, ils préfèrent exclusivement la drogue aux dépends d'autres options normalement préférées. Notre projet a pour but de tester l'influence de la drogue sur le choix et se focalisera en particulier sur l'étude des circuits orbitofrontaux, régions du cerveau responsables de la prise de décision et des choix. Ce projet est par essence mécanistique et nécessite une approche invasive qui n'est pas envisageable chez le sujet humain. Sa bonne réalisation repose donc sur le développement et l'utilisation d'un modèle animal - le rat de laboratoire - qui permet de reproduire de façon valide la distinction établie chez l'homme entre individus vulnérables et individus non-vulnérables face à l'addiction. Il s'agira de placer une population de rats face à un choix entre prendre de la cocaïne ou s'engager dans une activité alternative (i. e. , boire une boisson édulcorée avec de la saccharine) et, ensuite, de tester l'influence d'une administration passive de cocaïne sur le choix des individus. Le projet consistera également à manipuler in vivo l'activité des neurones du cortex orbitofrontal, soit les activer (1 groupe ou lot de 40 rats) ou les inhiber (1 groupe ou lot de 40 rats). Ces manipulations neuronales seront réalisées avant le choix et devraient donc influencer, voire même changer, les préférences individuelles et, selon les cas, induire ou reverser la préférence pour la drogue chez les individus. A terme, ce projet devrait contribuer à élucider le rôle des dysfonctions orbitofrontales dans la physiopathologie de l'addiction.

Notre projet nécessite au total l'utilisation de 260 rats mâles sur une période de 4 ans. Ces animaux sont soumis à différentes procédures successives dont le degré maximal de gravité ne dépasse pas le degré « modéré ». Ces procédures sont de deux types : chirurgicale et comportementales. Toutes les procédures chirurgicales sont réalisées sous anesthésie, analgésie anti-inflammatoire dans des conditions aseptiques. De plus, pour prévenir toute infection, les animaux reçoivent pendant toute la durée de l'expérience un traitement antibiotique. Il n'existe pas encore de modèles mathématique ou in silico permettant de remplacer l'utilisation du rat de laboratoire pour réaliser le projet proposé. L'addiction est un trouble du comportement qui ne peut pas être récapitulé sur des lignées cellulaires (humaine ou animale) ou tout autre modèle in vitro cellulaire ou subcellulaire. Toutefois, le nombre d'animaux nécessaire au projet est réduit au minimum. Ce nombre représente un compromis rationnel, compte tenu de l'exigence éthique de réduction du nombre d'animaux et des contraintes expérimentales propres au projet scientifique proposé. Notamment, ce nombre est nécessaire pour étudier de façon concluante les différences individuelles et/ou prophylactiques. Tout au long des expériences, plusieurs critères sont pris en compte pour suivre régulièrement le niveau d'inconfort ou de souffrance des animaux et décider, le cas échéant, de procéder à l'arrêt de l'expérience si le point limite est atteint. Un sous-groupe d'animaux sera soumis à une restriction hydrique pour tester l'importance physiologique de la récompense alternative pendant le choix. Le suivi de ces animaux sera renforcé et, le cas échéant, des mesures de réhydratation seront appliquées. Les animaux sont logés par groupe de 2 dans des cages collectives (surface au sol de 940 cm²) afin d'éviter le stress lié à l'isolement social. De plus, ces cages sont enrichies grâce à la présence de tunnels de jeu et de matériel à ronger afin de limiter l'ennui, le manque de stimulation, et ainsi promouvoir leur bien-être. A la fin des expériences, tous les animaux sont mis à mort de façon indolore et inconsciente, et ne sont donc pas réutilisés dans d'autres expériences.

19604 Dans le cadre de la recherche de nouvelles pistes thérapeutiques, l'analyse du rôle joué par chaque gène dans l'organisme constitue l'une des pistes souvent explorées.

Le but du projet est justement de déterminer le rôle d'un gène identifié dans des études réalisées sur des cellules et des simulations informatiques.

Pour cela, nous étudierons l'impact de sa modification génétique (délétion ou mutation ponctuelle) sur la mise en place des mécanismes de régulation lipidique, dans le cadre d'un régime enrichi.

Ce projet sera réalisé en utilisant des souris génétiquement modifiées par comparaison avec des animaux contrôles.

Ces lignées ne concerneront que des modèles ne présentant pas de phénotypes dommageables et une étude rétrospective sera mise en place le cas échéant.

Pour procéder à cette étude, des souris mutantes n'exprimant plus le gène d'intérêt sont générées et étudiées en comparaison avec des animaux contrôles. Ces animaux seront soumis à un protocole comportant différents tests permettant de caractériser les capacités de régulation lipidique, lors de l'apparition d'une obésité ; mais aussi à des tests permettant de caractériser la lignée, lorsque celle-ci n'a pas encore été étudiée sur certains domaines (fonction cardiaque par exemple).

Tous les tests utilisés font partie des tests classiquement utilisés dans la recherche préclinique et décrits dans la littérature. Cet enchaînement de tests permet de mettre en place un ensemble de données visant à déterminer l'impact de cette délétion dans le cadre d'un régime standard, mais aussi dans le cadre d'un enrichissement du régime en sucres et en graisse. Les analyses faites sur ces animaux seront optimisées (croisement des données générées entre différents test, nombre d'animaux réduit grâce aux analyses de puissance disponibles) afin d'éviter toute redondance dans l'étude des phénotypes engendrés par la mutation.

REPLACEMENT : Ce projet visant à étudier un mécanisme physiologique complet, l'utilisation d'un mammifère est indispensable car aucune méthode *in vitro* ou par modélisation informatique ne peut actuellement se substituer à l'étude du gène cible dans son environnement et ses interactions au sein de l'organisme.

REDUCTION : Une cohorte de 36 animaux sera utilisée afin d'obtenir une puissance statistique suffisante à l'étude, avec 9 animaux par groupe expérimental. Cet effectif a été déterminé à l'aide d'analyse de puissance sur les données déjà générées avec les tests employés. Il s'agit du meilleur compromis entre nombre d'animaux et taille des effets attendus, afin de pouvoir obtenir des résultats exploitables. Ce projet pourra s'appliquer à 10 lignées différentes par an, pour un nombre total d'animaux de 360 souris par an ou 1800 souris sur 5 ans de durée du protocole.

RAFFINEMENT : Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi journalier de la boisson, la nourriture et de l'état des animaux, ainsi qu'une pesée hebdomadaire. Les souris utilisées sont issues de lignée en cours d'élevage et pour lesquelles aucun signe de souffrance notable ou majeur n'a été observé dans des conditions d'élevage standard. Pour chaque procédure, des points limites spécifiques ont été mis en place. Ainsi, en cas d'hypoglycémie, une injection de glucose sera pratiquée, et lorsqu'une anesthésie sera pratiquée, un tapis chauffant maintiendra les animaux à bonne température, du gel ophtalmique sera appliqué pour éviter le dessèchement de la cornée.

19605 A l'échelle de la Terre, l'environnement change à un rythme sans précédent. Le changement climatique, la fragmentation des habitats, les interactions entre l'homme et la nature, l'émergence de nouvelles maladies ; tous ces facteurs exercent une pression intense sur des écosystèmes autrefois préservés. De tels changements sont exacerbés dans les milieux polaires des hautes latitudes où le forçage climatique, l'écotourisme et les zones de reproduction limitées accentuent le stress auquel sont soumis les populations animales, en particulier les oiseaux marins. Des connaissances sur les adaptations physiologiques individuelles des oiseaux marins et leurs limites sont nécessaires pour comprendre et prédire si les individus et les populations sont capables ou non de faire face aux changements environnementaux. Le présent projet a pour ambition de débiter un observatoire à long terme des réponses physiologiques des manchots royaux aux changements de leurs environnements. Le projet sera construit en combinant des données précédemment collectées, complétées par un suivi annuel d'un échantillon représentatif de manchots se reproduisant dans différentes conditions coloniales et saisonnières (l'objet de la présente demande). Ce suivi permettra d'étudier la variabilité inter- et intraannuelle des réponses physiologiques (en termes d'énergie et de stress) mises en oeuvre par les oiseaux face aux changements à terre de leur micro-habitat, des conditions de vie en colonie, du parasitisme et de la prédation. En combinant des protocoles d'échantillonnage standardisés sur le long-terme à des outils d'analyse statistiques avancés, nous étudierons la contribution des différentes sources exogènes de pressions environnementales (prédation, climat, parasitisme, dérangement lié à

l'homme) au phénotype du stress et à la reproduction du manchot royal, afin de comprendre à quels facteurs et à quelles périodes ces animaux sont le plus vulnérables au stress.

Au total, sur une période de 4 ans (2021-2025) le projet utilisera 1410 animaux dont 950 adultes et 460 poussins. Ces animaux seront répartis dans 3 protocoles distincts

(1) Suivi longitudinal de la physiologie, du comportement et du succès reproducteur de couples de manchots : 105 couples par an (210 adultes mâles et femelles) + 105 poussins (un poussin par couple) par an, le tout sur un suivi de 4 ans. Soit : 210×4 adultes + 105×4 poussins = 840 adultes + 420 poussins = 1260 animaux. Ces couples seront répartis dans différentes zones (7 zones au total) au sein de 3 colonies différentes représentant ainsi un effectif de 15 couples par zone. Cette répartition permettra de maximiser la variabilité des conditions de vie à terre et d'étudier l'effet de l'habitat et du microclimat sur les animaux et le développement de leur poussin.

(2) Études de la performance de plongée en mer et du comportement d'alimentation : 40 couples (80 adultes mâles et femelles) + 40 poussins (un poussin par couple) sur 2 années distinctes. Soit 80 adultes + 40 poussins = 120 animaux.

(3) Validation des mesures de température corporelle : 30 individus adultes (répartis sur 2 saisons) seront équipés d'enregistreurs de température sous-cutané afin de valider la fiabilité des données acquises grâce aux transpondeurs thermo-sensitifs utilisés pour le marquage des animaux des protocoles 1 & 2. Soit 30 adultes.

REMPLEUR : Ce projet vise à comprendre comment le manchot royal, une espèce protégée, réagit aux changements rapides de son environnement. Il n'est donc pas possible de remplacer l'utilisation des animaux. Le projet a pour objectif de constituer une base de données à long-terme sur les réponses physiologiques, comportementales et de reproduction de ces oiseaux au changement global, et contribue à informer et préserver ces espèces et leur habitat.

REDUIRE : Le projet est réfléchi afin de réduire au maximum l'impact des procédures sur le bien-être des animaux et réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Les études 2 & 3 seront réalisées sur deux saisons, nous permettant ainsi de réduire le nombre d'animaux manipulés la deuxième saison en fonction des résultats obtenus durant la première. Nous mutualisons également nos animaux et données avec d'autres programmes scientifiques (e. g. les données issues de l'étude sur le comportement alimentaire seront utilisées par 2 programmes de recherche distincts, et les données issues du suivi à long-terme viendront compléter une base de données à long-terme), et cherchons à répondre à plusieurs problématiques en n'utilisant qu'un groupe d'oiseaux. Par ailleurs, les effectifs animaux sont choisis à minima (15 couples par zone * 7 zones contrastées pour le suivi longitudinal ; ou 20 couples par an * 2 ans pour l'étude du comportement alimentaires) au regard d'analyses statistiques permettant de caractériser la variation naturelle observée. Ceci comprend notamment l'étude de l'attribution de variance à travers de modèles statistiques complexes (Modèles Linéaires Mixtes Généralisés (GLMMs), Analyses en Composantes Principales (ACP), Equations d'Estimations Généralisées (GEEs)).

RAFFINER : Des précautions particulières sont prises pour minimiser le dérangement des animaux et réduire l'impact des procédures sur leur bien-être. En termes de Raffinement, nous avons développé une méthodologie d'étude du fonctionnement mitochondrial visant à remplacer les biopsies musculaires par l'analyse des cellules sanguines, ce qui limite considérablement le côté invasif des expérimentations. De manière semblable, nous combinons l'utilisation de transpondeurs pour l'identification des animaux avec la collecte des données de température corporelle afin de minimiser le côté invasif de nos manipulations (transpondeurs thermo sensitifs). Les interventions sur les animaux se limitent en fait à des captures, pesées, mensurations, prises de sang à la veine ailaire, identification par transpondeur et pose de biologgers très majoritairement externes. Le temps de manipulation est qui réduit au minimum grâce notamment à l'intervention de chercheurs confirmés et formés à manipuler des manchots royaux. Durant les manipulations les animaux ont de plus les yeux couverts d'une cagoule opaque qui limite leur stress. Toutes les manipulations sont effectuées dans le calme et les oiseaux sont surveillés en permanence pendant les interventions et quotidiennement après. Nous avons fixé le point limite d'arrêt des manipulations à l'apparition de polypnée (indice du stress de l'animal). Les biologgers utilisés sont fixés (de manière non

permanente) en externe sur les plumes dorsales, ce qui n'entraîne pas de souffrance chez l'animal. Les modèles que nous déployons sont utilisés en routine avec succès chez cette espèce depuis plusieurs années, sans effets négatifs sur la reproduction et la survie.

19606 L'athérosclérose est une pathologie complexe et multifactorielle caractérisée par l'accumulation de gras et d'éléments fibreux dans les artères de gros et moyen calibre. C'est l'une des principales causes d'infarctus du myocarde et d'accidents vasculaires cérébraux en France. Cette maladie est extrêmement répandue dans la population, en effet nous développons tous des lésions d'athérosclérose au cours de notre vie. Cependant, la gravité et la progression des lésions varient selon le mode de vie (stress, tabagisme et alimentation) et la présence de facteurs de risque (diabète, hypertension et obésité etc...) de l'individu. Cette pathologie induit une réduction progressive du calibre du vaisseau pouvant conduire à son obstruction totale (stade le plus avancé de la maladie). De ce fait l'athérosclérose est la principale cause d'accidents cardiovasculaires et reste la première cause de mortalité dans le monde. Une des raisons de cette forte mortalité est la prise en charge tardive des patients due à un développement "silencieux" ou asymptomatique de la maladie au cours des premiers stades. Il est donc primordial but de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'évolution de la maladie afin de prévenir sa progression et de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques.

Ce projet nécessite de recourir à l'utilisation d'un modèle d'étude animal car l'ensemble des effets étudiés étant des effets physiologiques ou physiopathologiques, il n'y a pas d'autre alternative d'étude que l'utilisation d'un modèle animal. De plus, le développement de l'athérosclérose ne peut être modélisé en boîte de pétri, il n'y a donc pas d'alternative de remplacement. Enfin, la souris est le seul modèle animal dans lequel l'invalidation génétique de nos cibles thérapeutiques de façon totale ou tissu-spécifique a été réalisée. Ainsi, nous utiliserons des souris génétiquement modifiées mise sous régime gras afin de mimer le développement de l'athérosclérose chez l'animal.

Une attention toute particulière au bien-être des animaux sera portée par l'application stricte de la règle des 3R dont les objectifs sont de réduire au maximum le nombre d'animaux, de raffiner en supprimant ou soulageant l'inconfort, la détresse et l'angoisse subit par les animaux et de remplacer l'utilisation des animaux en travaillant sur des cellules ou des tissus.

Le nombre d'animaux a été réduit au maximum en respectant les contraintes de publication, sans compromettre les objectifs du projet et pour permettre de bonnes analyses statistiques (test paramétrique de type ANOVA avec corrections de Bonferroni) et les expérimentations ont été optimisées pour être regroupées chez le même animal dès que possible. Les études statistiques antérieures ont montré que des groupes de 20 animaux sont en moyenne requis pour obtenir une distribution normale des mesures.

Dans le cadre du raffinement, une procédure de suivi des animaux est mise en place quotidiennement pour évaluer leur état général, pour contribuer à l'enrichissement du milieu de vie, et respecter leur vie de groupe (regroupement de mâles d'une même fratrie, ne pas changer un animal de cage, ni isoler une souris de ses congénères). Ce suivi complet permettra de repérer les points limites d'arrêt de procédure tels qu'une perte de poids de plus de 20%, la prostration, un mauvais état du pelage, une altération drastique de la prise alimentaire ou encore des changements physiques majeurs (dos voûté ou hydrocéphalie).

Des expériences de remplacement seront ponctuellement réalisées in vitro sur des cellules musculaires lisses vasculaires mais ne permettent pas d'étudier les effets physiopathologiques. Ces expériences viendront donc toujours en complément de l'expérimentation animale.

Le nombre de souris nécessaire pour conduire ce projet est de 2400 animaux (30 groupes d'animaux comportant 80 animaux par groupes) sur 5 ans.

19607 Ce projet est dédié à la formation et qualification du personnel aux gestes techniques nécessaires à la bonne réalisation des procédures expérimentales. Il répond aux exigences réglementaires de l'arrêté du 1er février 2013 relatif à l'acquisition et à la validation de compétences du personnel des établissements utilisateurs, éleveurs et fournisseurs d'animaux à des fins scientifiques. L'objectif de

ce projet est d'assurer une formation/qualification aux gestes techniques de qualité tout en garantissant le bien-être des animaux. Le programme de formation/qualification comprend l'apprentissage de procédures non ou faiblement invasives, telles que l'implantation sous-cutanée d'un transpondeur, l'administration de substances (par voie orale, sous-cutanée, intra-veineuse, intra-péritonéale, intra-musculaire, intradermique et intra-nasale) et les prélèvements sanguins via différentes voies veineuses (veine caudale, jugulaire, saphène, submandibulaire) ou par voie intracardiaque.

Les espèces concernées par ce projet sont les rongeurs, animaux les plus couramment utilisés en recherche biomédicale, à savoir le rat, le cobaye et la souris.

L'ensemble de ce projet a été élaboré en prenant en considération les exigences éthiques de remplacement, de réduction et de raffinement des procédures sur l'animal.

Remplacement :

Des méthodes alternatives comme des vidéos de formation ou encore le recours à des mannequins ont servi de support pour l'explication des différents gestes techniques. Cependant, ces méthodes alternatives ne suffisent pas pour former le personnel à leur réalisation en conditions réelles, c'est pourquoi, dans le cadre de ce projet, l'utilisation d'animaux vivants est indispensable in fine.

Réduction :

Sur les 5 ans prévus de formation continue, les animaux utilisés seront principalement des animaux de réforme de l'animalerie de l'établissement où se déroule la formation. Le nombre d'animaux utilisés sera réduit au maximum, tout en permettant la répétition de gestes techniques sur le même animal. Ceci dans le respect des volumes d'administration et de prélèvements propres à chaque espèce, dans la mesure où cela n'entrave pas le bien-être animal. Ce nombre est estimé à 2560 animaux au maximum pour 5 ans (à raison de 512 animaux par an), soit pour 5 ans : 1110 rats, 940 souris et 510 cobayes.

Raffinement :

Des points limites sont prédéfinis afin de nous permettre de réagir précocement et de prévenir tout inconfort ou souffrance animale.

Au cours de la formation, les gestes techniques seront réalisés sur animal vigile ou sur animal anesthésié afin d'assurer une bonne contention et générer le moins de stress possible. Les formations seront assurées par un formateur qualifié, et pour chaque participant, une période obligatoire prédéfinie de requalification sera fixée. Il est à noter que la bonne exécution d'un geste technique d'administration ou de prélèvement, de manière affirmée et précise, permet de raccourcir la durée de contention, de générer moins de stress, de peur et/ou de douleur chez l'animal. Ainsi l'apprentissage de ces gestes techniques et leur bonne exécution est en faveur du bien-être animal.

19608 Les sarcomes des tissus mous (STS) sont des cancers rares mais agressifs, représentant 1% des tumeurs solides de l'adulte. La survie globale médiane des sarcomes avancés est comprise entre 12 et 18 mois et le taux de réponse moyen aux chimiothérapies est de 10 – 20%. Les connaissances actuelles sur le microenvironnement tumoral des STS sont très limitées et les essais cliniques d'immunothérapie ne donnent pas toujours des résultats satisfaisants. L'efficacité des immunothérapies étant tributaire de l'interaction des cellules immunitaires infiltrant les tumeurs, il est donc nécessaire d'analyser en détail le microenvironnement tumoral des sarcomes composé de cellules lymphocytaires infiltrant les tumeurs, de macrophages tumoraux ou encore de cellules myéloïdes suppressives et également composé de structures lymphoïdes tertiaires. Les sarcomes comprennent plus de 70 sous-types histologiques, tous avec une signature biologique unique, ce qui augmente la difficulté d'une analyse complète. Nous avons récemment démontré qu'indépendamment de leurs sous-types histologiques, les STS peuvent être divisés en 5 classes immunitaires de sarcomes (classes A à E) en fonction de la composition de leur microenvironnement tumoral. Nous avons également révélé qu'une des classes (E) possède une signature de cellules immunitaires plus élevée et des structures lymphoïdes tertiaires (TLS) plus nombreuses. Ces caractéristiques semblent corrélées avec les réponses thérapeutiques au traitement anti-PD-1, un inhibiteur de points de contrôle immunitaire. Les mécanismes de régulation

des réponses immunitaires et de la composition du microenvironnement tumoral au cours des immunothérapies vont être analysés afin d'identifier les facteurs prédictifs de réponse aux immunothérapies. Récemment, il a été montré que la déplétion des macrophages tumoraux par la trabectedine pourrait induire une augmentation de l'efficacité de l'immunothérapie par les anticorps anti-PD1 dans les sarcomes métastatiques. Par conséquent, l'impact de la déplétion des macrophages tumoraux par la trabectedine par exemple sera analysé avant et après le traitement anti-tumoral (avec l'anticorps anti-PD1) in vivo.

Afin d'analyser et d'étudier le rôle des structures lymphoïdes tertiaires dans les sarcomes et l'impact de ces structures sur les traitements anti-tumoraux, il est nécessaire de développer in vivo des modèles de sarcomes murins présentant des TLS et regarder la réponse aux immunothérapies chez ces modèles porteurs de TLS. Nos résultats dans ce projet fourniront une analyse exhaustive du microenvironnement tumoral des sarcomes et devraient révéler les mécanismes immunorégulateurs des STS qui sont essentiels pour le développement des futures stratégies thérapeutiques.

Pour répondre à tous les objectifs de ce projet nous aurons différentes procédures en utilisant des molécules à visées thérapeutiques dans nos différents modèles de sarcomes murins. Pour l'ensemble du projet (3 ans), nous utiliserons 3910 souris.

Tous les animaux demandés pour ce projet seront utilisés.

Conformément à la directive 2010/63/UE et des arrêtés du 1er février 2013, les règles de bien-être animal et la théorie des 3R seront respectées et se portera ainsi :

1) Remplacer

les modèles animaux est parfois possible en travaillant sur des cellules ou des tissus (in vitro) ou encore sur des modèles numériques (in silico). Le recours aux modèles in vitro ou in silico doit être l'objectif du chercheur si l'objectif de son expérimentation le permet. Les applications in vitro ne permettent pas de répondre entièrement à nos objectifs car des cellules isolées ne peuvent refléter la complexité du système immunitaire, de la vascularisation et du microenvironnement tumoral. L'expérimentation animale est ainsi nécessaire afin d'étudier ces interactions complexes au sein d'une tumeur et de chercher des cibles thérapeutiques. Les modèles animaux ne peuvent pas être remplacés car nous étudions la progression des tumeurs dans les sarcomes ainsi que la composition du microenvironnement tumoral dans un modèle de sarcome murin où le système immunitaire et le microenvironnement jouent un rôle primordial. De plus, les souris ont été choisies comme modèle expérimental car notre traitement reconnaît aussi bien les protéines humaines et murines. L'efficacité d'un traitement ne peut être évaluée que sur un organisme entier pour ne pas se restreindre à un effet observé dans un système cloisonné. Ceci ne peut donc pas être étudié in vitro.

2) Réduire

le nombre d'animaux en expérimentation. Cet objectif vise à diminuer le nombre d'animaux utilisés à des fins de recherche par : la limitation aux seules expériences considérées comme absolument indispensables, la réduction des répétitions inutiles d'études antérieures, la rédaction d'un protocole expérimental avant toute expérimentation, sachant qu'une étude bien préparée rend souvent inutile d'autres essais sur les animaux. Les expériences seront regroupées pour limiter le nombre des animaux des groupes contrôles. De plus, l'expérience acquise dans d'autres modèles tumoraux et l'anticipation des doses adéquates à injecter par l'étude bibliographique permettent de réduire le nombre de souris utilisées.

3) Raffiner

signifie optimiser l'expérimentation grâce à la méthodologie appliquée aux animaux : il s'agit de réduire, supprimer ou soulager leur douleur ou leur détresse, et ainsi d'améliorer leur bien-être. En amont de l'expérience, raffiner consiste à choisir avec soin le modèle animal utilisé, améliorer les conditions de transport et d'élevage et de fixer des points limites. Pendant les expérimentations, l'apport d'enrichissement, de soins, d'antalgiques si nécessaire, et opter pour des méthodes les moins invasives possibles et minimiser les contraintes altérant la qualité de vie des animaux sont

indispensables pour le bien être animal. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie.

19609 Notre établissement est un laboratoire agréé par le Ministère de l'Agriculture pour réaliser les analyses des contrôles officiels de coquillages issus des zones de production et mis sur le marché. Il est ainsi amené à mettre en oeuvre plusieurs méthodes d'analyse pour évaluer la salubrité des coquillages dont le dosage des toxines paralysantes dans les coquillages selon la méthode officielle par bioessai sur souris. Ce projet concerne la réalisation des analyses du contrôle officiel des toxines paralysantes dans les coquillages.

Notre établissement applique la méthode officielle publiée par le laboratoire national de référence ou LNR sous l'intitulé "Analyses de toxines paralysantes (ou PSP) par bioessais sur souris présentes dans la chair de coquillages".

Cette méthode est adaptée des méthodes diffusées par le Laboratoire Communautaire de Référence « Biotoxines Marines » pour les toxines paralysantes (PSP).

Le protocole expérimental consiste en l'injection de 1 ml d'extrait de coquillages ou d'une solution étalon de saxitoxine par voie intrapéritonéale dans l'abdomen d'un lot de souris mâles âgées de 3 à 4 semaines et de poids compris entre 18 et 20g par voie intrapéritonéale dans l'abdomen. Les symptômes des souris, spécifiques aux toxines en présence, sont observés pendant 1 heure. Le délai de mort des souris (test de toxicité aigüe) permet de quantifier les toxines.

Passé le délai d'une heure, la durée d'observation imposée dans les méthodes officielles n'est jamais prolongée, les souris survivantes sont systématiquement euthanasiées par dislocation cervicale afin de limiter la douleur/souffrance animale.

Dans le but de réduire au maximum les contraintes imposées aux souris et de manière à recevoir des animaux répondant parfaitement aux pré-requis du bioessai (poids compris entre 18 et 20 g), les animaux sont commandés chez nos fournisseurs pour un poids bien spécifique. La garantie de ce poids nécessite alors de réaliser les analyses 24 h après la réception des animaux dans notre établissement. Passé ce délai, la variabilité du poids des animaux est telle qu'on ne dispose plus de lots homogènes, ce qui rend alors impossible la réalisation des analyses. Afin de réduire leur stress, les animaux sont répartis par groupe dans des cages conformes à la réglementation et ce, dès leur réception dans notre établissement.

Après distribution des soins appropriés (nourriture, biberons d'eau), les souris sont laissées au repos.

Une visite en fin de journée puis le lendemain matin, au moment de l'enlèvement de la nourriture, permet de s'assurer de leur bon état général.

Le nombre de souris utilisées par an fluctue en fonction du nombre d'échantillons reçus. Jusqu'en 2015, 150 à 180 souris étaient utilisées en moyenne par an.

Ce nombre a diminué fortement en 2016 suite à la décision de la Direction Générale de l'Alimentation de ne pas faire de prélèvement en 2016. A partir de 2017, le plan de surveillance a été réactivé. On estime entre 1200 et 1650 le nombre d'animaux utilisés pour ce projet pour une année (6000 à 8250 pour 5 années).

Pour réduire au maximum le nombre d'animaux, les séries d'échantillons sont dimensionnées de façon optimale en fonction des délais de rendu des résultats. De plus, le personnel en charge des bioessais a été formé par le LNR. Il maintient ses compétences annuellement en participant à un essai interlaboratoire organisé par le Laboratoire National de Référence (LNR). Sa formation et son expérience lui permet notamment d'évaluer au plus juste le nombre d'animaux à commander pour chaque série de tests en fonction du type d'échantillons reçus (Plan de Surveillance et Plan de Contrôle (PSPC), alerte, surveillance sanitaire des phycotoxines réglementées dans les zones de production de coquillages (REPHYTOX).

Notre établissement est un laboratoire agréé par le Ministère de l'Agriculture pour réaliser les analyses de surveillance et de contrôle pour le compte de différentes DD(CS)PP. Dans le règlement (CE) N°2074/2005 le bioessai sur souris est la méthode de routine et de référence en cas de litige

jusqu'au 31/12/2018. A partir du 01/01/2019, la méthode officielle pour les analyses de routine réalisées par les laboratoires agréés reste le bioessai mais en cas de contestation d'un résultat par bioessai, le LNR mettra en oeuvre une méthode chromatographique AOAC OMA 2005. 06 dite de Lawrence. Cette méthode étant très complexe à mettre en oeuvre en routine, le LNR travaille sur une autre méthode chimique dite PCOX qui devra être validée d'ici fin 2019 pour une mise application par le réseau de laboratoires agréés dont notre établissement au 01/01/2020. Ce transfert de méthode mettra ainsi fin à l'expérimentation animale au sein de notre établissement.

19610 Pour évaluer la sécurité des produits chimiques et ne soumettre à autorisation que des produits dont le profil toxicologique garantit l'absence d'effet néfaste sur la santé humaine, différentes études sont nécessaires. Ces études combinent des modélisations mathématiques par ordinateurs (études *in silico*), des modèles cellulaires (tests *in vitro*) et des modèles animaux (études *in vivo*).

Ce projet a pour objectif de mettre au point des études précoces chez l'animal afin d'évaluer de potentiels perturbateurs endocriniens, en particulier ceux pouvant affecter l'activité de l'aromatase, et en éviter ainsi le développement. L'aromatase étant l'enzyme responsable de la biosynthèse des estrogènes, hormones fondamentales pour la physiologie du développement et de la reproduction, et pouvant être mise en cause dans la genèse de certains cancers dits estrogéno-dépendants.

Le concept est donc de traiter un groupe de rats juveniles (avant la puberté des femelles) avec un androgène connu, un autre groupe avec un estrogène connu et de comparer le poids de l'utérus à des animaux contrôles. Le poids de l'utérus devrait donc être augmenté dans les deux groupes traités. La première étude consistera à le vérifier et à valider les doses à utiliser dans la 2ème étape du projet. L'effet de la co-administration d'un inhibiteur d'aromatase sera alors testée dans cette deuxième étape.

Ce projet respecte la règle des 3 Rs : En effet, en caractérisant de manière précoce ce profil et ainsi en déterminant précisément s'il peut déclencher un effet toxique sur un ou des tissus candidats, la conduite d'études à plus long terme (et/ou comportant plus d'animaux) sera évitée si les produits testés ont un profil toxicologique défavorable. De plus, si ce test *in-vivo* valide les résultats des essais *in-vitro* développés en parallèle, les études utilisant des animaux pourront ne plus être utilisées.

Toutes ces études se font dans le respect des 3Rs avec un nombre restreint d'animaux. Un total estimé de 500 rats pourra être utilisé sur 3 années pour ce projet. Les animaux seront hébergés par groupe avec un enrichissement du milieu adapté à leur âge et à leur espèce. Les animaux sont observés tous les jours (week-ends compris). Des points limites ont été définis par le laboratoire, conditionnant l'appel à un vétérinaire du site. A la fin de chaque étude, une évaluation rétrospective sur le bien-être animal est réalisée par la structure du bien-être animal et le comité d'éthique.

19611 Le cortex cérébral, siège des fonctions neurologiques les plus avancées, est la partie superficielle qui englobe les hémisphères cérébraux. Il est composé de six couches juxtaposées contenant différents types de neurones excitateurs (ou neurones de projections) dont la nature et la fonction sont spécifiques de la couche à laquelle ils appartiennent. Le développement du cortex débute dès la vie embryonnaire et la formation des couches corticales se fait de manière séquentielle : Les neurones de chaque couche proviennent de progéniteurs qui, après prolifération, se différencient en neurones qui migrent par vagues successives pour atteindre leur localisation finale. Ils y entament ensuite une phase de maturation, étape essentielle à l'établissement d'un réseau fonctionnel. La perturbation de ces processus (prolifération, migration et/ou maturation) entraîne des malformations du développement cortical, défauts observés dans différentes pathologies neurologiques, telles que les maladies neurodéveloppementales de l'enfant (comme les microcéphalies, épilepsies...) ou certaines maladies neurodégénératives, comme la maladie de Huntington. Comprendre comme se forme le cortex est donc la condition sine qua non pour décrypter les maladies liées aux malformations du développement cortical et les mécanismes physiopathologiques associés. Le présent projet vise à caractériser les anomalies du développement cortical en condition normale et pathologique dans différents modèles murins (maladie de Huntington et malformations du développement cortical liées à des défauts d'adhésion

cellulaire). Ces nouvelles données permettront de mieux appréhender les mécanismes physiopathologiques se déroulant lors de la corticogenèse embryonnaire et participant à l'apparition des pathologies étudiées.

Nous avons élaboré ce projet en prenant en compte la règle des 3 R : • Remplacer : L'étude de la corticogenèse nécessite le recours au modèle murin car il permet de préserver l'environnement du développement utérin (impliquant différents types cellulaires qui interagissent entre eux, ce qui ne peut être reproduit en culture cellulaire). Nous utiliserons, dès que cela sera possible, des cultures cellulaires afin de valider les outils moléculaires (plasmides, marqueurs...) qui seront ensuite injectés chez l'animal. • Raffiner : Toutes les procédures expérimentales seront réalisées dans un établissement autorisé en stricte conformité avec le comité local de protection des animaux, les lignes directrices de l'UE (directive 2010/63/UE) et le Comité national français (2010/63) pour les soins et l'utilisation des animaux de laboratoire. Les animaux seront hébergés et surveillés dans des conditions répondant aux critères relatifs aux soins et à l'hébergement des animaux de l'Annexe II du 1er février 2013 de l'arrêté fixant les conditions d'agrément. Le soin et l'hébergement des animaux, ainsi que la conception et l'application des procédures expérimentales, seront effectuées quotidiennement par du personnel compétent et formé. Dans ce but, des points limites spécifiques à chaque procédure ont été clairement établis afin de prendre les mesures nécessaires pour prévenir, minimiser et/ou abroger la souffrance et le stress de l'animal (par anesthésie et analgésie) • Réduire : Le nombre d'animaux a été déterminé en prenant en compte les différentes lignées murines (témoin et génétiquement modifiées, quatre au total) et les deux procédures expérimentales nécessaires à l'étude. Ce nombre a été estimé en réduisant au maximum le nombre d'animaux utilisés afin d'obtenir des résultats significativement exploitables et valides. Afin d'extraire le plus de données possibles sur un nombre minimum d'animaux, le matériel biologique récupéré sera utilisé au maximum et différentes expériences seront combinées. Pour ce projet, dont la durée est de 5 ans, nous prévoyons d'utiliser 1100 femelles gestantes (55 souris par lignée et par an) et 8800 embryons (8 embryons en moyenne par femelle gestante), soit un total de 9900 animaux.

19612 L'ataxie de Friedreich (AF) est une maladie neurodégénérative d'origine génétique due à l'atteinte de certaines cellules du système nerveux. Elle constitue l'ataxie héréditaire récessive la plus fréquente (prévalence : 1/50 000) et touche indifféremment les deux sexes. Elle se traduit avant tout par des troubles de l'équilibre et de la coordination des mouvements (ataxie). Cette maladie ne bénéficie à l'heure actuelle d'aucun traitement curatif.

Le dysfonctionnement neuronal de l'AF débute dans les neurones proprioceptifs des ganglions de la racine dorsale (GRD) présents le long de la colonne vertébrale. Les neurones proprioceptifs sont responsables de la sensibilité profonde. Ils permettent de positionner le corps dans l'espace, de savoir où se trouvent les différentes parties du corps les yeux fermés. Leur perte oblige à réajuster les mouvements en permanence.

Les corps cellulaires des neurones proprioceptifs sont recouverts d'une monocouche de cellules gliales nommées « cellules satellites gliales » (CSG). Les CSG contribuent notamment au maintien du fonctionnement normal et de la survie des neurones proprioceptifs. Toutefois le rôle des CSG dans le développement de l'AF n'est pas connu.

Ce projet de recherche vise à comprendre le rôle respectif des propriocepteurs et des CSG dans le développement et l'évolution de l'AF et de déterminer dans quelle mesure les CSG pourraient constituer des cibles thérapeutiques potentielles.

Seule l'expérimentation in vivo, reproduisant le plus fidèlement possible les interactions cellules gliales-neurones dans l'environnement physiopathologique, permettra de répondre à cette question. Pour cela, sur une période de 5 ans, nous utiliserons 1046 souris transgéniques et témoins. Des études comportementales pour mesurer la posture et la coordination motrice, la sensibilité mécanique et thermique, ainsi que des études de biologie moléculaire, d'immunohistochimie et d'imagerie calcique seront menées afin de mesurer l'activité des cellules et de quantifier l'expression de molécules.

Ce projet sera mis en œuvre dans le respect de la règle des « 3R » :

1) REMPLACER :

Les procédures expérimentales ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information.

2) REDUIRE :

Les différentes procédures expérimentales ont été consciencieusement pensées et élaborées afin de réduire le nombre d'animaux inclus dans le projet tout en permettant d'obtenir des résultats statistiquement satisfaisants.

3) RAFFINER :

Afin de minimiser la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, les procédures se dérouleront sous anesthésie générale et des points-limites sont établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

À terme, les résultats de ce projet permettront de mieux comprendre le rôle des CSG dans les altérations neuronales retrouvées dans l'AF et les mécanismes impliqués. Et plus généralement, ces résultats pourraient présenter un intérêt translationnel pour le traitement des maladies neurodégénératives en général, de nombreuses similarités étant observées dans les mécanismes neuropathologiques de ces maladies.

19613 1. OBJECTIF DU PROJET :

Le TLR3 est un récepteur de l'immunité permettant au corps de se protéger des infections virales. Il est exprimé par les cellules immunitaires et épithéliales normales ainsi que de très nombreux cancers solides. Le concept du TLR3 comme cible anticancéreuse existe depuis près de 30 ans, même si son mécanisme exact n'est connu que depuis peu. L'activation de ce récepteur entraîne une mort programmée spécifique des cellules cancéreuses (pas des cellules normales), ainsi qu'une inflammation locale ayant un effet antitumoral. La conjugaison de ces deux mécanismes d'action induit une autovaccination à long terme contre la tumeur. Malgré cette efficacité clinique reconnue, aucun activateur de ce récepteur n'a jusqu'ici obtenu l'autorisation de mise sur le marché en raison de grand manque d'homogénéité (taille, structure et séquences), d'effets toxiques ou de manque d'efficacité. Une nouvelle famille d'activateurs de ce récepteur a récemment été découverte (dont le candidat médicament de cette étude), homogène, actif, spécifique et très peu toxique.

Deux premières études sur modèles murins ont permis d'objectiver l'efficacité de ce nouveau candidat médicament en voie locale (intratumorale). Afin de favoriser l'administration par voie veineuse, les extrémités de ce candidat médicament seront modifiées avec des sucres ou des lipides spécifiques, afin de pouvoir se fixer spécifiquement sur des cibles tumorales préférentielles. Lors d'une administration par voie intraveineuse, ces modifications permettent donc de diminuer fortement les doses nécessaires à l'activité du médicament tout en limitant sa propagation à des organes/tissus non désirés.

L'objectif de cette étude est donc d'observer les effets de ces ajouts en localisant et quantifiant au cours du temps, ces molécules modifiées (à l'une ou l'autre de leurs extrémités), dans l'ensemble du corps de la souris (organes, sang et tumeurs). Afin d'examiner directement la spécificité tumorale liée à ces ajouts, deux tumeurs différentes, ciblées de façon radicalement différente par les ajouts de sucre ou de lipide, seront greffées sur les deux flancs opposés de la même souris. Pour réaliser cette étude, ces molécules seront toutes marquées avec une molécule fluorescente. C'est cette fluorescence qui permettra de localiser et de quantifier au cours du temps, ces différentes molécules grâce à des méthodes innovantes d'imagerie en trois dimensions. Cela permettra d'obtenir ce que l'on appelle la biodistribution corporelle de ces composés. Ainsi, six différentes molécules (modifiées ou non par un sucre ou un lipide – à chaque différente extrémité – toutes marquées par une molécule fluorescente), seront analysées.

Pour chacune des six molécules modifiées, quatre souris, seront injectées par voie intraveineuse afin de connaître leur biodistribution au cours du temps. Les souris seront analysées quand leurs tumeurs atteindront au maximum 300mm³.

2. CONFORMITE AUX EXIGENCES DE REMPLACEMENT, DE REDUCTION ET DE RAFFINEMENT.

La règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer) sera respectée :

- REDUCTION : Cette étude est menée dans un but prospectif. Ainsi l'utilisation de 4 souris par molécules est considérée comme suffisante pour une validation de preuve de concept. Il est à noter que la greffe des deux tumeurs différentes, sur les deux flancs opposés de la même souris, permet de réduire de moitié le nombre d'animaux nécessaires à cette étude sans compromettre les résultats scientifiques.

- RAFFINEMENT : Les souris seront hébergées en groupe sociaux de 3 à 5 animaux, en environnement enrichi avec eau et nourriture (non fluorescente) à volonté, avant leur analyse.

Le changement d'alimentation pour une nourriture non fluorescente est généralement très bien toléré par les animaux et n'engendre pas de diarrhées ou autres troubles digestifs.

La mise en place d'une grille de score et d'une fréquence de surveillance des animaux adaptée à l'étude, permettra d'éviter toute souffrance animale. La surveillance des animaux sera effectuée deux fois par semaine avec une analyse scorée du comportement animal, du poids corporel et du volume tumoral.

Les souris seront greffées en injection sous-cutanée avec 1 million de cellules tumorales de cancer de vessie (flanc gauche), et de cancer du foie (flanc droit), sous anesthésie gazeuse. Il est à noter que ces deux modèles ont des comportements et cinétiques de croissance très similaire.

La taille des tumeurs de maximum 300mm³, permet à la fois une bonne analyse de la fluorescence ainsi qu'une souffrance et une gêne physique minimale pour l'animal, avec moins de risque de nécrose.

L'imagerie par fluorescence est un processus non invasif et non douloureux mais nécessitant l'immobilité de la souris pendant l'acquisition des données. Pour réaliser une acquisition, l'animal est donc anesthésié sous isoflurane et est ensuite placé dans une cassette de contention pour éviter tout mouvement et cette dernière est ensuite glissée dans la chambre noire de l'appareil. L'acquisition dure environ 5 minutes. De l'air chauffé circule dans l'espace d'acquisition de l'appareil et permet de maintenir constante la température de l'animal. Ce temps court d'acquisition, permet à l'animal une récupération rapide et autorise de répéter les acquisitions selon la cinétique décidée. Les animaux sont ensuite placés sur un plateau chauffant avec une lumière chauffante pour qu'ils se réveillent rapidement et dans de bonnes conditions.

- REMPLACEMENT : Seul un modèle in-vivo sera à même d'analyser la biodistribution dans les organes/tissus/tumeurs au cours du temps lors d'une injection intraveineuse.

- DEVENIR DES ANIMAUX : Tous les animaux de l'expériences seront mis à mort à la fin de l'étude par dislocation cervicale sous anesthésie gazeuse. Il en sera de même pour les animaux n'entrant pas dans le critère de l'étude (absence de croissance tumorale, tumeur trop grosse... etc.), ou exclus sur critères éthiques.

- RETOMBEES DE L'ETUDE : Cette étude, comprenant une seule procédure, permettra de définir les bases pour une nouvelle voie d'administration du candidat médicament, en ciblant plus spécifiquement certains types de tumeurs, ce qui diminue les doses nécessaires à son activité ainsi que les effets indésirables. Il s'agit d'une étude de recherche fondamentale et translationnelle, permettant de poser les bases d'une nouvelle voie d'administration d'un candidat médicament anticancéreux, en vue d'une étude clinique chez l'homme.

3. Nombre total d'animaux inclus dans le projet : 24 Souris de souche Balb-c/nude

19614 1-Contexte scientifique, médical et social du projet

- Physiopathologie du muscle strié squelettique / Myopathies
- Recherche fondamentale

2-Objectifs du projet

La régénération musculaire faisant suite à une blessure ou due à une pathologie musculaire repose sur les capacités des cellules souches du muscle qui s'activent, se multiplient et fusionnent pour former de nouvelles fibres musculaires et restaurer la fonction du tissu musculaire. Une question clé est l'environnement tissulaire au sein duquel les cellules souches musculaires sont activées, et notamment les cellules voisines autour des cellules souches. Les analyses in vivo sont nécessaires pour identifier les interactions cellulaires au cours de la réparation du tissu et de l'activité musculaire. Le projet vise à marquer différents types cellulaires à l'aide d'une protéine fluorescente dans des conditions de régénération musculaire normale ou pathologique (myopathies) et de protocoles d'augmentation de l'activité musculaire par électrostimulation neuromusculaire afin d'analyser in vivo et ex vivo le fonctionnement de ces cellules.

3-Balance dommages/bénéfices

Le projet vise à injecter le composé (tamoxifène) dans des lignées de souris transgéniques afin d'étudier le comportement de différentes cellules impliquées dans le fonctionnement du muscle squelettique. Cinq procédures sont utilisées :

- Dans la première procédure, l'injection de tamoxifène est réalisée dans des animaux adultes normaux ou myopathiques afin de marquer les cellules d'intérêt (vaisseaux et fibroblastes). Après plusieurs semaines, les animaux sont mis à mort afin d'analyser leurs tissus.
- Dans la seconde procédure, l'injection de tamoxifène est réalisée dans des femelles gestantes normales ou myopathiques afin de marquer dans la descendance les cellules de l'inflammation (macrophages) résidents dans le tissu musculaire. Les animaux sont mis à mort à l'âge adulte afin d'analyser leurs tissus.
- Dans la troisième procédure, l'injection de tamoxifène est réalisée dans des animaux adultes normaux afin de marquer les cellules souches musculaires. Les animaux sont ensuite transférés dans un autre établissement utilisateur pour une expérimentation d'électrostimulation, à la fin de laquelle les animaux sont mis à mort afin d'analyser leurs tissus.
- Dans la quatrième procédure, l'injection de tamoxifène est réalisée dans des animaux adultes normaux afin de marquer les cellules d'intérêt (cellules myogéniques, vaisseaux et fibroblastes). Les animaux sont ensuite transférés dans un autre établissement utilisateur pour la réalisation d'une lésion musculaire physiologique, à la suite de laquelle les animaux sont mis à mort afin d'analyser leurs tissus.
- Dans la cinquième procédure, l'injection de tamoxifène est réalisée dans des femelles gestantes normales afin de marquer dans la descendance les cellules de l'inflammation (macrophages) résidents dans le tissu musculaire. Les animaux sont ensuite transférés à l'âge adulte dans un autre établissement utilisateur pour la réalisation d'une lésion musculaire physiologique, à la suite de laquelle les animaux sont mis à mort afin d'analyser leurs tissus.

Les animaux seront soumis à un total de 5 injections maximum en intra-péritonéal sur animal vigile. Le degré de gravité de la procédure expérimentale est estimé modéré pour les souris gestantes, et léger pour les souris non gestantes.

4-Conformité avec la règle des 3R

Remplacer :

Pour ce projet, les modèles animaux sont indispensables car la procédure implique un exercice d'électrostimulation neuromusculaire qui est impossible à reproduire in vitro. Aussi, les études de physiologie nécessitent l'utilisation de modèles animaux car seule l'analyse du tissu, voire de l'organisme entier permet d'identifier le réel impact de ces interactions moléculaires et cellulaires sur la fonction de l'organe.

Réduire :

L'utilisation des animaux est strictement réduite au nombre nécessaire pour l'établissement des données expérimentales, à l'aide des analyses statistiques effectués précédemment pour ces procédures. Des banques biologiques informatisées issues des expérimentations limitent l'utilisation de nouveaux animaux car elles permettent les études histologiques pour plusieurs

analyses. Des prélèvements multiples sont réalisés après mise à mort sur le même individu pour des tests parallèles.

Le nombre d'animaux pour ce projet est au maximum de 1532 souris.

Raffiner :

Les protocoles les moins invasifs et les moins douloureux possibles sont privilégiés. Des mesures sont prises pour améliorer les conditions d'élevage et de bien-être afin d'enrichir l'environnement des souris. Nous utilisons des lignées de souris transgéniques de phénotypes non dommageables qui permettent le traçage des cellules d'intérêt par un marqueur fluorescent. Nous travaillons sur des souris adultes. Les souris seront utilisées entre 8 et 24 semaines d'âge en fonction de la durée des protocoles.

19615 Ce projet se situe dans le domaine de la recherche expérimentale en neurosciences et vise à étudier les mécanismes cérébraux susceptibles de jouer un rôle protecteur contre l'apparition des troubles de mémoire dans le contexte de la Maladie d'Alzheimer (MA). L'identification et la compréhension de ces mécanismes pourraient favoriser l'émergence de nouvelles stratégies préventives et/ou curatives de la MA. Ce projet a ainsi pour but de modéliser chez le rat, différents niveaux de réserve cognitive, définie comme la capacité à préserver de bonnes performances cognitives, malgré la présence de lésions cérébrales (plaques amyloïdes, dégénérescences neurofibrillaires) caractéristiques de la MA. Pour cela, deux modèles de résilience cognitive, génétique et environnemental, seront exposés à une situation pathologique mimant la MA humaine puis étudiés. La MA humaine sera induite par l'administration intra-cérébrale, au moyen de vecteurs viraux, de deux gènes humains mutés (APP et PS1), qui sont connus pour être impliqués dans les formes familiales de la MA.

Le premier modèle de résilience est basé sur une composante génétique en comparant le rat de souche LOU/c/Jall (noté LOU) à la souche de rat Wistar (noté WIS). Le rat WIS, correspond à l'une des souches de rats les plus communément utilisées dans la littérature et permettra de modéliser une situation représentative de patients présentant une résilience cognitive faible, potentiellement très sensible aux effets délétères de la MA. En revanche, le rat LOU, déjà décrit comme présentant un vieillissement réussi, nous permettra de modéliser une situation représentative des patients présentant une résilience cognitive élevée, potentiellement moins sensible aux effets délétères de la MA.

Le second modèle de résilience est basé sur une composante environnementale en exposant des rats WIS à un hébergement en environnement enrichi (EE). Cet EE consiste en l'hébergement des animaux dans des grandes cages contenant des objets de couleurs, de formes et de textures variées (tuyaux, pots, hamacs, jouets, abris, échelles, plate-forme) et une roue d'activité motrice. L'EE est déjà connu pour exercer des effets bénéfiques sur la mémoire et sera utilisé pour mimer une situation représentative de patients présentant une résilience cognitive élevée, par rapport à d'autres rats WIS qui seront exposés à un environnement standard (ES) des animaux de laboratoire. Cet ES consiste en l'hébergement des animaux dans une cage standard d'animalerie, contenant un abri (tube en carton) et du papier kraft.

Notre hypothèse de travail est que le rat LOU et le rat WIS exposé à un EE résisteront mieux, sur un plan cognitif, à la MA que des rats WIS exposés à un ES. Dans un second temps, nous examinerons les mécanismes cérébraux à l'origine d'une telle résilience cognitive et proposerons une remédiation par de nouveaux traitements pharmacologiques chez les animaux présentant une atteinte cognitive induite par la MA.

Au total, 680 rats seront nécessaires (508 rats de souche Wistar et 172 rats de souche LOU/c/Jall) pour ce projet d'une durée de 5 ans.

Le projet comporte 4 procédures :

- La première vise à exposer l'ensemble des animaux de notre étude à la MA humaine.

- La deuxième vise à étudier, après exposition à la MA, la résilience cognitive chez le rat LOU et WIS au cours de deux analyses distinctes, comportementale et électrophysiologique puis de tester l'efficacité d'agents pharmacologiques pour réduire les déficits de mémoire observés.
- La troisième vise à étudier, après exposition à la MA, la résilience cognitive chez le rat WIS exposé ou non à un EE au cours de deux analyses distinctes, comportementale et électrophysiologique, puis de tester l'efficacité d'agents pharmacologiques pour réduire les déficits de mémoire observés.
- La quatrième est la description de la méthode de perfusion-fixation intracardiaque réalisée sous pré-analgésie et anesthésie profonde au cours d'une classe sans réveil. Cette méthode est indispensable pour conserver de façon optimale le cerveau de l'animal, en vue d'analyses post-mortem.

Ce projet répond au mieux aux conditions d'éthique et de satisfaction de la règle des « 3R ».

Remplacer : aucun modèle alternatif ne pourrait satisfaire l'objectif scientifique de ce projet. Notre projet vise à étudier les mécanismes cérébraux sous-tendant la résilience cognitive et à tester de nouveaux candidats médicaments dans le cadre de la MA. Ces études nécessitent donc être réalisées sur des organismes vivants dotés de fonctions cognitives proches de celles humaines.

Réduire : Des groupes de n=12 rats seront constitués pour chacune des études. Ces effectifs permettent l'application de tests statistiques avec une puissance adaptée aux analyses envisagées.

Raffiner : Les principes éthiques et les standards de raffinement seront utilisés de la naissance à la mort de l'animal. Les animaux seront maintenus dans des conditions d'hébergement stables, contrôlées et avec un enrichissement minimal (pour l'hébergement en ES) et maximal (pour l'hébergement en EE) du milieu de manière à assurer un bien-être optimal. Ce bien-être sera contrôlé pendant toute la durée des expérimentations par une surveillance bi-quotidienne les jours ouvrés de la semaine (inspection de chaque animal et prise de poids chaque jour) et quotidienne durant les week-ends et jours fériés par du personnel qualifié et formé. Tout animal en état de souffrance et/ou de mal-être sera immédiatement exclu du protocole et mis à mort selon la réglementation en vigueur. Les animaux seront manipulés quotidiennement avant le début des expérimentations. Les administrations d'agents viraux et pharmacologiques seront réalisées avec soin par un personnel qualifié. Toutes les précautions seront prises pour que la souffrance et l'angoisse occasionnée par les procédures soient minimales.

19616 La réalisation d'études de toxicologie est une obligation réglementaire lors du développement d'un médicament humain afin d'en évaluer la sécurité avant les essais cliniques. L'objectif de ce projet est d'évaluer la toxicité du composé AZP-3601 lors d'administration répétée pendant 39 semaines chez le primate non humain. AZP-3601 est un candidat médicament pour le traitement de l'hypoparathyroïdie chez l'homme, maladie qui entraîne des troubles neuromusculaires, osseux, cardiaques, psychologiques et dermatologiques. Cette étude consiste en administration quotidienne d'AZP-3601 pendant 39 semaines avec une observation quotidienne des animaux, pesée corporelle, évaluation des effets sur les paramètres sanguins et urinaires, sur la densité osseuse, évaluation cardiovasculaire et analyse histopathologique. Le choix du primate non humain est basé sur la réglementation en vigueur qui demande la réalisation d'études précliniques sur 2 espèces dont une espèce non- rongeur et sur le fait que le chien et le miniporc ne sont pas des espèces pertinentes pour l'évaluation de ce composé.

Le nombre d'animaux utilisé est défini par la réglementation et a été adapté au design de l'étude. Pour ce projet, 40 animaux seront utilisés.

Pour leur bien-être, les animaux sont hébergés en groupes sociaux à l'exception de certaines phases limitées dans le temps et en nombre. Les animaux sont hébergés dans des volières avec à disposition des perchoirs, barrières visuelles, balançoires et divers jouets. Des mélanges de fruits secs, graines, cacahuètes ou autres friandises sont distribués tous les jours dans de la litière permettant aux animaux de fourrager. Un programme d'habituation des animaux est mis en place à l'arrivée afin d'acclimater les animaux à leur nouvel environnement, aux conditions d'hébergement et aux procédures. Les animaux sont suivis quotidiennement sous la supervision d'un vétérinaire. Des points limites précoces sont appliqués de telle sorte qu'en cas de signes cliniques ayant des

répercussions significatives sur l'animal, des mesures sont rapidement prises pour limiter la souffrance (mise en place d'un traitement analgésique, diminution de la dose testée, suspension de la procédure ou euthanasie).

19617 Dans les modèles animaux de maladies inflammatoires des voies aériennes, la voie d'administration intranasale et le lavage bronchoalvéolaire (LBA) sont les techniques les plus couramment utilisées. La voie d'administration intranasale permet d'administrer une quantité définie d'allergènes, d'agents pro-inflammatoires, pro-fibrosants et/ou les médicaments ou candidats-médicaments en dose précise. Quant au LBA, il permet de recueillir et d'étudier l'influx de cellules inflammatoires dans les voies respiratoires, tels que les éosinophiles dans l'asthme allergique par exemple. Pour la réalisation des modèles, la maîtrise des injections par les voies d'administration orale, sous-cutanée, intrapéritonéale et intraveineuse (veine caudale) est indispensable.

La maîtrise des voies d'injections et des deux techniques spécifique (administration intranasale et LBA) par les expérimentateurs est indispensable pour garantir une bonne reproductibilité et permettre de limiter le nombre d'animaux à engager dans les protocoles.

Notre objectif est de former les utilisateurs à ces techniques pour garantir la qualité des études menées sur les modèles animaux de maladie inflammatoire chez la souris.

Adéquation avec la règle des 3R

Remplacer

Pour réaliser ce projet, nous utiliserons la souris, car cette espèce animale est la plus employée pour l'étude des pathologies respiratoires et des cibles thérapeutiques dans les maladies inflammatoires des voies aériennes. A ce jour, aucun modèle alternatif n'est suffisamment intégré et complexe pour permettre d'étudier une pathologie respiratoire.

Raffiner

La procédure expérimentale est conçue pour garantir le bien-être de l'animal et réduire au maximum l'inconfort, le stress et la souffrance. La souris étant un animal social, les souris seront maintenues par groupes, dans des cages enrichies de tubes en carton. Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi journalier de la boisson, de la nourriture et de l'état des animaux.

La douleur liée aux injections est une douleur ponctuelle réversible qui fera l'objet d'une surveillance de l'animal pour visualiser tout signe d'inconfort imprévu qui nécessiterait la mise à mort de l'animal.

Réduire

La formation des utilisateurs est donnée par un ingénieur pédagogue et passionné, rompu à ces manipulations, ayant une maîtrise parfaite de ces procédures expérimentales et une connaissance approfondie des animaux et des modèles de maladies pulmonaires.

Ces techniques manuelles nécessitent cependant de bien maîtriser et reproduire les gestes pour garantir une bonne efficacité et reproductibilité.

Nous avons montré de par notre expérience antérieure que l'apprentissage et la maîtrise de ces procédures nécessite 24 souris par apprenti-expérimentateur, dont 18 souris pour l'analyse de la reproductibilité et de la répétabilité de l'apprenti et pour confirmer la standardisation des gestes techniques. Afin de réduire la production d'animaux, nous prévoyons d'utiliser préférentiellement des animaux de réformes en provenance de notre élevage ou de notre fournisseur

Nous envisageons de former 1 à 3 utilisateurs par an, correspondant à un maximum de 360 souris sur une période de 5 ans.

19618 Thématique :

Notre projet s'intéresse au développement du cortex cérébral chez la souris. Au cours du développement embryonnaire, les cellules du cortex cérébral sont produites et arrangées dans le tissu cortical de façon extrêmement stéréotypée. Cette architecture est cruciale pour la mise en place du réseau neuronal. Cette organisation se fait grâce à l'intervention de protéines secrétées

qu'on appelle morphogènes. Ces morphogènes se distribue sous forme de gradient dans les tissus et peu de choses sont connues sur leur établissement dans le cortex. Par ailleurs des arrêts de gestation ou de nombreuses maladies du développement neuronales découlent de mutations ou du mauvais fonctionnement de ces morphogènes. On peut citer par exemple des retards mentaux sévères, de l'autisme ou bien même des troubles épileptiques. Il est donc essentiel de mieux comprendre la survenue de ces défauts du développement cérébrale. Ce projet se concentre sur ces questions et est une combinaison d'analyse in vitro et in vivo.

Objectifs scientifiques :

Le but de notre projet est d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans la variété de réponses aux facteurs sécrétés (morphogènes) au cours de la formation du cortex cérébrale. En particulier, nous nous intéressons aux réponses au morphogène Sonic Hedgehog (Shh) qui est impliqué dans le contrôle de la prolifération des progéniteurs corticaux mais également dans la migration des neurones au cours du développement. Le passage d'un type de réponse à un autre n'est pas connu et des troubles neurodéveloppementaux associés aux retards mentaux, à l'épilepsie, à la trisomie ou à des troubles encore plus sévères tel que l'holoprosencéphalie peuvent être associés à des défauts de réponse à Shh. Afin d'identifier les différentes actions et sources de Shh dans le cortex cérébral en développement, nous utiliserons le modèle murin pour utiliser à la fois des croisements de lignées transgéniques et l'électroporation in utéro.

Modalités techniques :

Les lignées transgéniques nous permettront de cibler de façon conditionnelle uniquement des sous populations de cellules afin d'invalider l'expression de Shh à certaines sources précises (source interneuronale ou source épithéliale). L'électroporation in utéro nous permettra, dans une région corticale précise, de surexprimer ou d'invalider l'expression d'un gène à un moment précis du développement et grâce à l'utilisation de protéines fluorescentes de pouvoir suivre sa localisation subcellulaire au sein des neurones en migration. Afin de mieux comprendre les mécanismes d'action de Shh au cours de la corticogenèse et de ses incidences à l'âge adulte, les animaux seront récupérés à différents stades pré- et post-nataux et des analyses in vivo ou en ex vivo par imagerie microscopique seront réalisées. Afin de mener à bien notre projet et notamment les aspects in vivo, nous suivrons la règle des 3R, détaillée ci-dessous :

3R :

a) Remplacer :

Certains aspects du projet, tel que l'analyse de la directionnalité de la migration des neurones sera faite in vitro. Cependant la structure du cortex étant particulière dans sa topographie et dans les interactions cellulaires qu'elle présente (différents types de cellules sont en contact soit directe soit indirecte, tels que les progéniteurs neuraux, les cellules à amplifications rapides et finalement les neurones). Les modèles in vitro ne peuvent pas reproduire un tel environnement et c'est pourquoi nous devons analyser les conséquences de l'invalidation de notre gène d'intérêt à l'aide d'un modèle de souris transgénique. De façon systématique, l'utilisation du modèle in vitro sera privilégié dès que cela sera possible.

b) Réduire :

Une étude statistique est réalisée pour déterminer le nombre d'animaux nécessaire pour chaque lot expérimental. De plus, notre projet porte sur les stades embryonnaires en majorité, ce qui nous permet de limiter l'utilisation de souris adulte (uniquement pour la reproduction ou pour une seule expérience de caractérisation de la morphologie du cerveau adulte).

c) Raffiner :

Les animaux sont hébergés en groupe sociaux de 3 à 5 individus maximum et ils disposent dans chaque cage d'un enrichissement de nidification. Les males présentant des signes d'agressivité seront séparés.

Les procédures expérimentales se dérouleront sous anesthésie générale sauf si l'anesthésie est jugée plus traumatisante pour l'animal que la procédure expérimentale elle-même. Dans le cadre

de la procédure de chirurgie, la douleur sera prise en compte par différents médicaments analgésiques.

Des points limites sont établis afin d'arrêter l'expérimentation pour limiter la souffrance animale.

Nous utiliserons pour le projet 4280 souris.

19619 L'obésité est souvent associée à d'autres pathologies telles que le diabète de type II (non-insulino-dépendant) et l'apparition d'une perturbation de la quantité et la qualité de lipides dans le plasma. Cette dernière modification appelée dyslipidémie peut avoir des effets délétères importants qui peuvent conduire à des accidents vasculaires qui peuvent eux même être létaux.

Ainsi au cours de cette pathologie qu'est l'obésité, il apparaît évident que le contrôle des métabolismes glucidique (glycémie = taux de sucre sanguin) et lipidique (dyslipidémie) est un point essentiel dans la prise en charge de la maladie.

Parmi les traitements proposés par le corps médical, certaines molécules ont la capacité d'avoir un effet bénéfique sur ces deux métabolismes. Ainsi, le Liraglutide, commercialisé sous le nom Victoza a la capacité de faire diminuer la glycémie qui est généralement trop élevée chez le diabétique, mais aussi permet une amélioration du bilan lipidique (réduction de la dyslipidémie).

A l'origine, le Liraglutide est une molécule uniquement utilisée dans le traitement du diabète de type II, c'est-à-dire qu'elle ciblait le métabolisme glucidique exclusivement. Son mode d'action est connu : elle mime des molécules naturellement produites par l'intestin nommées incrétines qui favorisent la production d'insuline ; une hormone produite par le pancréas capable de favoriser l'entrée du sucre dans les cellules et ainsi réduire sa présence dans le sang.

Avec l'utilisation de ce traitement chez les diabétiques, il est apparu que non seulement ce médicament permettait de réduire la glycémie, mais qu'en plus cette molécule permettait d'améliorer le bilan lipidique, notamment en réduisant le nombre de particules transportant les lipides dans le sang les lipoprotéines. En effet, les lipides = corps gras n'étant pas soluble dans le sang, elles nécessitent des particules de transports que sont ces lipoprotéines.

Cette diminution de la quantité des lipoprotéines peut avoir une double origine. La première pourrait s'expliquer par une diminution de leur production (anabolisme). Cette piste est étudiée par ailleurs par différentes équipes. Un article de 2018 de notre équipe fait référence à cette piste. La seconde explication pourrait trouver son origine dans une augmentation du captage et l'utilisation de ces lipoprotéines par différents tissus, conduisant à sa disparition du sang (catabolisme). Cette piste est en cours d'étude chez l'Homme par notre équipe. Les mesures cinétiques (apparition et disparition des lipoprotéines) montrent effectivement que le Liraglutide est capable de diminuer la dyslipidémie en diminuant la production et en réduisant le catabolisme.

Néanmoins, il est difficile chez l'Homme d'identifier les tissus capables de cataboliser ces lipoprotéines et par quels mécanismes. En effet il est nécessaire pour cela de prélever les tissus et d'en mesurer les paramètres relatifs au captage des lipoprotéines. C'est pour cela qu'une étude sur animal est nécessaire.

Parmi les tissus susceptibles de cataboliser ces lipoprotéines circulantes, le tissu adipeux (ou tissu gras) a la capacité de capter ces graisses afin de les stocker. Il est reconnu que lors de pathologies comme l'obésité l'excès de graisses circulantes peut perturber ce processus, bien que le mécanisme reste peu connu.

L'expansion des cellules graisseuses et de la quantité de tissu lui-même provoque des fortes altérations métaboliques. Parmi elles, il a été démontré qu'une inflammation existe et que celle-ci peut causer des altérations de métabolismes et lipidiques.

La question posée par ce travail est donc : est-ce que l'amélioration de la dyslipidémie causée par le Liraglutide chez les individus obèses peut avoir pour origine une amélioration de l'état inflammatoire du tissu adipeux ? De plus est-ce que l'amélioration de l'inflammation chronique observée lors de l'obésité entre en jeu dans le mécanisme du Liraglutide ?

D'un point de vu méthodologique, nous utiliserons le modèle souris et nous choisirons la souche C57Bl6J. Une fois soumise à un régime enrichi en graisses, ces souris développent une obésité,

associée à un diabète de type II et une dyslipidémie. Elles constituent donc un bon modèle d'étude. Une partie de ces animaux sera ensuite traitée par le Liraglutide, alors que le groupe témoin recevra une solution saline neutre vis-à-vis de la pathologie. La littérature montre que cette molécule donne le même type de résultat que chez l'Homme avec une amélioration du diabète ainsi qu'amélioration de la dyslipidémie. Une fois que le Liraglutide aura montré ses effets, sous 10 jours, les souris seront mises à mort afin de prélever le tissu adipeux et de mesurer des paramètres relatifs à l'inflammation de ce tissu mais aussi du mécanisme de captage des lipoprotéines.

Nous mettrons bien évidemment en application la règle des 3R. Si l'utilisation d'animaux semble inévitable afin d'étudier l'effet de la molécule injectée sur l'organisme entier (voir section 3. 4. 1.), nous envisageons à terme d'étudier les effets directs du Liraglutide sur le tissu. Ainsi nous pourrions remplacer le modèle animal par un modèle cellulaire. Nous appliquerons aussi la réduction en limitant le nombre d'animaux utilisés. En effet, la littérature montre d'une part quelles doses utiliser et combien de temps traiter, évitant ainsi l'utilisation d'animaux pour la mise au point. D'autre part, nous optimiserons les animaux en réalisant les mesures biochimiques, moléculaires et cellulaires sur les mêmes animaux. Enfin nous mettrons en place le raffinement en habituant les animaux à un seul manipulateur, qui viendra à heure fixe faire l'injection du Liraglutide. Au-delà du régime, la seule procédure pouvant réellement avoir un impact sur les animaux étant cette injection, nous vérifierons chaque jour l'état de santé des animaux, leur comportement et mettrons comme point limite l'infection qui pourrait potentiellement apparaître au point d'injection.

Par ce biais, nous espérons montrer s'il existe ou non une relation entre inflammation et capacité catabolique du tissu adipeux lorsque celui-ci est soumis au Liraglutide.

19620 Une fonte musculaire importante intervient au cours de nombreuses conditions physiologiques (vieillesse, sédentarité,...) ou pathologiques (cancers, dystrophies musculaires, traumatismes, infections, maladies chroniques). En effet, le muscle squelettique représente environ 40% de la masse protéique corporelle et constitue le principal réservoir d'acides aminés mobilisables au cours de ces conditions cataboliques et lors d'apports nutritionnels insuffisants. Les acides aminés libérés sont utilisés à des fins énergétiques, pour la mise en place de la réponse inflammatoire, de la réponse immunitaire ainsi que pour la synthèse des protéines des organes vitaux (cœur, cerveau, poumon). A court terme, l'atrophie musculaire est donc une adaptation métabolique clef qui présente de nombreux avantages. Toutefois, si la situation perdure, l'atrophie musculaire conduit à une diminution de la force et de la fonction musculaire, et contribue à une diminution de la capacité de l'organisme à se défendre contre les agressions. Par ailleurs, la diminution de la force musculaire accroît la sédentarité et entraîne donc une aggravation de la fonte musculaire. Ceci aboutit à l'augmentation des périodes d'hospitalisation et des périodes de récupération ainsi qu'à une mortalité accrue. Prévenir ou réduire les pertes de protéines myofibrillaires au cours d'états cataboliques est donc devenu un enjeu majeur pour limiter l'atrophie musculaire

L'atrophie musculaire est engendrée par un déséquilibre entre synthèse et dégradation (protéolyse) des protéines, mais c'est principalement le système protéolytique ubiquitine protéasome-dépendant (UPS) qui est à l'origine de la perte de muscle squelettique. Différents travaux ont montré qu'une enzyme spécifique du muscle, MuRF1 (Muscle RING Finger-1) est à l'origine de la dégradation des protéines musculaires au cours d'un état catabolique. De façon intéressante, l'inactivation (KO) du gène MuRF1 protège partiellement de l'atrophie les muscles squelettiques chez l'animal soumis à différentes conditions cataboliques. Ainsi, lors de situations cataboliques, il est maintenant envisageable d'inhiber de façon pharmacologique la fonte musculaire en ciblant MuRF1. Cependant, les protéines préservées dans le muscle grâce à l'inhibition de MuRF1 ne pourront plus fournir d'acides aminés aux organes qui en bénéficient normalement au cours d'une agression (foie, intestin, etc). L'inhibition de MuRF1 pourrait donc s'avérer délétère à plus ou moins long terme, et une supplémentation en acides aminés pourrait être nécessaire pour maintenir les fonctions vitales. Cet aspect est actuellement inconnu.

Le projet soumis a pour objectif principal de pallier au manque d'approvisionnement en acides aminés en combinant 2 approches : (1) induire une situation catabolique chez des souris dont l'E3 ligase muscle-spécifique MuRF1 est inactive et (2) apporter des aa exogènes pour maintenir

l'homéostasie protéique au niveau corps entier. Dans notre projet, nous utiliserons des souris invalidées pour MuRF1 qui mimeront l'utilisation de drogues. L'état catabolique sera déclenché par la diffusion de dexaméthasone (Dex) à partir d'un implant. La Dex est un glucocorticoïde de synthèse, inducteur de l'atrophie musculaire. L'objectif principal de ce travail sera de déterminer si l'approvisionnement en acides aminés exogènes peut suppléer le rôle du muscle squelettique et couvrir le besoin des autres organes en conditions cataboliques, alors que l'activité de MuRF1 est inhibée afin de préserver la masse musculaire.

Un total de 80 souris mâles a été utilisé dans cette expérimentation, 40 souris c57black6 standard (contrôles, CT) et 40 souris c57black6 invalidées pour le gène MuRF1 (MuRF^{-/-}) et a mis en évidence des données importantes sur le foie et surtout des variations différentielles de réponse à la Dex suivant la souche d'animaux. Pour répondre à la question principale, des données plus fines (mesure de la synthèse des protéines) deviennent nécessaires sur 360 animaux. Les animaux seront placés en adaptation à un hébergement en cage individuelle pendant 3 semaines et seront répartis en lots de 15 animaux (8 lots au total) et l'expérimentation répétée 3 fois en modulant l'état nutritionnel (post-absorbif, post-prandial, restriction calorique) car la synthèse est très sensible à ce paramètre. Après la période d'adaptation les animaux seront traités ou non à la dexaméthasone (Dex, eau de boisson) pendant 14 jours. La dexaméthasone est un glucocorticoïde de synthèse qui entraîne une perte de muscle squelettique. Les souris traitées à la Dex augmentent leur appétit et il faudra donc effectuer un pair-feeding par rapport aux animaux contrôles. Les animaux seront soit nourris avec un régime standard, soit avec un régime supplémenté en acides aminés (aa+). Les groupes suivants seront donc utilisés :

- 45 souris CT
- 45 souris CT aa+
- 45 souris CT Dex
- 45 souris CT Dex aa+
- 45 souris MuRF1^{-/-}
- 45 souris MuRF1^{-/-} aa+
- 45 souris MuRF1^{-/-} Dex
- 45 souris MuRF1^{-/-} Dex_aa+

Les souris seront suivies au niveau de leur poids, de leur prise alimentaire, et de leur comportement. Il s'agit de méthodes non invasives. Un certain nombre de critères physiologiques et comportementaux sont définis afin de s'assurer de l'absence de souffrance des animaux pendant le protocole. Le projet sera réalisé selon la règle des 3Rs en accord avec la réglementation européenne 2010/63/UE. En effet, différentes expérimentations sur cellules en culture ont permis de cerner les conditions à utiliser pour les animaux (Dex et acides aminés), ce qui permet d'éviter plusieurs pré-expérimentations. De plus, une autre étude effectuée récemment sur souris dans notre laboratoire a permis d'identifier la dose exacte de Dex ainsi qu'une condition d'administration douce (eau de boisson). De plus, le nombre d'animaux est limité au strict minimum pour détecter des variations significatives (voir paragraphe 3. 3. 5).

19621 La myasthénie grave est une maladie auto-immune rare. Elle est liée à la production d'auto-anticorps dirigés essentiellement contre le récepteur à l'acétylcholine (RACH), situé à la jonction neuromusculaire. Ces auto-anticorps altèrent la transmission de l'influx nerveux entre le nerf et le muscle conduisant à des faiblesses musculaires plus ou moins invalidantes. Il n'existe actuellement aucun traitement curatif pour la myasthénie. Les traitements actuels proposés aux patients sont essentiellement symptomatiques ou non-spécifiques, et doivent être pris à vie.

Si le muscle est l'organe cible dans la myasthénie, l'organe effecteur est le thymus. Il est caractérisé par des infiltrations de lymphocytes B et la présence de centres germinatifs ectopiques (thymus hyperplasique). Il présente aussi tous les acteurs nécessaires à une réaction immunitaire contre le RACH. En effet, les différentes sous-unités du RACH sont directement exprimées dans le thymus.

De plus, des cellules T auto-réactives pour le RACH sont détectées dans le thymus et les lymphocytes B des centres germinatifs produisent des anticorps contre le RACH.

La myasthénie peut être induite chez la souris en les immunisant avec du RACH (extrait des organes électriques de poisson torpille) en présence d'adjuvant complet de Freund (CFA). Les animaux produisent alors des auto-anticorps contre le RACH induisant une perte du RACH sur le muscle au niveau des plaques motrices et un dysfonctionnement de la transmission neuromusculaire. Ce modèle permet d'étudier l'action des auto-anticorps au niveau du muscle. C'est le modèle de référence utilisé dans l'ensemble des laboratoires travaillant sur les modèles expérimentaux de la myasthénie. Cependant, ce modèle est lourd à mettre en place et seulement 60-70% des souris développent des symptômes. De plus, les animaux ne développent jamais d'hyperplasie thymique.

Ce projet de recherche a trois objectifs : 1) mettre au point un modèle animal de la myasthénie avec hyperplasie thymique, étant donné le rôle central du thymus dans le développement de la myasthénie humaine, 2) obtenir 100% de souris avec des symptômes après immunisation, 3) démontrer que ce nouveau modèle est pertinent pour étudier les effets de traitements pour la myasthénie.

Nous nous basons sur des résultats montrant que l'utilisation du CFA en tant qu'adjuvant pourrait être remplacé par des molécules telles que du LPS (lypopolysaccharide) et/ou du Poly(I:C). Ces deux molécules présentent aussi l'avantage de stimuler le recrutement de lymphocytes B dans le thymus et pourraient favoriser la mise en place d'une hyperplasie thymique.

Ce projet implique l'utilisation de souris; environ 328 souris C57bl/6. Ce chiffre ainsi que toute la démarche scientifique a été établi afin de respecter la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner) et obtenir des résultats statistiquement significatifs avec le moins de souris possible. Aujourd'hui seul le modèle par injection de RACH purifié en présence de CFA est utilisé pour les expérimentations in vivo avec les désavantages qu'il comporte (voir plus haut). Développer un nouveau modèle plus performant nécessite de tester notre solution d'immunisation (PIC/LPS et RACH purifié) sur la souris en plusieurs étapes, afin de prouver sa véracité et ensuite de l'optimiser (quantité de RACH et nombre d'injection notamment). Les différents protocoles seront réalisés les uns après les autres afin de les adapter en fonction des résultats et observations précédentes et ainsi minimiser autant que possible le nombre de souris. Le raffinement des expériences est assuré par la mise en place de points limites pour éviter l'inconfort et la douleur des souris. De plus, toutes les dispositions visant à prévenir le stress (ex : utilisation du Sizzlenests, cycle jour/nuit de 12h) et la douleur (ex : analgésie pour réduire la douleur) seront mises en œuvre. Les souris seront surveillées quotidiennement par les animaliers pour repérer d'éventuels signes de mal-être ou de blessures. Toutes les semaines ou tous les 10 jours les souris seront pesées et regardées attentivement par la personne menant le projet.

19622 L'infection osseuse est fréquente chez le diabétique et présente dans 30 à 80 % des cas selon la gravité de la maladie. Environ 36% des patients qui présentent une ostéite subissent une amputation et 68% des patients ayant subi une première amputation subiront une seconde amputation dans les 5 ans. Cette infection est par ailleurs associée à une mortalité importante. Parmi les espèces bactériennes responsables de ces ostéites figurent les espèces du genre *Staphylococcus* sp (51%), dont les Staphylocoques à coagulase négative.

La durée optimale du traitement antibiotique des ostéites du pied diabétique reste difficile à préciser en raison du nombre limité d'études cliniques (notamment sur les ostéites à *Staphylococcus* à coagulase négative) ainsi que du peu de modèles expérimentaux disponibles dans la littérature.

L'objectif de l'étude est d'évaluer l'efficacité relative de deux antibiotiques (la rifampicine et la ceftaroline) et de différentes durées de traitement dans un modèle d'ostéite à *Staphylococcus epidermidis* chez le rat développé par le laboratoire. Une étude préliminaire sur la pharmacocinétique de la ceftaroline sera nécessaire avant la phase d'efficacité ainsi qu'une phase pilote sur la calibration du modèle.

Dans le cadre de cette étude, une attention particulière sera portée au respect de la règle des 3R. Les études précédentes nous ont permis de réduire au maximum le nombre d'animaux pour ce

projet en utilisant 6 rats par groupe afin d'obtenir des analyses statistiques fiables (réduction). Des analyses in vitro ont déjà été réalisées sur l'efficacité de la rifampicine et de la ceftaroline sur certaines souches de staphylocoques. Toutefois l'efficacité de tels antibiotiques ne peut être confirmée que dans des modèles pré-cliniques, c'est pourquoi aucune stratégie de remplacement ne peut être envisagée. Le modèle est complètement maîtrisé par l'ensemble du personnel et ses expériences passées nous ont permis de réduire au maximum la douleur chez l'animal avec une prise en charge de celle-ci avant et après l'acte chirurgical (anesthésiques administrés avant l'opération et morphiniques administrés avant et après l'opération), et d'un suivi biquotidien de l'animal tout au long de l'expérience. Des critères d'arrêts de l'étude, supportés par une grille de score clinique, ont été définis afin d'assurer le bien-être des animaux. De plus un enrichissement du milieu (jouets en plastique, igloos en carton) sera utilisé (Raffinement).

Pour ce projet, 115 rats mâles Wistar seront nécessaires.

19623 Les modèles murins sont essentiels pour comprendre les pathologies cancéreuses chez l'homme et tester de nouveaux candidats médicaments. Néanmoins, ces modèles doivent d'être suffisamment robustes et précis pour que les résultats issus de ces études puissent être transposés aux études cliniques chez l'Homme. En greffant des cellules tumorales par injection intra-osseuse dans le fémur d'une souris, nous pourrions reproduire le développement des tumeurs dites liquides, telles que les leucémies, les lymphomes ou les myélomes, dans leur micro-environnement tumoral et obtenir un modèle davantage spécifique du développement de ces maladies. Ce mode d'injection permettra aussi de réaliser des modèles de tumeurs osseuses tel que les ostéosarcomes ou bien de reproduire la formation de métastases osseuses observées dans les cancers du sein ou de la prostate.

Pour ce projet, des souris recevront une injection des cellules tumorales intra-osseuse. Celle-ci sera réalisée en condition chirurgicale par un accès creusé dans le fémur depuis l'articulation femoro-tibiale. Après implantation, le développement de la maladie sera monitoré et l'administration de composés de recherche destiné au traitement de cette pathologie pourra être réalisée par voie entérale (gavage, incorporation dans l'alimentation) ou parentérale (veineuse, intrapéritonéale, sous-cutanée ou intra-musculaire). Les volumes à administrer seront préétablis par le vétérinaire d'établissement et le comité de bien-être. A titre d'exemple, pour une souris de 20 g, la limite d'administration sera de 400 µL per os; 200 µL par voie sous-cutanée; 200 µL par voie intrapéritonéale; 50 µL par voie intramusculaire et 200 µL par voie intraveineuse.

Les souris seront monitorées tous les jours pour vérifier l'absence de souffrance. Celle-ci sera objectivée par une échelle de score adaptée aux études en oncologie prenant en compte l'aspect du pelage, le score corporel, l'activité, les mouvements et la paleur des muqueuses. Le poids de l'animal sera monitorés deux à trois fois par semaine. La fréquence pourra être adaptée au stade de l'étude. Une perte de plus de 25% de leur poids initial sera considérée comme une raison de mise à mort. Le vétérinaire aura pleine autorité pour envisager un traitement anti-douleur ou une euthanasie de la souris pour raison éthique si elle/il le juge nécessaire.

Des prélèvements de sang seront réalisés dans le sinus rétro-orbital, dans la veine saphène ou dans la veine caudale. Des tests de laboratoire seront réalisés sur ces prélèvements (eg : cytométrie en flux ou ELISA) et permettront d'objectiver la réussite de l'humanisation et les effets des molécules à visées thérapeutiques. Les prélèvements au sinus rétro-orbital seront réalisés sous anesthésie générale. La fréquence maximale de prélèvement sera dépendante du poids, selon un schéma préétabli par le vétérinaire et le comité de bien être. A titre d'exemple, le volume prélevé sera de 100 µL par semaine, maximum, pour une souris de 20 g. Des techniques d'imagerie in vivo permettront un suivi visuel du développement des tumeurs lorsque cela sera possible.

Réduction :

Un total de 600 animaux est demandé pour la réalisation de ce projet sur une durée de 5 ans, permettant de réaliser 60 études de 4 groupes (contrôle négatif, contrôlé positif, plusieurs doses ou traitements à comparer) avec 5 à 10 animaux par groupe. Le nombre d'animaux utilisés dans

chaque étude sera réduite au maximum en se basant sur des tests statistiques adaptés aux effets attendus de la série.

Raffinement :

Les souris seront hébergées en cages ventilées, par groupe social stable de 2 à 4 individus. La nourriture et l'eau de boisson seront fournies ad libitum. La cage contiendra une couche de litière permettant aux souris de creuser, de se cacher et de réaliser un nid, élément essentiel à leur bien-être. Un morceau de bois permettant aux souris d'exprimer leur comportement de rongeur ainsi qu'un nid en carton seront également disposés. À leur entrée dans le projet, les souris bénéficieront d'une période d'acclimatation et seront habituées à la présence de l'expérimentateur qui les manipulera régulièrement. Les pièces d'hébergement disposeront d'un cycle lumière-obscurité (7h – 19h), d'une température (20 - 24°C) et d'une hygrométrie (45 - 65%) contrôlés en permanence.

Remplacement :

Les tests in vitro seront envisagés si ceux-ci sont appropriés. Néanmoins, lorsqu'il n'est pas possible de recréer in vitro les interactions complexes qui peuvent exister entre un organe fonctionnel comme le tissu osseux et une pathologie l'impliquant tout en objectivant les effets thérapeutiques et toxicologiques de composés à visée thérapeutique testés dans le cadre d'étude précliniques. La souris constitue donc une approche scientifiquement valide, robuste et indispensable au développement et à la mise à disposition de thérapies innovantes pour les patients.

19624 Objectif : Ce projet a pour objectif de maintenir et d'assurer la reproduction d'une colonie de chiens porteurs d'une mutation génétique spontanée sur le chromosome X. Cette mutation est responsable d'un trouble grave et persistant de l'état général chez les homozygotes : une dystrophie musculaire, comparable à la Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) chez l'Homme.

Le maintien de la colonie est assuré par une reproduction suivie et contrôlée de femelles porteuses avec des mâles sains. Afin de produire un nombre suffisant d'animaux myopathes pour les utilisateurs (les besoins exprimés en 2021 sont d'une vingtaine de chien par an), le cheptel reproducteur est composé d'une trentaine de femelles reproductrices porteuses et d'environ 5 mâles reproducteurs sains.

Dans les jours suivants la naissance, un prélèvement sanguin permet d'identifier précocement le statut des mâles (malades, ou non). Pour les animaux malades et les femelles, un second prélèvement sanguin ou salivaire permet de confirmer formellement le statut malade et d'identifier les porteuses. Il est réalisé avant le sevrage des animaux.

La totalité des chiens myopathes est transférée dans les instituts de recherche le plus rapidement possible, suivant les exigences des protocoles, soit majoritairement autour de 8 semaines, juste après le sevrage. Certains animaux sains ou porteurs sont également ponctuellement mobilisés par ces instituts pour servir de témoins.

Pour produire jusqu'à 100 chiens myopathes sur 5 ans, le cheptel de reproducteur est renouvelés régulièrement en fonction de la prolificité de ces animaux. Ainsi environ 60 reproductrices et 10 à 15 reproducteurs seront inclus dans le cheptel reproducteur sur 5 ans.

Bénéfice attendu : Ces chiens sont cliniquement le modèle animal le plus proche de la Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) chez l'Homme et sont utilisés dans le cadre de la recherche et le développement de différentes approches thérapeutiques contre cette maladie.

Domages attendus : Les chiens malades (myopathes) présentent des atteintes cliniques d'intensité variable pouvant être très précoces.

Mise en pratique des 3R :

- Remplacer : L'utilisation de chiens sur ce projet est justifiée car la mutation génétique dont ils sont porteurs est représentative de la maladie chez l'homme et qu'il n'existe pas de méthode alternative pour ce type de test. Le chien est également un modèle plus grand que les souris par exemple. Il permet entre autres de valider les voies d'administration, de diffusion et l'efficacité des traitements.

- Raffiner : Dès la naissance, les animaux atteints sont suivis avec une attention particulière : pesée quotidienne, surveillance de l'allaitement, adoption des chiots sains par une autre mère pour faciliter l'accès à la mamelle des chiots malades restants avec la mère... Les interventions effectuées dans ce projet sont réalisées par des personnes compétentes et les techniques utilisées visent à limiter au maximum la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux. En fonction de l'importance des symptômes cliniques développés par les chiots malades, ils pourront être transférés avant le sevrage aux instituts de recherche, mieux équipés pour les prendre en charge.

- Réduire : Le maintien de cette colonie est assuré par une reproduction très contrôlée afin de répondre strictement au besoin des utilisateurs dans leur projet de recherche sans animaux supplémentaires. Toutes les femelles porteuses sont conservées pour le renouvellement du cheptel reproducteur. Les animaux sains et les anciens reproducteurs sont disponibles pour d'autres procédures expérimentales.

19625 La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA), est une maladie neurodégénérative qui se caractérise par une dégénérescence progressive des neurones du cortex moteur, des motoneurons du tronc cérébral et de la moelle épinière. On distingue des formes sporadiques (90% des cas) et des formes familiales (10% des cas). Quelle que soit la forme de la maladie, les signes cliniques sont identiques. Cependant, en fonction de la région initiale d'atteinte, on distingue deux variétés de SLA :

- une forme spinale qui affecte tout d'abord les motoneurons de la moelle épinière et qui est caractérisée par une atteinte de la motricité des membres supérieurs et inférieurs
- une forme bulbaire, affectant les motoneurons du tronc cérébral et provoquant des troubles de la parole et de la déglutition.

Afin d'étudier la progression de la maladie, des modèles murins transgéniques ont été générés pour mettre en évidence les mécanismes physiopathologiques responsables de la dégénérescence moto-neuronale observée dans la SLA.

Ces souris transgéniques présentent un phénotype et des signes pathologiques qui reprennent la pathologie humaine avec une dégénérescence progressive des motoneurons entraînant un déficit moteur puis la mort des animaux.

Selon les lignées transgéniques, les souris présentent entre 3 et 8 mois : des tremblements des membres inférieurs, des signes de faiblesse musculaire, des déficits moteurs évoluant vers une paralysie complète et les souris meurent entre quatre à huit mois (selon les lignées transgéniques)

Dans ce projet, les modèles de souris UBQLN2 et Prp-TDP43 <A315T> seront utilisées.

Elles fournissent des outils précieux pour identifier les mécanismes sous-jacents à la pathogenèse SLA et pour étudier les stratégies thérapeutiques à mettre en place pour arrêter la maladie.

Ces lignées manifestent non seulement des déficits de mémoire et une maladie des motoneurons, mais présentent également les caractéristiques pathologiques de la maladie trouvée chez l'homme.

Elles développent des difficultés de mouvements progressifs, une augmentation de l'étreinte des membres antérieurs et postérieurs pouvant aller jusqu'à la paralysie des membres postérieurs.

Pour notre nécessité expérimentale, nous avons besoin d'observer/étudier ces évolutions moteurs ; c'est pourquoi les animaux seront observés quotidiennement et toutes les dispositions seront prises pour limiter un maximum l'inconfort ou la douleur des animaux en établissant des points limites appropriés.

Notre établissement sera chargé de la production des souris impliquées dans ce projet, du traitement chronique des animaux, des études comportementales et des prélèvements.

Le projet comprendra jusqu'à deux études par an. Une étude standard comportera jusqu'à 440 animaux :

- 40 mâles reproducteurs
- 80 Femelles reproductrices

Pour obtenir 320 souris : 160 mâles (80 mâles Wild-Type et 80 mâles transgéniques) et 160 femelles (80 femelles Wild-Type et 80 femelles transgéniques)

Bien-être animal, application des 3 R et observations cliniques :

- A ce jour, il n'existe pas d'autre modèle animal de la SLA. Le recours à l'animal de laboratoire est nécessaire pour comprendre les mécanismes sous-jacents à la pathogenèse SLA et étudier l'efficacité de nouvelles molécules qui pourrait réduire non seulement les dommages causés aux motoneurones par un signal excitateur spécifique transmis au cerveau, mais également la pathologie TDP-43 observée dans presque tous les cas de SLA.
- Le nombre total d'animaux utilisés pour une étude est fonction du nombre de groupes et du nombre d'animaux par groupe nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Il correspond à ce qui est classiquement utilisé en expérimentation animale.
- Les souris seront hébergées collectivement, par groupe de 4 animaux du même sexe. Les cages comporteront une litière de sciure, des refuges et des matériaux de nidification adéquats, ainsi que des blocs à ronger.
- Eu égard à la gravité de l'évolution de certains symptômes (déficits moteurs), une classification prospective dans la classe de gravité sévère est considérée comme appropriée, étant donné que la procédure devrait entraîner une forte dégradation du bien-être et de l'état général des animaux transgéniques.
- Par conséquent, les souris seront pesées et leur état général évalué quotidiennement selon notre grille de surveillance pour détecter des signes éventuels de douleurs. Les données issues de ce suivi individuel seront enregistrées dans un tableau définissant les points limites expérimentaux, et aussitôt analysées. De ce fait, si un animal atteint à un moment donné de l'expérience, un de ces points limites définis, il sera immédiatement mis à mort.

19626 Le cancer colorectal est la deuxième cause de décès par cancer en France (Institut national du cancer). Au sein de la tumeur, une sous-population cellulaire joue un rôle clé dans l'initiation tumorale, le développement de métastases et la résistance aux traitements : les cellules souches cancéreuses. Ces cellules souches cancéreuses représentent donc une cible thérapeutique prometteuse. Toutefois, ces cellules constituent moins de 5% de la masse tumorale ce qui complique leur isolement. Une technique de tri cellulaire innovante permet de séparer au sein d'une population cellulaire plusieurs sous-populations en fonction de leurs propriétés biophysiques comme la taille, la densité et leur degré de différenciation. Cette méthode de tri permet la remise en culture des cellules triées pour des études *in vitro* ou la greffe sur des animaux pour des études *in vivo*. Grâce à cette technique, il est possible d'étudier les cellules souches cancéreuses, si importantes dans le processus tumoral, et d'analyser leurs réponses aux thérapies couramment utilisés pour traiter le cancer colorectal. Toutefois, pour valider la capacité de cette technique à trier spécifiquement les cellules souches cancéreuses, la méthode de référence est la greffe de ces cellules dans un modèle animal pour vérifier leur capacité à former des tumeurs, étape indispensable pour les définir comme des cellules souches cancéreuses. Le modèle murin est le modèle de choix pour l'étude du processus tumoral car il permet un développement tumoral rapide ainsi qu'un suivi aisé de la croissance tumorale en cas de greffe sous-cutanée, et sera donc le modèle utilisé pour ce projet.

L'objectif de cette expérience *in vivo* est de valider la capacité de cette technique de tri cellulaire à isoler des cellules souches cancéreuses. Les résultats obtenus *in vitro* ont montré qu'après tri cellulaire par cette technique plusieurs sous-populations cellulaires sont obtenues dont une présentant des caractéristiques de cellules souches cancéreuses. Toutefois, ces résultats prometteurs *in vitro* ont besoin d'être validés par l'analyse de la capacité de ces cellules à former des tumeurs *in vivo* et c'est le but de cette expérimentation animale où les sous-populations cellulaires triées par cette technique seront greffées chez des souris en sous-cutanée.

In fine, le but de ce projet de recherche est de développer un test de médecine personnalisée à partir de cellules de patients atteints de cancer colorectal pour prédire leur réponse aux traitements. Ce test de médecine personnalisée repose sur un modèle permettant de modéliser la tumeur contenant des cellules souches cancéreuses en 3D et son comportement vis-à-vis des thérapies anti-cancéreuses. Ce projet offre donc l'opportunité d'étudier les résistances aux traitements

associées aux cellules souches cancéreuses et représentent une méthode alternative à l'utilisation du modèle animal. Ce modèle d'étude semble également prometteur pour le développement de nouvelles thérapies ciblant préférentiellement les cellules souches cancéreuses.

Ce projet a été conçu pour respecter la règle des 3R :

- Remplacer : la greffe de cellules tumorales dans un modèle murin est le test fonctionnel de référence qui permet de valider la présence de cellules souches cancéreuses. Le recours à l'expérimentation animale est donc nécessaire pour répondre à notre objectif car aucune méthode substitutive ne le permet à l'heure actuelle. De plus, cette expérience in vivo intervient après des résultats in vitro complets et prometteurs.

- Réduire : le nombre d'animaux utilisé dans ce projet est de 35 souris dont 5 souris contrôle ; ce nombre a été établi en se basant sur des données de la littérature. Chaque groupe sera composé de 5 souris ce qui réduit au maximum le nombre d'animal utilisé tout en permettant une interprétation statistique des résultats.

- Raffiner : des conditions d'hébergement strictes sont prévus pour ce projet afin de garantir la protection des souris sur le plan sanitaire (souris immunodéficientes). Les souris seront suivies quotidiennement et la prise tumorale sera mesurée 3 fois par semaine. Grâce au monitoring avec le score de grimace (MGS) et une grille d'évaluation par animal, des signes de douleur et de souffrance pourront être décelés rapidement. En cas de souffrance de l'animal, un analgésique pourra être administré si le volume tumoral seuil n'est pas atteint. Si des signes de souffrance apparaissent de façon concomitante avec l'atteinte du seuil, la souris sera euthanasiée sans attendre.

En conclusion, cette étude implique 35 souris athymic nude dont 5 souris contrôle.

19627 Nous avons récemment identifié un nouveau déficit immunitaire chez l'homme causé par des mutations dans un gène codant pour une enzyme impliquée dans la synthèse d'un nucléotide ; élément essentiel et limitant de la composition de l'ADN. Les patients déficients présentent des susceptibilités aux infections virales qui peuvent devenir très graves et entraîner la mort. Des études in vitro ont permis de démontrer que les cellules immunitaires déficientes présentent un défaut de prolifération. Nous faisons l'hypothèse que ce gène puisse ainsi être modulé et ciblé par des médicaments pour réguler une prolifération cellulaire incontrôlée comme par exemple dans des maladies auto-immunes ou des cancers.

Le projet consistera à développer des modèles murins déficients en cette enzyme, à caractériser leur réponse immunitaire, à induire des pathologies mettant en jeu une prolifération cellulaire incontrôlée et enfin à tester des molécules thérapeutiques dans ces modèles. Seul le modèle de souris et des expériences in vivo nous permettront d'apporter la preuve de concept de notre hypothèse.

Nous étudierons le rôle de l'absence de cette enzyme lors d'une infection virale dans un modèle bien décrit dans la littérature. Nous testerons le rôle de cette enzyme dans des modèles pathologiques comme le rejet de greffe, et l'induction de maladies auto-immunes. Nous créerons deux lignées à phénotype dommageable, néanmoins, il est escompté un avantage sélectif chez les animaux déficients avec une diminution de la sévérité de la maladie voire une absence de celle-ci dans les modèles testés. De nouvelles molécules thérapeutiques ciblant cette enzyme seront injectées afin d'évaluer leur potentiel thérapeutique.

Notre projet a donc été défini en conformité avec les exigences de remplacement (études in vitro citées précédemment), de réduction et de raffinement (Règles des 3R). L'analyse de paramètres multiples par souris et l'utilisation de tests statistiques adaptés permettront de réduire le nombre de souris à son minimum. Des mesures de raffinement seront mises en place, elles concernent les conditions d'hébergement, les soins qui seront apportés lors des procédures et l'utilisation de points limites définis permettant de mettre fin à toute souffrance. Le nombre d'animaux utilisé dans ce projet est de 606 sur 5 ans. Ce projet devrait nous permettre d'une part d'établir la preuve de concept et de valider in vivo de nouveaux traitements immunosuppresseurs pour contrer l'activité incontrôlée des cellules du système immunitaire.

19628 Les processus physiologiques qui sous-tendent les interactions des différentes cellules du cerveau restent mal connus. L'objectif de ce projet est de mieux comprendre l'implication fonctionnelle des oligodendrocytes dans les processus mnésiques. Les oligodendrocytes sont des cellules de soutien du tissu nerveux que l'on ne trouve que dans le cerveau des vertébrés. Ces cellules dites non neuronales sont à l'origine de la gaine de myéline qui protège et isole les fibres nerveuses afin de garantir le passage de l'influx nerveux produit par les neurones. Des données récentes suggèrent que l'activité mnésique est capable d'induire la synthèse de nouveaux oligodendrocytes. Ce processus d'oligodendrogenèse chez l'animal adulte serait nécessaire à la formation des souvenirs. Nous souhaitons approfondir le rôle de cette oligodendrogenèse chez la souris et le rat adulte et déterminer si l'altération du fonctionnement des oligodendrocytes dans le cadre de la neuromyérite optique (NMO, aussi connue sous le nom de syndrome de Devic), une maladie rare auto-immune, est à l'origine des déficits de mémoire observés chez les patients atteints par cette maladie. Nous utiliserons deux modèles animaux, l'un pharmacologique (utilisant la cuprizone dans le régime alimentaire pour détruire les oligodendrocytes) et l'autre consistant à injecter intracérébralement des anticorps présents chez les patients NMO et responsables de la dégradation des oligodendrocytes. Les effets de ces traitements sur les performances cognitives des animaux traités seront évalués à l'aide d'une batterie de tests comportementaux et leur cerveau sera analysé afin de mesurer l'impact sur l'oligodendrogenèse ainsi que l'angiogenèse (création de nouveaux vaisseaux cérébraux à proximité des oligodendrocytes). La possibilité de palier les déficits cognitifs observés dans le modèle NMO à l'aide de traitements visant à stimuler les processus oligodendrogénique et angiogénique seront également examinés. Ces expériences permettront de faire progresser notre compréhension de la manière dont les cellules non neuronales du cerveau se réorganisent lors des processus de mémorisation et de mieux comprendre l'origine des déficits mnésiques observés dans un contexte pathologique, à savoir les maladies démyélinisantes comme la NMO.

L'interaction étroite entre les processus mnésiques et les processus d'oligodendrogenèse et d'angiogenèse est spécifique aux vertébrés et ne peut être reproduite dans un modèle *in vitro*. Pour ce projet d'une durée de 4 ans, nous utiliserons un total de 1454 souris et 1074 rats (600 animaux par an approximativement). Nous avons mis en place des stratégies pour respecter la règle des 3R afin de minimiser le nombre et l'inconfort des animaux et suivre la directive européenne 2010/63/EU sur l'utilisation des animaux pour les expériences.

REMPACEMENT: Comprendre comment les oligodendrocytes et les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins cérébraux interagissent avec les neurones et comment la fonction des oligodendrocytes affecte la mémorisation sont des processus cellulaires et morphologiques complexes. Il n'existe à ce jour aucun système *in vitro* capable de reproduire l'organisation cellulaire entre les oligodendrocytes et les neurones. Il ne nous est pas possible de remplacer les études sur l'animal entier par des méthodes *in vitro*.

RÉDUCTION: Notre perfectionnement expérimental nous permettra d'aborder les questions posées avec les meilleures expériences possibles et d'utiliser le même animal pour différentes analyses expérimentales (un même animal sera soumis à une batterie de tests mnésiques et son cerveau sera ensuite utilisé pour les analyses histologiques). Pour chacune des expériences, le nombre d'animaux sera optimisé et réduit à son minimum tout en incorporant un nombre de contrôles internes suffisant afin de permettre des tests statistiques robustes.

RAFFINEMENT: L'utilisation de deux modèles animaux complémentaires modélisant la perte des oligodendrocytes nous permettra de cibler plus efficacement la contribution fonctionnelle des oligodendrocytes dans les processus mnésiques. L'utilisation d'une batterie de tests cognitifs permettra d'établir un profilage mnésique détaillé en collectant un maximum d'observations chez le même animal. L'utilisation de protocoles adaptés et de procédures chirurgicales validées (anesthésiques appropriés, conditions chirurgicales aseptiques, soins postopératoires avec analgésiques) ainsi que le suivi des animaux tout au long des expériences permettront d'optimiser le bien-être des animaux et de minimiser la variabilité des résultats obtenus.

19629 La résistance aux thérapies représente un enjeu majeur dans l'amélioration des thérapies conventionnelles et l'efficacité des nouvelles immunothérapies. Notre programme de travail repose sur l'observation fondamentale que les cellules myéloïdes sont impliquées dans le développement tumoral et la résistance aux thérapies anti cancéreuses. Ce programme de recherche implique des études in vivo reposant sur l'utilisation de différents modèles de souris transgéniques exprimant à la fois des rapporteurs de fluorescences diverses par les populations myeloïdes et ayant ou non des deletions genetiques totales ou conditionnelles pour certains recepteurs aux chimiokines. 2 types de cancer seront étudiés, cancer du poumon (NSCLC) et cancer mammaire. Certains de ces modèles ont déjà été autorisés sur une procédure en cours mais sur des animaux de génotypes différents et avec des traitements différents. Le modèle de cancer du poumon repose sur l'injection d'une lignée syngénique (TC1 bioluminescente) en intraveineuse qui induit des tumeurs multifocales dans le poumon exclusivement. Les modèles tumoraux de cancer du sein utilisés seront de deux types: Utilisation de lignées tumorales PYMT injectées en orthotopique (PYMTortho) dans le tissu gras mammaire et le modèle transgénique de tumeur mammaire spontanée PYMT (PYMTspont). Dans ces différents modèles les animaux seront traités A) Soit par radiothérapie locale avec ou sans immunothérapie avec anticorps monoclonaux. B) Soit par Chimiothérapie avec ou sans immunothérapie. Les traitements sont appliqués 10 jours après inoculation de la lignée dans le modèle NSCLC et PYMT ortho et dans la semaine qui suit l'apparition d'une tumeur palpable pour le modèle PYMTspont et au plus tard à 6 mois d'âge. les dates de traitements sont choisi sur la base de l'établissement d'une tumeur de taille suffisante pour travailler et "mature" d'un point de vue immunologique.

Ce programme de recherche est développé dans le respect de la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner).

Remplacer: Le sujet reposant essentiellement sur des réponses aux traitements anti-tumoraux par le système immunitaire, l'utilisation d'animaux est nécessaire. La notion de remplacement est la plus limitante dans le cadre de ce projet, cependant nous avons mis au point des expériences de cocultures in vitro des cellules tumorales avec des lignées de macrophages permettant d'analyser les interactions avec les cellules tumorales. De plus, nous complétons nos études sur des échantillons humains.

Réduire : Dans le cadre de ce projet les animaux utilisés seront issue de stocks expérimentaux pour 1- suivre l'évolution tumorale par mesure de croissance, 2- Analyse des infiltrats immunitaires par cytométrie en flux a différent temps après le traitement (procédure terminale sur animal euthanasié) 3- Analyse des comportement de cellules myeloïdes par imagerie intravivale (procédure terminale sous anesthésie sans réveil). Le nombre d'animaux est calculé pour satisfaire aux exigences de reproductibilité et de validité statistique et adapté à la variabilité généralement observé pour chaque procédure. Les élevages sont contrôlés au maximum pour ne pas générer de stocks expérimentaux excessifs. Il est tiré profit de chaque animal pour nous apporter le maximum d'information. Si possible, nous utilisons les données de manière transversale entre les protocoles afin de réduire le nombre d'animaux. Les groupes d'études sont fait le plus souvent en même temps afin de réduire le nombre de groupe contrôles.

Raffiner : En plus des conditions d'hébergement et de suivi des animaux encadrés par le personnel compétant, les conditions de raffinement particulières a chaque modèle seront utilisées. En particulier des approches d'anesthésie complète seront mise en place dans la plupart des procédures. Enfin, un suivi journalier de l'état de santé des animaux sera réalisé par du personnel compétent (pesée, signe cliniques). Le milieu des cages sera enrichi avec des nidifications biodégradables en papier kraft et des maisons en carton afin stimuler les activités cognitives et exploratrices des animaux tout en satisfaisant leurs instincts naturels.

Points limites: Dans les trois procédures les endpoints sont fixés le plus en amont de l'apparition de signes cliniques dommageables c'est à dire en absence de traitement 20 jours dans le modèle NSCLC et PYMTortho et 6 mois pour le modèle spontané. En présence de traitements qui réduisent voir élimine la tumeur, les endpoints sont fixés à partir du moment ou la tumeur dépasse le volume avant traitement, considéré comme un échec thérapeutique. Le suivi régulier des animaux permet de prévenir au maximum une souffrance animale en euthanasiant les animaux dont la

croissance tumorale dépasserait les valeurs attendus. Dans le modèle cancer du poumon, l'évolution tumorale est connue avec un endpoint fixé à J22 après inoculation en absence de traitement. L'évolution tumorale est suivie par Bioluminescence. L'évolution tumorale dans le modèle orthotopique est suivi 2 à 3 fois par semaine par palpation et mesure au pied à coulisse sur un maximum de 20 jours en absence de traitement. Le modèle spontané suit une évolution lente (âge d'apparition à la palpation 25-30 semaines), les souris sont suivies une fois par semaine à partir de 22 semaines d'âge jusqu'au plus tard 6 mois pour commencer les traitements.

Ce projet impliquant la caractérisation complexe des interactions entre cellules myéloïdes et lymphocytes Treg dans le cadre de différents contextes tumoraux avec des approches thérapeutiques et d'analyse multiples (7 procédures), de nombreuses lignées de souris différentes sont utilisées faisant un total de 2090 animaux sur 5 ans

19630 Dans le cadre d'un accident nucléaire, dans le domaine médical ou encore au cours d'activité de recherche, le risque nucléaire et radiologique du strontium-90 et du cobalt-60 sont bien identifiés. En cas de contamination interne par ces radionucléides, des toxicités chimiques et radiologiques potentielles peuvent être rencontrées au niveau des organes de rétention majeurs (le foie pour le cobalt et le squelette pour le strontium) entraînant des troubles et pathologies possibles. Les traitements d'urgence actuellement préconisés montrent une efficacité modeste et un manque de spécificité en particulier pour le strontium (gluconate de calcium). Ce projet vise ainsi à combler ce vide thérapeutique en évaluant l'efficacité *in vivo* d'un nouveau traitement pharmacologique chez le rat.

La stratégie thérapeutique choisie repose sur l'utilisation d'une molécule de la famille des biphosphonates disposant déjà d'une autorisation de mise sur le marché donc non toxiques aux doses usuelles. Afin d'augmenter nos chances de succès, une étape de mise en forme médicamenteuse (encapsulation de la molécule dans une vésicule sphérique appelée liposome) sera réalisée en amont du projet afin de mieux cibler les organes d'intérêt (le foie et le squelette).

Pour étudier l'efficacité pharmacologique du nouveau traitement, il est nécessaire d'utiliser le modèle animal qui permet d'évaluer la biocinétique des radionucléides (excrétion mesurée dans les urines/fèces et rétention dans les principaux organes de distribution tels que le foie et le squelette) à l'échelle d'un organisme dans son ensemble. Le modèle sélectionné est le rat contaminé par injection intraveineuse avec le radionucléide (strontium ou cobalt) puis traité par injection intraveineuse avec la molécule (libre ou reformulée) sur une courte période de 48h. Pour déterminer la dose optimale du traitement correspondant à un effet décorporant supérieur à 70%, une gamme de 5 doses sera testée et les courbes effet-dose seront modélisées par un logiciel de pharmacologie. Pour y parvenir, une étude statistique menée à l'aide d'un spécialiste a permis de définir qu'un nombre minimal de 300 rats mâles seront nécessaires pour disposer de résultats statistiques robustes. Afin de s'assurer de la correcte administration intra-veineuse des produits, il est fait le choix de travailler sur des rats sur lequel un cathéter veineux aura été implanté.

A toutes les étapes du projet, les principes de remplacement, de réduction et de raffinement relatifs à l'expérimentation animale ont été respectés. En effet, le choix de la molécule a été réalisé via des expériences *in vitro*. L'utilisation d'animaux cathétérisés engendrera moins de stress pour l'animal. Une évaluation quotidienne du bien-être de l'animal sera réalisée. Enfin, l'ensemble des gestes liés à l'anesthésie, au prélèvement et à l'euthanasie s'effectueront selon la réglementation en vigueur par des personnes compétentes et formées.

19631 Les myopathies nécrosantes à médiation immunitaire (MNAI) sont une forme grave de myopathie auto-immune associée à la présence d'auto-anticorps pathogènes. Cliniquement, les MNAI sont caractérisées par une faiblesse musculaire symétrique et proximale. D'autres symptômes comme la dysphagie, la dyspnée, la maladie pulmonaire interstitielle et le syndrome de Raynaud peuvent être observés. Leur traitement reste largement empirique et sous-optimal, à base de corticostéroïdes avec ou sans immunosuppresseurs et d'immunoglobulines intraveineuses ou sous-cutanées (Ig). Le mécanisme d'action des Ig sur les MNAI est inconnu. La MNAI est associée à des auto-anticorps (aAbs) dirigés contre les protéines SRP ou HMGCR. Notre laboratoire a démontré

que les anti-SRP sont des anticorps pathogènes et sont essentiels au développement de la maladie. Nos résultats antérieurs *in vitro* sur des cultures de cellules musculaires suggèrent que les Ig ont un effet pro-myogénique sur la régénération musculaire, tandis que les anti-SRP pourraient avoir l'effet inverse.

Ils nous permettent de mettre en place la procédure expérimentale en respectant le concept des 3R. Le nombre d'animaux nécessaires est de 110. Il est réduit au minimum en tenant compte de la variabilité des mesures de la force musculaire. De plus, les effectifs des groupes ont été déterminés statistiquement par le test des rangs signés de Wilcoxon. Une échelle de gravité des symptômes observés a été établie et permet de déterminer un point limite dans l'ensemble des expériences. Elle permettra d'évaluer la douleur des animaux et de mettre en place une procédure visant à la limiter. Enfin, l'ensemble des expériences sera réalisé dans une animalerie agréée, où les conditions d'hébergement sont contrôlées : température, hygrométrie, cycle jour/nuit, change et nourriture. Les animaux seront élevés en communauté dans des cages enrichies avec un abri de cellulose (cello dome) et des fibres de coton (Nestlets). L'ensemble des procédures sera réalisé sous anesthésie gazeuse. Les animaux seront euthanasiés par surdose de CO₂ sous anesthésie générale à l'isoflurane.

L'objectif de cette étude est d'étudier les mécanismes d'action des Ig et d'évaluer leurs effets thérapeutiques dans la MNAI. Nous confirmerons tout d'abord l'effet observé des Ig sur la régénération musculaire. Ensuite, nous évaluerons l'effet thérapeutique des Ig sur un modèle de MNAI développé dans notre laboratoire. Enfin, nous améliorerons notre compréhension du mécanisme d'action de cette thérapie dans le traitement de la MNAI dans un modèle invalidé pour le récepteur des Ig.

Cette étude devrait nous amener à améliorer le traitement de la MNAI par une meilleure compréhension de l'effet thérapeutique des Ig et l'utilisation de cette thérapie.

19632 Les cellules possèdent de nombreux systèmes de contrôle et de réparation des lésions de l'ADN permettant de maintenir l'intégrité du génome. La modification de cette intégrité est une caractéristique des cellules cancéreuses. La recombinaison homologue est un système majeur de réparation de l'ADN. De nombreuses études menées sur des organismes unicellulaires et des cellules en culture ont permis de caractériser ce mécanisme. Cependant l'importance et le rôle exact qu'il joue dans des organismes plus complexes reste à préciser. En particulier le rôle qu'il peut jouer dans la formation, la survie ou le traitement des tumeurs pourra permettre de mieux caractériser et traiter ces dernières. Les acteurs principaux de la recombinaison homologue sont souvent essentiels à la survie et au développement des mammifères, ce qui complique leur étude *in vivo*. Pour cette raison, nous avons choisi une approche qui consiste à exprimer transitoirement une forme non fonctionnelle d'un acteur essentiel et spécifique de la recombinaison homologue : RAD51 (SMRad51). La forme déficiente de cet acteur « empoisonne » transitoirement le mécanisme de réparation. Cette étude menée chez la souris permet d'étudier pour la première fois *in vivo* chez les mammifères un mécanisme essentiel à la survie et la stabilité des cellules prolifératives. Notre approche permet de moduler le temps et le niveau d'expression de la protéine et par conséquent de minimiser les effets chez l'animal. En absence d'expression de la protéine mutante les animaux ne présentent pas de phénotype dommageable. La protéine non fonctionnelle sera induite transitoirement dans toutes les cellules de l'animal grâce à l'injection ou l'ingestion de doxycycline. Les études menées *in vitro* ont montré que la recombinaison homologue est importante pour la progression correcte de la phase répllicative des cellules souches prolifératives. Pour cette raison, nous étudierons en particulier l'effet de l'expression de la protéine mutante (1) sur des tissus sains et cellules en prolifération (peau, intestin, sang), (2) sur la formation et la progression des cellules tumorales (tumeurs de la peau et tumeurs mammaires), (3) sur la réponse à des agents génotoxiques.

Les jeunes souris en croissance possèdent un plus grand nombre de cellules en prolifération. Pour cette raison nous étudierons aussi l'effet de notre mutant chez de jeunes souris de 12 jours et chez les souris adultes.

Pour ce projet, nous proposons d'utiliser 664 animaux sur 5 ans. Les animaux étudiés dans ce cadre proviennent d'établissements reconnus et sont élevés dans des conditions propices au bien-être animal. Le nombre d'animaux prévu pour ce projet a été réduit au maximum tout en conservant un effectif suffisant pour obtenir des résultats statistiquement fiables. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux, dont l'état de santé sera surveillé quotidiennement tout au long de l'expérience. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de stress ou de souffrance. Les points limites appropriés seront utilisés pour limiter les souffrances des animaux au cours de l'expérimentation. Ce projet est prévu sur une durée maximale de 5 ans ; au cours de cette période les expériences seront menées successivement et tout protocole induisant un stress ou une souffrance inattendue lors des premières expérimentations sera évidemment arrêté.

Ce projet apportera une meilleure compréhension des rôles moléculaires et cellulaires des mécanismes de réparation par recombinaison homologue in vivo grâce à l'étude d'un de ces facteurs principaux, RAD51. Mieux comprendre les mécanismes qui contrôlent la recombinaison homologue et les conséquences de leur inactivation in vivo doit aider à mieux comprendre leur rôle dans la tumorigénèse et par conséquent dans le développement de nouveaux traitements anticancéreux.

19633 La maladie de Menkès est une maladie rare dont l'incidence est estimée à 1 patient pour 250 000 naissances. Cette maladie est provoquée par une mutation d'un gène localisé sur le chromosome X. L'absence du transporteur intestinal et cérébral du cuivre (ATP7A) entraîne, chez l'enfant, une carence généralisée en cuivre, générant une hypotrophie sévère, des cheveux caractéristiques fins et tortillés et une encéphalopathie convulsivante sévère qui est la cause du pronostic grave de cette maladie. En effet, le cuivre est un métal impliqué dans un grand nombre de réactions biochimiques intervenant dans la respiration cellulaire, le métabolisme du fer, le métabolisme des pigments, des neurotransmetteurs, la synthèse de certaines protéines, de certains tissus conjonctifs et les réactions anti-oxydantes. Ainsi, une carence en cuivre s'exprime par un déficit de ces différentes activités biologiques.

Dans ce contexte, il existe plusieurs modèles murins de la maladie de Menkès, dont un qui présente une mutation sur le gène ATP7A, entraînant ainsi une carence en cuivre chez les mâles, et responsable de l'apparition d'un phénotype spécifique comprenant un pelage clair avec des poils anormaux, des tremblements et une apathie importante. Ces mâles peuvent également souffrir de graves troubles aortiques et squelettiques, souvent responsables de leur mortalité. En effet, la mortalité périnatale des mâles atteints est importante avec une durée de vie pouvant varier de 3 à 5 semaines.

Le seul traitement actuel pour les patients atteints réside dans l'administration d'histidinate de cuivre permettant une normalisation des concentrations en transporteur plasmatique du cuivre mais sans amélioration de l'état clinique neurologique des patients. Cette absence d'amélioration clinique s'explique par l'impossibilité pour le cuivre seul de passer la barrière hémato-méningée qui entoure le cerveau. C'est pourquoi, notre projet vise à tester chez la souris mâle porteuse de la maladie (ATP7AMoblo) une nouvelle thérapeutique basée sur l'administration sous-cutanée d'un transporteur synthétique du cuivre (TSC) capable de franchir la barrière hémato-encéphalique. Des résultats préliminaires ont montré notamment un assombrissement du pelage qui est un indicateur du métabolisme correct du cuivre, ainsi qu'une amélioration de l'activité physique globale et une augmentation de l'espérance de vie jusqu'à au moins 8 semaines, période d'arrêt déterminée initialement au cours du projet précédent. Ces premières études ont permis de déterminer une dose et un rythme d'administration optimaux. Nous souhaitons maintenant démontrer grâce à des techniques d'imagerie médicale que ce transporteur synthétique du cuivre est capable de franchir la barrière hémato-encéphalique pour délivrer le cuivre chez la souris porteuse de la maladie.

Remplacement : Il n'existe pas d'alternative d'approche in vitro car le projet porte sur l'évaluation de l'efficacité de transport du cuivre dans le cerveau via la barrière hémato-encéphalique chez l'animal porteur de la maladie.

Réduction : L'étude portera sur 36 souris mâles de laboratoire, réparties en 6 groupes de 6 mâles dont 3 groupes de 6 souris saines (sauvages) et 3 groupes de 6 souris mutantes (hémizygotés). Cette cohorte de 36 souris mâles sera étudiée et mise à mort une fois les analyses terminées afin de disséquer et analyser tous les organes d'intérêt. Il s'agit du nombre d'animaux nécessaires pour mener à bien cette étude afin d'obtenir une puissance statistique suffisante.

Raffinement : Toutes les procédures expérimentales (3 procédures seront appliquées : la gestion de la lignée mutante qui présente un phénotype dommageable pour l'animal, l'injection du TSC en sous-cutanée et répétée 5 fois par semaine, et 1 procédure d'imagerie médicale in vivo sous anesthésie, et mise à mort) auront lieu dans l'animalerie, dans un environnement sécurisant pour l'animal. Une procédure d'estimation et suppression de la douleur est mise en place : différents éléments visuels chez l'animal sont évalués afin d'établir un score qui permet d'anticiper et d'éviter d'atteindre les points limites déterminés au préalable, et qui tient compte des signes éventuels de mal-être (isolement, yeux fermés, dos voûté, poils hérissés, immobilité, perte de poids, yeux et abdomen creux). En fin de protocole, les animaux seront mis à mort et des organes prélevés pour permettre des analyses biochimiques, enzymologiques et anatomopathologiques.

19634 Le but de ce projet est la mise en place d'un élevage de souris achondroplasies dans le but de pouvoir réaliser des expérimentations sur ces souris permettant de développer notamment de nouvelles thérapies car il n'existe actuellement pas de traitement pour l'achondroplasie.

Nous utiliserons dans ce projet des souris qui présentent la même pathologie que celle exprimée chez l'Homme. Il s'agit d'une souche à phénotype dommageable (troubles de la locomotion, paralysie unilatérale, paralysie bilatérale avec atteinte de la vessie, troubles respiratoires). Ce projet nécessite l'utilisation de ces animaux pour maintenir la colonie, valider le modèle et enfin réaliser des études expérimentales d'efficacité. L'insertion d'un gène humain ayant la mutation la plus courante des patients atteints d'achondroplasie permettra d'étudier au mieux le potentiel thérapeutique des molécules testées et d'étudier les mécanismes moléculaires.

Ce projet aura des bénéfices pour l'Homme puisque les résultats précliniques obtenus permettront de transposer l'utilisation de ce traitement de façon plus adéquate chez l'enfant, l'adolescent ou le jeune adulte. À l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement pour l'achondroplasie. Ce projet permettra de mieux comprendre les mécanismes de cette pathologie et de développer des molécules à potentiel thérapeutique pour le traitement d'enfants atteints d'achondroplasie.

Il s'agit ici de développer l'élevage de ces souris dans le but de caractériser leur phénotype (P1) puis de réaliser des tests avec des molécules à potentiels thérapeutiques élevés sur les animaux (P2).

Afin de satisfaire aux exigences de la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement), nous avons mis en place différentes stratégies pour ce projet :

-Dans un objectif de Raffinement, nous réalisons une évaluation précise de l'état des animaux grâce à des grilles de suivis adaptées et l'établissement de points limites précoces afin de réduire au maximum la potentielle souffrance des animaux.

-Dans un objectif de Réduction, l'expérimentation se déroule avec un maintien d'une petite cohorte d'animaux en permanence et l'augmentation du nombre d'animaux seulement en cas de besoin de générer des géniteurs pour des procédures expérimentales. Les études expérimentales seront réalisées avec un nombre restreint par lot tout en restant statistiquement exploitable.

-Dans le cadre de ce projet le Remplacement n'est pas possible à ce jour. Cependant les études in vivo sont toujours précédées d'études in vitro permettant de réduire le nombre d'animaux utilisés puisque seules les molécules présentant un potentiel thérapeutique élevé in vitro seront testées chez l'animal.

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

Dès leur arrivée, les animaux seront hébergés dans des cages collectives avec un environnement enrichi (jouets, maisons/tunnels en cartons, briques de bois à grignoter, Fibres de peuplier compressées, contact visuel et olfactif entre les animaux, musique, commutation progressive de la lumière et interactions fréquentes avec les humains...). Boisson et nourriture seront disponibles ad libitum.

Des points limites préalablement définis et adaptés permettront d'assurer un suivi de l'état général des animaux et de préserver leur bien-être. En cas d'altération de l'état de l'animal, la surveillance sera rapprochée et les animaux seront soignés en fonction de la sévérité de la douleur observée.

Nous estimons que nous allons utiliser au maximum 12 785 souris sur une période de 5 ans.

19635 L'arthrose est la pathologie rhumatologique la plus fréquente chez l'humain. D'après l'organisation mondiale de la santé, elle touche environ 10 à 15% des personnes de plus de 60 ans, selon l'OMS. D'ici 2050, on estime que 130 millions de personnes dans le monde souffriront d'arthrose, et 40 millions d'entre elles seront fortement handicapées par la maladie. Cette pathologie se caractérise par la dégradation du cartilage (os et cartilage) se traduisant cliniquement par des douleurs et une gêne fonctionnelle de l'articulation touchée. En plus de séquelles physiques, elle entraîne de lourdes séquelles psychologiques, une baisse de la qualité de vie et une mortalité accrue lors de comorbidités cardio-vasculaires.

Notre groupe travaille sur la mise au point d'approches de thérapies cellulaires pour réparer ou régénérer le cartilage détruit suite aux pathologies ostéo-articulaires. L'utilisation de cellules stromales mésenchymateuses dérivées du tissu adipeux, couplées à des bio-polymères, s'est avérée très prometteuse pour traiter cette pathologie. Les cellules stromales mésenchymateuses possèdent des propriétés anti-inflammatoires et protectrices du cartilage qui les rendent particulièrement intéressantes pour mettre en place un traitement de ces maladies.

L'objectif de ce projet collaboratif est de développer une technique d'imagerie bicolore à l'aide de rayons X afin d'effectuer le suivi in-vivo de ces cellules stromales mésenchymateuses marquées à l'or, associées ou non à un hydrogel marqué à l'iode, après implantation intra-articulaire dans un modèle murin d'arthrose inflammatoire induite à la collagénase. Cette technique présente l'avantage de permettre une imagerie d'un élément donné donc d'être très spécifique en comparaison des autres approches : il sera ainsi possible de réaliser des cartographies in-vivo des éléments tels que l'or ou l'iode donc de suivre de manière spécifique et simultanée le devenir des cellules thérapeutiques d'une part et de l'hydrogel d'autre part. A terme si cette technique est validée, elle pourra être utilisée chez les patients présentant de l'arthrose et traités à l'aide de ces nouvelles thérapeutiques, à l'aide d'un scanner spectral à comptage de photons (qui permet de faire cette approche d'imagerie chez les patients).

Ce projet repose sur l'utilisation de cellules stromales mésenchymateuses d'origine humaine ; il est démontré que les cellules humaines ne sont pas rejetées et possèdent un effet thérapeutique chez la souris. Le développement de la pathologie sera contrôlé en cours d'expérimentation par imagerie par résonance magnétique. Le suivi longitudinal du devenir des cellules sera réalisé par imagerie dans les 6 semaines après induction du modèle d'arthrose.

Nous avons déterminé un programme de travail sur les 5 ans à venir qui tient compte des avancées attendues de notre projet de recherche. Un total de 186 souris sera utilisé au maximum. Le modèle d'arthrose chez la souris présente l'avantage de reproduire assez fidèlement les atteintes chroniques observées chez l'homme dans les cas d'arthrose et est considéré comme référence. De plus, l'utilisation du modèle souris permet de tester l'effet thérapeutique de cellules stromales mésenchymateuses humaines.

Les animaux seront imagés in-vivo de 1 à 6 semaines après l'induction du modèle murin d'arthrose à la collagénase. Dans ce modèle l'injection intra-articulaire de collagénase digère non pas le cartilage, mais les ligaments, produisant ainsi une instabilité qui conduit à l'arthrose. A ce stade, les animaux ne présentent pas de signe de douleur visible au niveau comportemental ou macroscopique liée au modèle. Les procédures du projet (imagerie in-vivo réalisée sous anesthésie générale) présentent des contraintes de classe légère pour les animaux et n'engendrent pas de

souffrance ou de stress. Par ailleurs, l'irradiation de l'animal par les rayons X est maintenue au minimum pour permettre un suivi longitudinal.

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

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

- Raffinement : toutes les mesures seront prises pour réduire la souffrance des animaux. Les procédures utilisées pour induire la pathologie ostéo-articulaire étant de degré de sévérité légère au maximum, les animaux ne présentent pas de signes de souffrance habituellement. Cependant, dans le cas où certains signes seraient observés, un traitement oral avec du paracétamol serait mis en place.

- Remplacement : Afin de proposer une thérapie cellulaire chez l'Homme, il est important de démontrer l'efficacité thérapeutique des cellules stromales mésenchymateuses humaines dans un modèle pré-clinique pertinent chez l'animal. Des modèles in vitro ne suffisent pas seuls à évaluer l'efficacité de ces cellules. Plusieurs sous-types d'arthrose existent chez l'Homme, il est donc nécessaire de mettre en place des modèles in vivo reproduisant le plus fidèlement possible les atteintes humaines. Par ailleurs, des tests ex vivo ont été réalisés au préalable afin d'obtenir la preuve de concept de la faisabilité de l'imagerie bicolore par imagerie à base de rayons X dans ce modèle avant de passer à l'imagerie in vivo.

19636 Les oestrogènes, et en particulier le 17β -oestradiol (E2) sont des hormones sexuelles qui sont largement impliquées dans le développement de la glande mammaire à la puberté. Or, à l'âge adulte, de par leur rôle sur la prolifération et la différenciation de ce tissu, la détection du récepteur des oestrogènes ER α est un facteur majeur dans le diagnostic des cancers du sein, qui représentent la 1^{ère} cause de mortalité chez la femme. Les patientes qui ont un cancer du sein exprimant le récepteur des oestrogènes ER α sont alors traitées avec des molécules bloquant l'effet des oestrogènes, soit par le Tamoxifène ou inhibiteurs d'aromatase. Or, malgré ces traitements, 40% des patientes récidivent, ce qui nécessite une meilleure compréhension des mécanismes d'action du récepteur des oestrogènes ER α . Ce récepteur ER α existe sous différentes isoformes, à savoir une forme longue de 66kDa, et une forme plus courte en taille de 46kDa. Il a aussi 2 localisations, une dans le noyau des cellules et l'autre à la membrane. Notre projet est donc d'étudier le rôle de ces différentes isoformes du récepteur des oestrogènes ER α , (courte/longue et nucléaire/membranaire) dans la carcinogenèse mammaire, en analysant l'apparition, la croissance de tumeurs mammaires dans des souris génétiquement modifiées exprimant ces différentes isoformes. Les animaux seront suivis de manière hebdomadaire pour comparer l'évolution de la maladie dans les différents modèles. Les tumeurs seront également ré-implantées sur des souris immunodéficientes pour analyser la réponse au traitement ou l'étude de métastases.

Les animaux sont sacrifiés quand une de leur tumeur aura atteint au maximum 17 mm sur son grand axe ou au maximum, quand les souris auront atteint l'âge de 300 jours si aucune tumeur n'est apparue avant. Le nombre de souris engagées par ces expériences est évalué à 1110 souris.

Ce protocole a été pensé en suivant le règle des 3R « Remplacer, Réduire et Raffiner ».

- Nous avons réduit le nombre de souris à 20 animaux par groupe, ce qui nous assure une validation statistique, d'après les différentes revues de la littérature utilisant ce modèle PyMT développant des tumeurs mammaires spontanées. Nous avons 3 groupes par genotype, puisqu'il y a les homozygotes WT, les hétérozygotes + /ER α muté et les homozygotes mutées ER α muté/ER α muté. Les tests statistiques seront réalisés en utilisant le test log-rank pour comparer les survies des populations.

Nous remplaçons dès que possible l'expérimentation animale par des tests en culture de cellules pour l'étude de la réponse au traitement. Mais, il faut noter qu'il n'existe aucun moyen de remplacer de telles études qui englobent l'ensemble de l'organisme dans sa réponse physiopathologique et

que seule l'expérimentation animale permet d'étudier un processus de différenciation tumorale et de carcinogenèse, et un suivi complet de la maladie depuis ses phases les plus précoces.

- Nous raffinons les conditions de vie de l'animal en limitant le nombre d'animaux par cage, et en adaptant ce nombre selon leur comportement. Un suivi rigoureux des souris tout au long du protocole est effectué en palpant les glandes mammaires des souris pour analyser l'apparition de tumeur et en mesurant le poids corporel. Le bien-être des animaux sera donc évalué de façon complémentaire et quotidienne en observant leur comportement et les indices pouvant suggérer une douleur (prostration, poil hirsute, score de grimace.). Les changes des cages sont effectués une fois par semaine ou plus si besoin afin d'avoir une litière propre, et qu'il y ait suffisamment d'eau à boire et d'aliments

19637 Les dysfonctions et faiblesses musculaires, causées par des maladies héréditaires, le cancer ou le vieillissement, comptent parmi les problèmes de santé publique les plus dévastateurs. Le principal obstacle au développement de thérapies musculaires est de parvenir à délivrer les molécules thérapeutiques aux muscles. En effet, les muscles squelettiques représentent 40% de la masse corporelle et sont répartis dans tout le corps : un traitement doit être capable de cibler efficacement tous les muscles touchés. La recherche préclinique est indispensable pour développer de tels traitements.

Ce projet, établi sur 5 ans, vise à développer une nouvelle stratégie de délivrance de molécules thérapeutiques aux muscles. La stratégie cible spécifiquement les muscles, mais utilise des cellules sanguines, qui sont naturellement capables de circuler dans tout le corps et de pénétrer dans les muscles, en particulier lorsque ceux-ci sont lésés. L'objectif spécifique de ce projet est de tester in vivo des modifications des cellules sanguines leur permettant de fusionner à des fibres musculaires lésées. S'il réussit, ce projet ouvrira la voie au développement de traitements innovants et personnalisés de patients souffrant de dysfonctions musculaires.

Le projet est réalisé sur des souris de laboratoire (Wild-type BALB/c).

Les souris reçoivent une injection de cellules sanguines thérapeutiques. Une lésion musculaire très localisée est induite au niveau des pattes arrière par injection d'une toxine, qui peut occasionnellement entraîner une diminution de la mobilité des souris pendant les heures qui suivent. Les animaux subissent également des injections et des prélèvements sanguins pour analyses, ainsi que de l'imagerie non invasive. Le degré de souffrance, douleur et stress de l'animal causé par l'ensemble de ces procédures est évalué à un niveau modéré. Ces expériences permettront de progresser pour répondre au besoin de patients concernant la délivrance de molécules thérapeutiques aux muscles lésés.

Le projet vise à déterminer si une délivrance systémique de cellules sanguines modifiées peut permettre d'atteindre des muscles lésés, ce qui doit nécessairement être réalisé in vivo dans un système physiologique complet qu'aucune autre méthode alternative ne nous permet d'avoir, aucun remplacement de ces animaux n'est donc possible. Il est nécessaire de tester la faisabilité et l'innocuité de cette stratégie dans un modèle préclinique : la souris est utilisée ici comme organisme modèle car son organisation musculaire est très similaire à l'homme et elle offre des avantages techniques essentiels. Une preuve de principe validant la stratégie a été obtenue in vitro, et les cellules sanguines thérapeutiques seront toutes validées in vitro avant injection chez l'animal.

Le projet utilisera au maximum 368 souris (soit 74 par an en moyenne). Le nombre d'animaux par lot est limité au maximum, tout en maintenant un nombre suffisant pour les analyses statistiques.

Afin de permettre la réduction du nombre d'animaux, l'imagerie in vivo permet d'observer la progression de l'expérience sans avoir à mettre à mort l'animal. Lorsque les expériences le permettent, les muscles des deux pattes arrière de l'animal sont analysés.

Pour un raffinement du bien-être et afin de réduire la souffrance des animaux, des anesthésiques et des analgésiques (pré- et post-opératoires) sont utilisés pour toute procédure susceptible de causer du stress ou de la douleur à l'animal (injections). Le milieu des cages est enrichi pour réduire le stress des souris, et des aliments spéciaux sont utilisés afin de faciliter l'accès des animaux à la

nourriture pendant leur rétablissement après manipulation. Les souris sont suivies régulièrement pour détecter d'éventuels signes de souffrance ou stress nécessitant une action supplémentaire.

L'imagerie in vivo se fait de manière non invasive.

Des signes de maladie, de détérioration de l'état de santé général, ou de souffrance de l'animal non traitable par les analgésiques prévus constituent des points limites où les souris sont mises à mort.

19638 Dans l'obésité, différents facteurs peuvent influencer la surconsommation alimentaire. L'odeur est l'un des signaux sensoriels les plus pertinents pour prédire la palatabilité des aliments et est susceptible de jouer un rôle clé dans le choix et la consommation d'aliments. La relation entre l'olfaction et la prise alimentaire a été établie très tôt et il a depuis été confirmé que le système olfactif peut détecter les hormones et nutriments de la circulation impliqués dans la régulation métabolique. Cependant, nous ignorons toujours quel est l'impact de l'hypothalamus - région du cerveau qui contrôle de façon majeure l'apport alimentaire et la dépense énergétique - sur l'activité olfactive et le comportement alimentaire olfactif.

Nous disposons d'un modèle animal murin dans lequel les neurones de l'hypothalamus qui stimulent la prise alimentaire peuvent être sélectivement éliminés à la naissance. Sur ces animaux nous étudierons les paramètres suivants :

-Caractérisation des performances olfactives

-Evaluation de l'effet des odeurs alimentaires appétitives/aversives

-Evaluation des odeurs sur le métabolisme

-Evaluation des modifications cérébrales suite à l'ablation des neurones hypothalamiques

La règle des trois R sera respectée, le nombre d'animaux sera réduit au minimum en optimisant au maximum les groupes expérimentaux (réutilisation des animaux dans différentes procédures n'entraînant pas de douleur ou de stress) et en raffinant les procédures pour réduire au minimum la douleur, la souffrance et l'anxiété des animaux. Nous effectuerons lorsque nécessaire l'administration d'analgésique lors des procédures, ainsi que d'antalgique en post opératoire, si besoin. Les gestes chirurgicaux seront effectués sous anesthésie générale et analgésie pré, per et postopératoire. Les cages sont agrémentées d'un nid végétal et d'objets pour le confort de l'animal.

Un total de 320 souris sera utilisé pendant les 5 ans d'étude du projet. Le bien-être animal est pour nous primordial vis-à-vis de l'animal mais aussi de nos expérimentations, les résultats de comportement ne peuvent être valables que si l'animal est bien portant.

Des points limites spécifiques d'évaluation de la douleur à chaque procédure seront mis en place. L'atteinte d'un de ces points limites entraînera la mise à mort anticipée de l'animal concerné. Enfin, cette étude ne peut être remplacée par des techniques in vitro comme la culture cellulaire, car nous regardons les études du comportement et du métabolisme ne peuvent être réalisées que chez un animal vivant.

Cette étude apportera des informations importantes concernant le lien étroit entre la régulation de la prise alimentaire et l'olfaction chez la souris, et permettra de déterminer la part des influences neuronales en provenance de l'hypothalamus sur les variations de la perception olfactive en fonction des états de faim ou de satiété.

19639 L'obésité est un facteur de risque de l'apparition de complications comportementales, en augmentant le stress, l'anxiété et en altérant la mémoire. Dans ce contexte, la production intestinale de glucose est une fonction intéressante, puisqu'elle est à l'origine des effets bénéfiques anti-obésité et anti-diabète des régimes riches en protéines ou en fibres. L'induction de cette fonction dans des modèles de souris transgénique protège du développement de l'obésité induit par 5 mois de régime hypercalorique.

Grâce à une détection locale par le système nerveux intestinal et un relais central (cerveau), le glucose produit par l'intestin active de nombreuses aires cérébrales, dont l'hypothalamus et l'amygdale, deux composants du système limbique qui sont également impliqués dans le contrôle de la balance énergétique. En effet, il a été montré que l'activation de la production de glucose par

l'intestin exerce des effets bénéfiques sur les comportements de type anxieux et dépressif ; et au contraire son absence provoque l'apparition de ces troubles et diminue la neurogenèse de l'hippocampe, une fonction impliquée dans l'apprentissage et la mémoire.

En comparant des modèles murins d'inactivation ou d'activation de la production de glucose par l'intestin, nous proposons d'étudier les effets bénéfiques de cette fonction, per se (indépendamment de l'alimentation), dans la protection des troubles cognitifs, dont le stress, l'anxiété et la mémoire, qui sont généralement associés à l'obésité. Ainsi, nous déterminerons si l'activation de la production de glucose par l'intestin diminue le stress et l'anxiété et améliore la mémoire chez des souris nourries avec une alimentation standard, et si elle protège de l'apparition de ces troubles induits par l'obésité suite à un régime hypercalorique de 5 mois. En miroir, nous déterminerons si l'absence de cette fonction est suffisante pour altérer la mémoire des souris sous alimentation standard, et si son absence accélère/aggrave l'apparition des pertes de mémoires induites par un régime hypercalorique. Des lots d'animaux permettront des analyses moléculaires dans différentes régions du cerveau et d'autres permettront des analyses du comportement anxieux et de la mémoire spatiale.

L'évaluation du stress et de l'anxiété chez les souris invalidées pour la production de glucose de novo par l'intestin ayant déjà été réalisée, elle ne sera pas étudiée dans ce projet.

Face à l'augmentation constante de la prévalence mondiale de l'obésité et de ses complications, la mise en évidence d'une nouvelle cible thérapeutique par l'activation de la production de glucose par l'intestin est un enjeu majeur de santé publique, en ciblant à la fois le métabolisme et le comportement.

Les souris seront nourries avec une alimentation standard ou hypercalorique pendant au maximum 5 mois. Ces temps de régime relativement courts devraient entraîner une prise de poids associée au développement d'un diabète et d'une stéatose hépatique modérés, sans occasionner de souffrance liée à une obésité massive. Les mesures de prises de poids effectuées toutes les semaines permettront de vérifier le bien-être des souris (comparaison à des courbes de référence).

Alors que des études précédentes ont montré que l'absence de production de glucose de novo par l'intestin est suffisante pour induire des troubles anxieux et dépressifs légers chez les souris (phénotype dommageable léger), nous avons choisi de limiter le temps de régime hypercalorique à 3 semaines (suffisant pour notre étude tout en limitant l'impact négatif sur les souris).

La succession des tests comportementaux est susceptible d'induire ou d'aggraver l'anxiété et le stress des souris.

Le modèle murin a été choisi car la production intestinale de glucose est une fonction présente chez les souris avec des mécanismes de régulations similaires à ceux de l'homme, en plus de son accessibilité (petite taille, possibilités de modifications génétiques, manipulation aisée et nombreux outils d'analyses disponibles). Les souris seront étudiées à l'âge adulte afin de ne pas introduire de biais expérimentaux.

Règle des 3R:

Remplacement :

Le recours à l'animal est indispensable car la détection de la production de glucose par l'intestin implique des dialogues entre organes puisque le glucose produit par l'intestin est détecté par le système nerveux entérique, qui transmet un signal au cerveau.

Réduction :

Le nombre de souris a été calculé au plus juste à partir des connaissances des pathologies étudiées, des modèles animaux, et des résultats précédents du laboratoire. Afin de pouvoir faire une analyse statistique, des groupes de 8 (études moléculaires/neurobiologiques) ou 12 (études comportementales) souris au maximum seront analysés.

Au total, 332 souris mâles transgéniques et contrôles seront nécessaires, dont la totalité subiront des procédures de classe modérée. De plus, une étude pilote menée sur 12 souris provenant d'un autre projet utilisant les mêmes modèles de souris transgéniques permettra entre autres de préciser le nombre d'animaux nécessaire pour les études comportementales.

En fin de procédures, les animaux seront mis à mort afin de prélever différentes régions du cerveau, mais également de nombreux tissus pour constituer une banque de tissus utilisable à l'avenir pour certaines analyses moléculaires sans animaux supplémentaires.

Raffinement:

Les souris seront hébergées par groupe, dans un milieu enrichi pour favoriser la nidation et limiter le stress (permet d'atténuer le phénotype anxieux léger des souris invalidées pour la production de glucose par l'intestin).

Les animaux seront observés quotidiennement et pesés chaque semaine pour suivre leur prise de poids. Deux semaines avant les tests comportementaux, les souris seront manipulées tous les jours afin de limiter leur stress. Le recours à l'échelle de grimaces de souris (mouse grimace scale) permettra une évaluation précoce du bien-être. De plus, l'étude pilote permettra de mieux évaluer les contraintes, l'impact d'une succession de tests comportementaux et des points limites supplémentaires. Pour réduire le stress infligé à un même groupe de souris, un groupe d'animaux sera dédié au test de nage forcée avec un temps de nage réduit (5minutes au lieu des 15minutes classiquement) évitant d'atteindre l'épuisement de l'animal. Lors de l'atteinte d'un point limite défini dans le projet, les souris pourront être mises à mort selon les méthodes autorisées par la législation.

19640 La maladie d'Alzheimer (MA) est la démence la plus fréquemment diagnostiquée. Il s'agit d'une maladie neurodégénérative qui entraîne la perte progressive et irréversible des fonctions mentales et en particulier de la mémoire. La conduite d'études permettant une meilleure compréhension de la maladie et ainsi l'élaboration de nouveaux traitements apparaît donc comme indispensable. La mise au point de stratégies thérapeutiques représente un réel défi car les premiers symptômes de la maladie apparaissent très progressivement. Ils touchent la mémoire, le langage, les reconnaissances, ou encore les stratégies de raisonnement et d'organisation. Dans certains cas, les premiers symptômes sont légèrement précédés de crises d'épilepsie dites inaugurales. Ces crises pourraient précipiter l'installation des symptômes chez des patients à risque de développer la MA. Il n'existe aujourd'hui que des études épidémiologiques chez l'humain qui ont permis de proposer que les crises inaugurales chez les patients âgés soient des indicateurs voire accélérateurs de la MA. Le projet que nous portons offre l'opportunité de réellement tester l'hypothèse selon laquelle, sur un terrain génétique favorable au développement de la maladie, l'épilepsie peut accélérer le processus pathologique, ce qui permettrait le cas échéant d'ouvrir la porte à de futures études pharmacologiques pour évaluer l'effet de molécules prometteuses sur le déclin cognitif pathologique.

Pour cela, l'enjeu est de disposer d'un modèle animal au plus proche de la symptomatologie observée chez l'humain, avec un développement de la maladie suffisamment lent pour disposer d'une fenêtre d'intervention permettant de mesurer non seulement les effets délétères d'une épilepsie mais aussi les effets de tout potentiel traitement visant à ralentir cette accélération si elle a lieu. Pour ce projet, le modèle choisi de rats transgéniques pour ce projet offre cette opportunité car ils portent deux mutations humaines. La présence de ces mutations entraîne un développement lent de la maladie et une symptomatologie (plaques séniles, enchevêtrements neurofibrillaires) au plus proche de la forme familiale humaine.

Les effets de l'épilepsie sur la précipitation des différents symptômes de la maladie seront investigués.

Pour cela, l'épilepsie sera induite selon deux modèles : un modèle d'épilepsie dite active, induite pharmacologiquement et conduisant à la survenue de crises spontanées tout au long de la vie de l'animal (procédure 1); ou selon un modèle d'épilepsie dite contrôlée, induites par stimulation électrique, dans laquelle nous limiterons le nombre de crises à 10 (procédure 2).

Ce protocole comporte 2 procédures de classe sévère, d'une durée de 1 à 5 mois.

Les animaux inclus dans la première procédure seront soumis à des injections (sous-cutanées et intra-péritonéales) dans le cadre de l'induction d'un état de mal épileptique. Celui-ci est responsable d'une inflammation qui va entraîner une douleur cérébrale pendant 3 à 5 jours. L'inflammation ne peut être jugulée car elle est indispensable au développement de l'épilepsie.

Les animaux inclus dans la seconde procédure subiront une intervention chirurgicale nécessaire à l'implantation d'électrodes d'enregistrement et de stimulation. La chirurgie entraîne des douleurs cérébrales qui sont contrôlées par administration de métacam le jour de la chirurgie et les 3 jours suivants. L'état de mal épileptique ainsi que la chirurgie sont suivis d'une perte de poids jusqu'à 20% qui peut durer jusqu'à 3 jours avant un retour à une évolution normale de la courbe de poids.

Dans le cadre de ce projet, des rats mâles et femelles seront utilisés au nombre de 416 au total, dont 228 pour la procédure 1 et 188 pour la procédure 2.

A l'issue de ces procédures, l'ensemble des animaux seront mis à mort, pour prélèvement de leur cerveau ou pour fin d'expérimentation.

Dans sa conception, le projet a pris en compte la règle éthique des 3R :

1) Remplacement : Compte tenu du fait que la MA regroupe une diversité de syndromes, il existe à ce jour très peu d'alternatives permettant d'évaluer les différents aspects de la pathologie sur des modèles *in vitro* ou *ex vivo*. De plus, l'analyse de comportements complexes, comme ceux de l'anxiété et de l'apprentissage spatial, ne peut être appréhendée autrement qu'*in vivo* chez des vertébrés, et ne peut aujourd'hui être remplacée par des méthodes alternatives *in vitro* ou *in silico*.

2) Réduction : Ce projet impliquera l'utilisation de 416 animaux au maximum sur une durée de 5 ans. Ce nombre d'animaux a été réduit au minimum tout en ne compromettant pas l'atteinte des objectifs de l'étude. Il a été déterminé à l'aide d'outils statistiques, en tenant compte des résultats d'études antérieures dans le laboratoire sur ces mêmes modèles.

3) Raffinement : Le poids des animaux sera suivi hebdomadairement, et les animaux seront soumis à une surveillance attentive à l'aide d'une grille d'évaluation du bien-être, pour limiter au maximum stress et douleur, et apporter des soins adaptés, le cas échéant. En cas d'isolement, les animaux seront manipulés quotidiennement pendant 5 minutes. Au moment des chirurgies, les conditions d'asepsie seront maintenues durant toute l'anesthésie générale. Un traitement analgésique sera appliqué pour prévenir une quelconque douleur post-opératoire et la température corporelle des animaux sera régulée jusqu'à leur réveil. Enfin, nous nous efforcerons à chaque instant de raffiner nos procédures afin d'optimiser le bien-être des animaux.

19641 Dans le cadre de cette demande, nous souhaitons aborder les conséquences moléculaires et physiologiques de la perte de fonction de deux gènes non-codants, nommés ci-après ARNnc. Des données cliniques montrent que des anomalies dans l'expression de ces ARNnc sont liées à une maladie rare, associée à des troubles comportementaux et métaboliques. Les gènes de ces ARNnc sont conservés uniquement chez les mammifères placentaires et leur expression est limitée aux cellules neuronales. A ce jour, il n'existe pas de système cellulaire permettant d'aborder la fonction de ces gènes. D'autre part, les modèles animaux de la pathologie humaine sont tous réalisés chez la souris, pour la grande majorité dans un fond génétique C57Bl/6J. La souris reste donc le modèle de choix pour étudier le rôle de ces gènes dans le cerveau et, ce faisant, leur contribution en pathophysiologie. Nous proposons d'étudier des souris génétiquement modifiées (knockout, KO) et d'examiner les conséquences des altérations génétiques introduites, aussi bien sur le plan moléculaire que métabolique ou comportemental. Notre intérêt se portera tout particulièrement sur les dommages observés en période périnatal (mortalité, défaut de croissance et défauts métabolique). Pour cela nous envisageons de collecter à différents stades, post et périnatal, différents tissus, mesurer différents paramètres (glycémie, corps cétoniques, poids) et prélever du plasma pour réaliser des dosages métaboliques. A l'âge adulte, nous proposons de soumettre les animaux à une batterie de tests comportementaux afin de déterminer quel est l'impact de la délétion de ces gènes sur les capacités motrices, le comportement d'anxiété/dépression, et sur les capacités cognitives (apprentissage et mémoire) de nos souris.

De manière générale, le caractère ouvert et exploratoire de notre recherche ne permet pas d'anticiper les phénotypes qui seront observés. Cependant, nous limiterons le nombre des animaux étudiés en fonction de la pénétrance et de la variabilité de nos observations en respectant la règle des 3 R.

-Réduire : Ce modèle murin a été réalisé dans le fond C57Bl/6J afin d'obtenir des résultats reproductibles et comparables avec les données de la littérature. Enfin, ce fond génétique est bien adapté pour les analyses comportementales et métaboliques et, de fait, participe à la réduction de la taille des cohortes analysées.

Nous estimons que notre étude nécessite 372 souris pendant une période de 5 ans. Ce nombre représente l'effectif nécessaire pour obtenir une puissance statistique robuste. Le nombre d'animaux par groupe est aussi fonction des données de la littérature, des recommandations des plateformes avec qui nous collaborons ainsi que de notre expérience passée. En fin d'expérimentation, nous prélèverons et archiverons un maximum de tissus à partir d'un même individu, et ce, en prévision de futures analyses moléculaires afin de limiter le nombre d'animaux.

-Raffiner: Les expériences proposées sont classiques et maîtrisées par les membres des équipes participant à ce projet. En ce qui concerne les tests comportementaux qui ne sont pas considérés comme invasifs, une souris pourra effectuer plusieurs tests selon une séquence déterminée. Des séances de manipulation («handling») avec l'expérimentateur et de familiarisation des dispositifs – quand c'est possible - seront réalisées afin de réduire le stress de l'animal. Les procédures qui le nécessitent seront réalisées sous anesthésie pour limiter et réduire la souffrance et l'angoisse des animaux, en respectant les points limites définis. Les animaux sont hébergés selon les normes d'éthique en vigueur et disposent d'environnements enrichis. Ils seront observés quotidiennement afin de repérer des anomalies, notamment en termes de comportement général, de prise de poids ou d'apparence générale. En cas de blessures, d'anomalies comportementales ou de perte de poids de plus de 20%, les animaux seront mis à mort sur avis du responsable du Bien-être animal de la zootechnie et/ou du vétérinaire référent.

19642 Les muscles squelettiques sont essentiels pour le maintien de la posture, la mise en mouvement du squelette, la respiration et la régulation du métabolisme. L'état du tissu musculaire est un facteur crucial dans les maladies comme par exemple les maladies cardiovasculaires, le cancer, le diabète, l'obésité ainsi que l'ensemble des myopathies. La fonction du muscle squelettique est également l'un des principaux facteurs néfastes pour la longévité et la qualité de vie des personnes âgées. En effet, au cours du vieillissement, la perte progressive de la masse musculaire squelettique, référencée sous le terme sarcopénie, est également associée à des troubles cardiovasculaires, métaboliques et cognitifs. L'ensemble se traduit par une incapacité du muscle à fonctionner, aboutissant à une dérégulation de l'expression génique et de l'organisation de la chromatine.

Nous travaillons sur un nouveau modèle murin spécifique des études du muscle squelettique. Les premières caractérisations de ce modèle mettent en évidence un phénotype de vieillissement prématuré. Cela se traduit par une perte progressive et très lente de la masse musculaire au cours du vieillissement qui est associée à des altérations histologiques et métaboliques du muscle chez des souris âgées de 12 mois. L'objectif maintenant pour mieux caractériser ce modèle et comprendre certains mécanismes dérégulés lors du vieillissement et des pathologies musculaires, est d'étudier les régulations moléculaires, notamment au niveau nucléaire, qui ont lieu dans des cellules post-mitotiques des souris jeunes (2 mois) et âgées (12 et 24 mois).

Pour ce type d'étude sur le vieillissement dans le tissu musculaire le modèle animal reste l'unique moyen d'étude. En effet, du fait de la particularité du muscle squelettique et de l'impossibilité d'étudier le vieillissement en culture, ces études requièrent l'utilisation d'un modèle animal. Le modèle souris est un modèle de choix en raison de ces étroites similitudes génétiques et physiologiques avec les humains. De récents travaux ont établi la souris comme un excellent modèle de vieillissement humain.

Le nombre de souris a été évalué à maximum 884. Ce nombre a été calculé comme nécessaire et suffisant pour pouvoir valider statistiquement les résultats en prenant compte l'expérience acquise sur les techniques envisagées ainsi que l'exclusion d'animaux qui pourraient atteindre des points limites bien définis.

Une première procédure servira à renouveler les reproducteurs ainsi qu'à produire les animaux nécessaires à la réalisation des procédures 2, 3 et 4 qui comprendra le modèle de vieillissement prématuré et les contrôles associés.

Dans les procédures 2, 3 et 4, nous induirons l'expression de différents marqueurs cellulaires par une technique d'infection. La transduction des fibres musculaires aura lieu après injection locale dans le muscle du Tibialis Anterior sur souris anesthésiées dans le but d'évaluer les mécanismes de régulations engendrés au cours du vieillissement. Ces techniques d'infections ont récemment été décrites comme ayant une très bonne efficacité pour marquer l'ensemble des fibres musculaires. De plus, nos cibles d'intérêts seront fluorescentes pour facilement pouvoir les suivre dans les cellules musculaires. Cette technique est privilégiée car elle est moins douloureuse pour l'animal et de meilleurs résultats de marquage sont attendus par rapport à la seule autre méthode qui est l'électroporation. Ainsi, la procédure 2 sera une procédure pilote pour s'assurer que nos constructions, bien qu'au préalable validées en modèle cellulaire, fonctionnent correctement in vivo et sur souris âgées. Dans la mesure où la procédure 2 est validée, la procédure 3 complètera les animaux de la procédure 2 pour avoir une cohorte suffisante pour isoler des myonuclei et quantifier leur niveau d'altération, cela dans le but de réduire le nombre d'animaux. La procédure 4 consistera à exprimer et analyser par imagerie les marqueurs fluorescents qui seraient impliqués dans le mécanisme de vieillissement du muscle.

D'après des études antérieures et notre expérience, les animaux présentent un comportement et une activité normale après ce type de procédures dès leur réveil. Autant que possible, des prélèvements multiples seront réalisés après mise à mort sur le même individu pour des tests parallèles (intra et inter-projets).

Pour s'assurer du bien-être animal, les protocoles les moins invasifs et les moins douloureux possibles sont privilégiés. Des anesthésiques sont utilisés pendant les expérimentations afin de réduire au maximum le stress et la souffrance des animaux. Les animaux seront toujours à plusieurs par cage afin de maintenir l'aspect social et chaque cage sera dotée d'un environnement enrichi (standard à l'animalerie), avec eau et nourriture ad libitum. Le bien-être des animaux sera évalué tout au long de la procédure par observation du comportement des animaux (posture, interaction) et mesure du poids.

19643 Le projet vise à analyser les effets des matières en suspension (MES) sur la physiologie de la truite, espèce de poisson commune et emblématique des rivières alpines. Ces rivières sont couramment aménagées pour la production hydroélectrique, ce qui modifie l'hydrologie et le transit sédimentaire. Les sédiments fins transportés par la rivière s'accumulent dans ces réservoirs et nécessitent d'être évacués lors d'opération de gestion. Le plus souvent les sédiments extraits sont remis en suspension dans la rivière en aval, provoquant une augmentation importante de la turbidité de l'eau pendant plusieurs heures à plusieurs semaines. Des concentrations extrêmes en MES (jusqu'à plusieurs dizaines de grammes par litres) sur de courtes périodes (quelques heures à quelques jours) sont connues pour être délétères chez les salmonidés, mais les effets de concentrations moindres (aux alentours du gramme par litre) sur des périodes plus longues (ou « chronique » ; plusieurs semaines) sont encore peu étudiés. De plus, caractériser ces impacts sur de jeunes stades en milieu naturel reste difficile : d'une part, les conditions d'échantillonnage peuvent être très compliquées, et d'autre part, les réponses attendues des organismes à ces niveaux de concentration en MES sont difficiles à mesurer in situ (réponses comportementales ou physiologiques, non forcément létales) et reflètent également les effets d'autres facteurs environnementaux (facteurs confondants). Ainsi, une approche en milieu contrôlé est nécessaire afin d'isoler le facteur d'intérêt (concentration en MES) et analyser ses effets sur différents indicateurs physiologiques tels que la croissance, les performances de nage et la présence de molécules marqueurs de stress. De précédentes études ont évalué l'effet chronique des MES sur les jeunes stades de salmonidés mais dans des conditions d'eau stagnante. Les effets mis en évidence ont été limités à des altérations physiologiques (pertes de masse, œdèmes branchiaux) mais il est apparu nécessaire de poursuivre ces travaux dans des conditions plus proches du milieu naturel, l'effet combiné de la vitesse du courant et des MES n'ayant pu être évalué.

Ce projet propose d'étudier les effets des MES sur des truites communes juvéniles (stade connu pour être plus sensible aux perturbations) dans des conditions d'exposition simulant une opération de gestion sédimentaire de type curage (canaux expérimentaux avec des vitesses de courant semblables aux conditions naturelles et une exposition aux MES de 30 jours à 1000 mg/L).

Un dispositif expérimental qui comprendra 4 canaux sera mis en place. Dans ces canaux, des juvéniles de 1 an de truite commune seront exposés à deux concentrations de matière en suspension (1000 mg/L, simulation d'un curage versus 0mg/L)

Différentes métriques seront étudiées tout au long de l'expérience afin de déterminer les impacts physiologiques : Des tests de respirométrie seront réalisés pour enregistrer les cinétiques de consommation d'oxygène ainsi que des tests en tunnel de nage, dispositif permettant de mesurer des caractéristiques du métabolisme à l'effort. Enfin, à la suite de l'expérimentation, l'ensemble des 160 individus sera mis à mort pas surdosage d'anesthésique et un certain nombre de mesures et prélèvements seront réalisés : mesures biométriques (croissance, indice de condition), observation de diverses pathologies potentielles (infections, présence de parasites), analyses histologiques des branchies (degré de colmatage), prélèvements d'écaillés (dosage du cortisol : stress chronique), d'intestin (observation des microvillosités) et de tissus musculaires et hépatiques (marqueur de stress oxydatifs, indice hépato-somatique). En complément un prélèvement sanguin au niveau de la nageoire caudale avec une seringue prévue à cette effet sera réalisé servant au dosage du cortisol plasmatique (stress court terme).

Remplacer : Le modèle animal ne peut pas être remplacé par un modèle cellulaire ou autre pour répondre à la problématique posée car il vise à étudier la réponse d'un organisme entier (perturbations physiologiques) à des MES. Les résultats obtenus permettront de discuter les normes et les stratégies de gestion actuellement en vigueur concernant le relargage de MES. Les juvéniles de truites communes seront issus d'élevage en pisciculture.

Réduire : Lors de cette expérience, 80 individus par traitement seront utilisés pour garantir la robustesse statistique des analyses et prélèvements. Cet effectif est un minimum pour prendre en compte la variabilité inter-individuelle, tout en limitant au maximum le nombre d'individus mis à mort. Les poissons seront surveillés quotidiennement (semaine et weekend) tout au long de l'expérience. La valorisation des 160 individus sera optimisée par divers observations et prélèvements sur chacun.

Raffiner : Les poissons seront répartis dans deux canaux par traitement afin de minimiser la densité dans chaque canal et les risques de pollution organique de l'eau. Le dispositif expérimental sera situé en extérieur et un soin particulier sera apporté aux conditions de vie des poissons. Des points limites suffisamment prédictifs et précoces ont été fixés pour éviter tout mal être chez les animaux.

Un suivi du bien-être (observation du comportement, de la pigmentation et de la fréquence respiratoire) sera réalisé quotidiennement (incluant weekends et jours fériés) jusqu'à la fin de l'expérimentation. Si une mortalité supérieure à 20 % intervient pendant la phase d'acclimatation ou en conditions de contrôle (traitement 0 mg/L), cela invalidera et stoppera l'expérimentation. Il en sera de même si une mortalité supérieure à 40% est observée en condition de MES (Traitement 1000 mg/L).

Au total, 160 poissons seront inclus dans cette étude. Les truites proviennent d'une structure d'élevage agréée et seront préalablement acclimatés de 15 jours au dispositif expérimental (canaux) afin de minimiser leur angoisse.

19644 Le projet de recherche a pour objectif de valider l'efficacité de biomatériaux multifonctionnels (20 biomatériaux différents correspondant à des ciments injectables, des biomatériaux imprimés en 3D et des matériaux de comblements divers) pour le traitement de pathologies tumorales osseuses (métastases osseuses de cancer du sein et ostéoclastomes). L'objectif principal du projet est double et vise à étudier, dans un modèle de vertèbre de queue de rat, l'influence de ces biomatériaux chargés ou non en molécules bioactives 1) sur la cinétique de régénération osseuse et 2) sur la prolifération de cellules tumorales syngéniques coimplantées avec le biomatériau. Nous utiliserons la lignée cancéreuse mammaire syngénique LLC-WRC 256 (ATCC® CCL-38™) (Kurth AA et al, J

Bone Miner Metab 2007, 25:86–92) que nous avons rendues luminescentes afin de faciliter le suivi de la croissance après implantation. Les produits étudiés ont déjà été validés in vitro pour leur influence sur l'ostéogenèse et leur cytocompatibilité avec des cellules ostéoblastiques.

Le choix du modèle de rat Wistar non-immunodéprimé ainsi que la conception du plan expérimental prennent en compte la règle des 3R :

- Remplacement : ce projet sur un système vivant, prenant en compte la complexité d'un organisme entier, est nécessaire pour valider les observations réalisées in vitro sur lignées cellulaires d'ostéoblastes et de cellules cancéreuses.

- Réduction : le modèle proposé permet l'étude à la fois de la réparation d'os lamellaire dense et d'os médullaire spongieux et de l'impact sur la prolifération tumorale, tout en limitant le nombre d'animaux requis car plusieurs sites (4 vertèbres caudales de taille similaire) sont utilisables pour l'étude et ce, sur 1 seul animal. L'utilisation de 4 sites vertébraux par animal permet d'éviter la constitution d'un groupe témoin, chaque animal étant son propre témoin positif et négatif.

- Raffinement : Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures ont été mises au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal. Les animaux utilisés feront l'objet d'une surveillance quotidienne et leur milieu sera enrichi à l'aide de litière mélangée à des frisottis en fibres naturelles, ainsi que de briques de peuplier ou tunnels.

Afin de tenir compte des variabilités inter-animales et intergroupes et obtenir des résultats suffisamment robustes d'un point de vue statistique, pour l'ensemble de ce projet, nous avons prévu un nombre total de 370 rats sur une durée de 5 ans (soit environ 75 rats par an).

La régénération/dégradation du tissu osseux et la croissance des cellules cancéreuses seront suivies par différentes techniques d'imagerie qui permettront un suivi longitudinal, non invasif, et en temps réel des animaux. La douleur induite par la lésion initiale et par la progression tumorale sera évaluée quotidiennement et gérée comme décrit ci-dessous.

En accord avec la réglementation en vigueur, nous avons prévu de nombreux points limites (animal qui ne boit plus et qui ne s'alimente plus, qui gémit, non réceptif aux signes extérieurs, avec les yeux fermés, le dos voûté, les poils hérissés, ou les yeux et l'abdomen creux, ris ou gémissements, mauvaise cicatrisation de la plaie, isolement, immobilité, perte de poids et déshydratation, automutilation). En cas de signes de souffrance, un protocole analgésique adapté sera mis en place. En cas de signes cliniques de souffrance de l'animal et malgré les soins et le traitement antalgique, l'euthanasie sera discutée en étroite collaboration avec la structure du bien-être animal.

19645 *Pseudomonas aeruginosa* (PA) est une bactérie responsable d'infection pulmonaire grave chez les patients atteints de mucoviscidose et chez les patients en réanimation. Cette bactérie, au gré de successives antibiothérapies, devient résistante à tous les antibiotiques habituellement utilisés. Aussi il est capital de rechercher des alternatives thérapeutiques aux antibiotiques comme les probiotiques. Les probiotiques sont des microorganismes qui, administrés en quantités adéquates, confèrent un bénéfice à la santé de l'hôte. Lors d'une étude précédente, l'analyse du microbiote respiratoire de patients atteints de mucoviscidose a permis de mettre en évidence un genre bactérien particulier : *Porphyromonas*. Ce genre bactérien, et plus particulièrement *Porphyromonas catoniae* (PC), semble être prédictif de l'infection à PA. Il a été montré chez ces patients, que ceux qui avaient moins de *Porphyromonas* dans les poumons, avaient plus de risque de se coloniser à PA. Par la suite, il a également été montré que la quantité de PC pulmonaire venait à diminuer, voire disparaître, préalablement à la colonisation à PA alors que PC restait stable chez les patients non colonisés. Précédemment, nous avons testé une souche clinique de *Porphyromonas catoniae* isolée de patients atteints de mucoviscidose qui semblerait plus efficace in vivo que la souche de référence qui n'est pas d'origine pulmonaire. Il est nécessaire de réaliser une seconde manipulation pour confirmer l'effet bénéfique observée, à savoir, une réduction de la quantité de *Pseudomonas aeruginosa* à 24h post infection avec la souche clinique de *Porphyromonas catoniae*. Nous utiliserons 18 souris afin de mener à bien cette expérimentation lors de deux procédures : une procédure légère avec l'instillation (dépôt d'une goutte de suspension bactérienne au bord de la narine) de nos souches et une procédure sans réveil avec la mise à mort par ponction

intracardiaque. La quantité résiduelle de PA sera recherchée par culture bactérienne de manière à pouvoir comptabiliser le nombre de bactéries vivantes et cultivables restantes dans le poumon à 24h. L'objectif est de confirmer un potentiel effet probiotique de PC clinique vis-à-vis de PA. L'ensemble de ce projet respecte les principes de remplacement, réduction et raffinement. En effet une seule espèce de *Porphyromonas* clinique a été sélectionnée grâce aux analyses précédentes réalisées *in vitro* (principe de remplacement), le nombre d'animaux a également été réduit au maximum sans compromettre les objectifs du projet (principe de réduction). Les animaux sont élevés à l'animalerie dans des cages enrichies avec un igloo et de la litière cellulosique au sein d'un portoir ventilé et les procédures expérimentales utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible la douleur et/ou l'angoisse des animaux (anesthésie préalable des animaux avant toutes procédures expérimentales ainsi que l'utilisation de lampes chauffantes durant toute la durée de la procédure) (principe de raffinement).

19646 Les cellules immunitaires Natural Killer (NK) appartiennent à la première ligne de défense du corps contre les agents pathogènes. En effet, ces cellules sont capables de reconnaître et d'éliminer les cellules infectées par un virus mais également les cellules cancéreuses. Cependant, en cas de surstimulation, les cellules NK vont devenir tolérantes et ne pourront plus exercer leur fonction. Cette situation explique que de nombreuses tumeurs échappent au contrôle exercé par les cellules NK. Restaurer la fonction des NK et ainsi leur contrôle sur la tumeur, est donc un objectif de portée thérapeutique et constitue le but de ce projet. Il existe un modèle chez la souris permettant d'induire l'épuisement des cellules NK. Ce modèle a permis de démontrer que leur perte de fonction est accompagnée de l'expression de certaines molécules suppressives à la fois en contexte de tumeurs solides ou hématologiques chez la souris. L'effet, sur les NK et sur la survie des souris, de traitement bloquant l'action de ces molécules suppressives sera testé dans ce projet. Les souris seront injectées avec des cellules tumorales par voie intraveineuse ou sous-cutanée puis traitées par gavage avec les différentes molécules testées et suivies durant 60 jours. Un prélèvement sanguin hebdomadaire pourra être réalisé afin de suivre l'apparition des cellules tumorales dans le sang. Les cellules NK seront également isolées et leur fonctionnalité testée. Ce type de projet nécessite l'utilisation de modèles animaux, le nombre d'acteurs cellulaires et moléculaires mis en jeu étant trop nombreux et leurs interactions trop complexes pour pouvoir être modélisés *in vitro*. Les protocoles proposés répondent à la règle des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer). Ainsi, le nombre d'animaux nécessaires a été calculé de façon à apporter des réponses statistiquement fiables tout en évitant des mises à mort inutiles. Afin d'optimiser le nombre d'animaux utilisés (520 souris), des techniques de pointe permettant la mesure précise de l'activation des voies de signalisation dans les cellules (cytométrie en flux multiparamétrique, cytométrie d'image) seront utilisées. Par ailleurs, la douleur et l'angoisse causées aux animaux seront évaluées et réduites à chaque fois que cela sera possible. Ainsi, les souris seront anesthésiées lors des injections en sous-cutanée et lors de la prise de sang au sinus rétroorbitaire. Des points limite au delà desquels les animaux seront mis à mort ont été définis. Ainsi la pousse tumorale peut entraîner une paralysie des membres postérieurs, la survenue d'un tel effet constitue un point limite.

19647 Les réseaux nerveux de la moelle épinière sont des intermédiaires fondamentaux entre les structures cérébrales et la périphérie de l'organisme. Ces réseaux intègrent les informations sensorielles et procèdent également à la sortie motrice assurant les mouvements coordonnés de l'organisme. La connaissance de ces réseaux et de leur fonctionnement est donc extrêmement importante dans de nombreux contextes physiopathologiques (sensation douloureuse, contrôle de la motricité, douleurs chroniques, lésions médullaires). Malgré la quantité de données acquises sur des modèles *in vitro* ou sur des animaux anesthésiés, l'amélioration des conditions de vie des patients touchés par des douleurs chroniques, paraplégie, maladie de Parkinson, maladie d'Huntington, Sclérose latérale amyotrophique etc. . . reste très insuffisante. Une des raisons des limites thérapeutiques est due à l'absence d'information sur l'activité du réseau spinal chez l'animal libre de ses mouvements.

Dans ce projet, nous visons l'étude de l'activité du réseau spinal chez l'animal vigile et libre de ses mouvements en utilisant des outils viraux permettant d'exprimer des protéines de type opsines sensibles à la lumière dans des populations neuronales précises et ce dans différentes situations physiopathologiques. Nous utiliserons un modèle de la maladie de Parkinson et un modèle de neuropathie périphérique par lésion partielle du nerf sciatique. Les animaux seront ensuite évalués sur le plan comportemental en utilisant des tests moteurs et sensoriels.

Ce projet respecte la règle des 3R. Ainsi, pour le R de Remplacer, le recours au modèle animal est indispensable car ce projet demande une évaluation comportementale et un enregistrement de l'activité électrique des neurones au sein de l'organisme. De ce fait aucun modèle *in vitro* ne peut reproduire des conditions pathologiques. La réduction du nombre d'animaux (R de réduire) est prise en compte tout en conservant une signification scientifique statistique qui tient compte de l'hétérogénéité interindividuelle. Le nombre de souris utilisé dans chacun des groupes expérimentaux ne dépassera pas ainsi 15 animaux par groupe et concernera des souris mâles et femelles, ce qui permet d'inclure tous les animaux des portées. Pour le R de Raffiner, tous les protocoles sont réalisés par des experts dans le domaine et sont ainsi optimisés pour soulager le stress et la douleur des animaux. L'utilisation d'anesthésique et d'analgésiques est prévue pour soulager les douleurs post-chirurgicales. Les animaux seront surveillés quotidiennement par l'expérimentateur avec une surveillance renforcée après la chirurgie jusqu'à la fin de l'expérimentation avec la mise en place d'une réhydratation, un réchauffement, des traitements vétérinaires si besoin. Des points limites sont définis pour éviter la souffrance des animaux.

Cela nécessite au total l'utilisation de 60 souris de type C57Bl/6J et de 1440 souris transgéniques soit un total de 1500 souris sur une durée de 5 ans.

19648 Notre thématique de recherche vise à étudier les mécanismes pathologiques et à développer des approches thérapeutiques pour une maladie neurodégénérative rare, fatale chez l'homme et à ce jour, incurable.

Précédemment, différents modèles cellulaires de la pathologie ont été générés. Bien qu'ils aient permis de révéler certaines actions de la protéine défective, aucun des modèles cellulaires n'a permis d'étudier les mécanismes neurodégénératifs de la pathologie. Ainsi, malgré les efforts réalisés pour mettre en place de méthodes alternatives, il est essentiel de générer un modèle *in vivo* de la pathologie pour étudier la complexité des mécanismes neurodégénératifs dans un contexte physiologique, et proposer un modèle préclinique pour valider des stratégies thérapeutiques, pour un passage efficace chez l'homme.

Pour cela, un modèle murin de la pathologie a été généré et une étude pilote a déjà démontré que ce modèle est le premier à mimer les symptômes de la pathologie humaine: atteintes des voies périphériques motrices et sensorielles et aussi du cerveau. Ici, l'objectif est de caractériser ce nouveau modèle animal, afin de définir l'âge de début de la maladie, de suivre et quantifier son évolution, ce qui permettra d'étudier les mécanismes de neurodégénérescence et aussi d'établir les bases pour réaliser des essais thérapeutiques futurs.

La précédente étude pilote a défini les paramètres clefs de ce modèle, ce qui permet ici de proposer un programme d'étude ciblé, en minimisant le nombre d'animaux et la douleur de l'animal. En particulier, la fenêtre de temps (1-12 mois) choisie dans l'étude ne génère pas de phénotypes dommageables, ce qui permet d'étudier les désordres neurologiques pré-symptomatiques en deçà du niveau de souffrance. Ceci a été précisément établi par la mise en place d'une grille de score de phénotype incluant l'évolution de la douleur et qui démontre des symptômes légers sur la période 1-12 mois, avec absence de douleur. Sur cette période de 1 an, 2 lots d'animaux seront engagés.

- Lot 1 (suivi au cours du temps): les animaux seront suivis au niveau comportemental (par des tests sans douleur) et par des tests de conduction nerveuse (test sans chirurgie et sous anesthésie générale). Afin de minimiser l'utilisation des animaux en expérimentation animale, les mêmes animaux seront utilisés pour faire des prélèvements sanguins pour analyse des biomarqueurs de la maladie. Ces 3 analyses correspondent à une procédure de classe "modérée".

- Lot 2 (analyse à temps fixes) sera dédié à l'analyse histopathologique du système nerveux, sur tissus fixés. Avec le même soucis de minimiser l'impact sur l'animal, ce même lot sera utilisé pour réaliser de l'imagerie cérébrale sur tissus fixés. Ces analyses font parties d'une procédure classée "sans réveil".

Le projet s'inscrit dans la réglementation des 3R.

Ayant démontré, dans l'étude pilote que ce modèle est le premier animal modèle robuste de la pathologie et que les modèles alternatifs ne sont pas satisfaisants, le projet répond à l'aspect "Remplacement".

L'étude pilote ayant montré une atteinte variable selon le sexe, cette étude engagera une cohorte de 260 animaux (males/femelles, animaux contrôles/animaux malades), qui seront étudiés sur les temps définis à 1, 3, 6, 9 et 12 mois. Afin de réduire l'impact sur l'expérimentation, plusieurs analyses seront réalisées sur le même animal, permettant de satisfaire l'aspect "Réduire" de la réglementation. L'étude pilote a été réalisée au préalable pour évaluer la pertinence de ce nouveau modèle, et connaître le degré et l'évolution de la souffrance de l'animal. Cela ayant permis d'identifier les points limites associés au modèle de la maladie, il est aujourd'hui possible de proposer un protocole d'étude dont la fenêtre temporelle se situe en deçà du seuil de douleur et de détresse. La méthodologie répond au critère "Raffiner".

Pour les gestes qui nécessitent une manipulation, une anesthésie associée à une analgésie adaptée sera mise en place, tout comme un enrichissement de l'environnement (coton, igloo Polycarbonate, rouleaux de cellulose, nourriture gélatinée). Si un animal devait présenter un symptôme anormal, il sera suivi 3 fois par semaine et une grille de score sera mise en place pour mesurer la gêne/douleur; si son état s'aggrave, l'animal sera suivi quotidiennement et euthanasié à l'approche du point limite défini dans la grille de score.

La connaissance des points limites du modèle, combinée à une surveillance des animaux sont des garants du respect des conditions d'étude sur les animaux selon les réglementations européennes.

19649 La Polyarthrite Rhumatoïde (PR) est une maladie auto-immune invalidante qui survient dans environ 1 % de la population. En l'absence de traitement, elle aboutit à une destruction articulaire avec un handicap fonctionnel. De nos jours, de nombreux traitements ont été mis en place, permettant une meilleure prise en charge de la maladie. Parmi eux, les anti-TNF et les inhibiteurs des molécules de signalisation JAK (Jaki) ont révolutionné la vie des patients. Cependant environ un tiers des patients présentent une réponse clinique jugée insuffisante. De plus, il existe un panel de biothérapies dont différents anti-TNFs et Jaki. Ces molécules présentent une variabilité intra-individuelle d'efficacité. Ce qui signifie qu'un même patient, ne va pas répondre de la même manière à 2 thérapies anti-TNF différentes ou 2 Jaki différents.

Afin de mieux comprendre le fonctionnement de ces thérapies ainsi que la variabilité de réponse, il est nécessaire d'étudier leurs effets dans un modèle complexe d'arthrite in vivo et d'appliquer la règle des 3R et selon la directive européenne 2010/63/UE comme suit :

Remplacement : Ce projet a pour but de mieux comprendre les mécanismes d'actions spécifiques aux différents traitements de la polyarthrite rhumatoïde. Les multiples phénomènes pathologiques impliqués dans le contexte de l'arthrite font intervenir de très nombreux types et fonctions cellulaires dans l'organisme. Actuellement, aucun modèle in vitro ne permet de mimer le phénomène étudié dans son ensemble et dans sa complexité. Les animaux donc seront utilisés afin de confirmer des résultats démontrés et des hypothèses formulées à partir des travaux réalisés sur cellules humaines primaires évaluées in vitro. A ce stade de l'expérimentation, l'utilisation de l'animal est inévitable. Il existe des modèles de souris qui développent spontanément des pathologies très proches de la polyarthrite rhumatoïde humaine et dont le sérum permet d'induire une arthrite rapide et résolutive dans d'autres modèles de souris (génétiquement modifiées ou non). Les études sont systématiquement optimisées d'après la littérature ou les observations réalisées au laboratoire. De plus, les traitements sont administrés de la façon la moins invasive possible (par priorité : alimentation ou boisson/injection IP/ injection IV).

Réduction : L'utilisation de l'animal est réduite au maximum et les effectifs des cohortes sont limités par l'outil statistique. Pour notre étude nous utiliserons donc, sur 5 années, 400 souris K/BxN, nous permettant d'obtenir suffisamment de sérum pour induire l'arthrite dans 600 souris (450 souris WT et 150 souris TNFR1KO/TNFR2KO/TmTNFKI). Au grand maximum, 1000 souris sur 5 ans seront nécessaires pour mener à bien ce projet. Le nombre de souris a été déterminé en fonction de l'ensemble des questions posées dans le projet (impact sur l'érosion osseuse, l'inflammation de la capsule synoviale, la variation des marqueurs sériques, les modulations des populations immunes) et nous permettra d'avoir la puissance statistique nécessaire. Ces modèles nous permettront d'effectuer notre étude dans des modèles complexes d'arthrite, en ayant la possibilité d'inhiber l'expression de certaines protéines pour mieux comprendre leur rôle dans la réponse thérapeutique à ces traitements. Pour chaque expérience, le maximum d'échantillons autorisés réglementairement seront prélevés sur l'animal afin d'éviter d'avoir à reproduire l'expérience par manque de tissus. Chaque fois que cela sera possible, nous analyserons un maximum de paramètres cellulaires et moléculaires sur les mêmes individus afin de limiter le nombre d'expériences in vivo.

Raffinement : Le bien-être des animaux sera suivi tout au long de nos expériences et fera l'objet de procédures strictes. Les animaux seront mis à mort en cas de trop grande souffrance lors de l'arthrite induite. Malheureusement, l'utilisation d'analgésiques n'est pas envisageable car elle risquerait de parasiter les données expérimentales. Un suivi des animaux a été mis en place en accord avec le comité de suivi du bien-être animal de notre établissement pour limiter la douleur, la souffrance ou l'angoisse de l'animal. Les animaux sont hébergés dans des conditions définies par la directive européenne 2010/63/UE et auront à disposition des igloos, des bâtons à ronger et cotons pour la nidification. Les animaux sont suivis quotidiennement, permettant la détection précoce d'anomalies éventuelles. Un animal sera euthanasié s'il présente une prostration continue, une déshydratation ou une perte de poids supérieure à 20%. Des périodes d'acclimations à l'hébergement comme à la manipulation permettront de limiter l'angoisse des animaux. La douleur liée à l'expérimentation sera limitée par l'utilisation systématique d'analgésiques. En outre, les responsables du projet ont été formés à l'utilisation des animaux à des fins scientifiques et garantissent de la formation et l'encadrement des autres expérimentateurs impliqués dans les procédures expérimentales.

Notre projet a donc pour but d'étudier spécifiquement les différentes thérapies anti-TNF et Jaki dans le traitement de l'arthrite afin de mieux comprendre leurs modes d'actions, leurs différences et ainsi de pouvoir comprendre les disparités de réponses chez l'humain. Ceci nous permettra d'envisager des tests de prédictions de réponse thérapeutique et offrir aux patients une médecine personnalisée.

19650 La pharmacologie de sécurité est un élément réglementaire incontournable dans le développement préclinique des médicaments. Avant les études cliniques de phase I, les effets du candidat médicament sur les « fonctions vitales » (systèmes cardiovasculaire, respiratoire et nerveux central) doivent d'abord être étudiés et caractérisés chez l'animal en respectant les bonnes pratiques de laboratoire (BPL). Une étude spécifique de la respiration doit être mise en place. Chaque étude de ce projet a pour but d'évaluer les effets de différents candidat-médicaments sur les paramètres respiratoires en utilisant la pléthysmographie de corps entier chez le rongeur vigile.

La pléthysmographie est une technique non-invasive permettant de mesurer la respiration d'animaux vigiles non-contraints, par mesure des variations de pression générées par les mouvements respiratoires d'un animal placé dans une enceinte ventilée.

Au cours de chaque étude, on administre aux animaux soit le candidat-médicament (testé à différentes doses), soit le véhicule qui a servi à préparer la formulation de la molécule testée soit un produit de référence.

Pour ce projet le nombre prévisionnel maximal d'animaux est de 2400 rats, 600 souris et 400 cobayes, soit un total de 3400 animaux sur 5 ans.

La conception de ce projet prend en compte la règle des 3R.

Remplacement : dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le rongeur car il n'existe pas de méthode de substitution (in vitro ou in silico) pour évaluer les effets d'une nouvelle molécule sur la respiration. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité, la toxicité et la pharmacocinétique d'un candidat médicament. A ce jour, les rats/souris et parfois cobayes sont les espèces qui sont les plus adaptées à ce type de modèle d'étude.

Réduction : Un nombre minimal et suffisant d'animaux par groupe est utilisé afin d'analyser de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et d'effectuer des analyses statistiques.

Raffinement : dans ce projet, le raffinement sera obtenu par :

- . le recours à une procédure non-invasive
- . le suivi d'éventuel signes cliniques
- . la détermination des points limites
- . le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire
- . En cas de chirurgie et période post-opératoire, un protocole analgésique adapté et un suivi post-opératoire de l'état de santé des animaux avec des soins et un enrichissement adaptés afin de permettre une bonne récupération des animaux
- . En cas de prélèvements sanguins, la réduction du volume prélevé grâce à l'amélioration de la sensibilité des méthodes d'analyse.

19651 L'ostéomésopycnose est une maladie très rare caractérisée par une masse osseuse élevée probablement due par un déséquilibre entre la formation et la résorption osseuse. C'est une maladie à transmission autosomique dominante mise en évidence à la radiographie chez de jeunes adultes présentant des douleurs, principalement au niveau du rachis ou de la hanche. Aucun gène responsable de la maladie n'a encore été identifié.

Un séquençage d'exome (ensemble des exons, parties codantes d'un gène) à partir de prélèvements de patients a été réalisé afin d'identifier des gènes responsables de cette maladie. Il a permis de mettre en évidence une mutation dans le gène X (les noms de la mutation et du gène resteront confidentiels). L'objectif de ce projet est d'étudier le phénotype des souris dans lesquelles la mutation identifiée a été induite, ce qui nous permettrait de mieux comprendre cette maladie et d'identifier les facteurs responsables de l'augmentation de la masse osseuse. En plus de mieux comprendre la physiopathologie de cette maladie rare, ces facteurs pourront devenir des cibles thérapeutiques dans des maladies osseuses dans lesquelles il y a cette fois une perte de masse osseuse telle que l'ostéoporose.

Le recours à l'animal dans ce projet est indispensable car nous souhaitons identifier dans un système biologique complet l'impact de la mutation du gène X.

Pour cela, nous étudierons dans un premier temps, l'effet de la mutation chez la souris sur le remodelage osseux.

Il sera nécessaire d'injecter des molécules fluorescentes (tétracycline et calcéine) permettant de visualiser la formation de l'os.

Un recueil d'urine sera effectué afin de doser des protéines qui reflètent la résorption osseuse.

Le jour de la mise à mort, une ponction cardiaque sera réalisée sur animal anesthésié afin de récupérer le sang pour les analyses sanguines, la ponction aboutira à la mort de l'animal. Différents échantillons seront également prélevés pour quantifier le taux de formation et de résorption osseuse.

Ces interventions sont réalisées dans le respect de la règle des 3R. Remplacement : Le recours à l'animal dans ce projet est indispensable car nous souhaitons identifier dans un système biologique complet un facteur responsable de l'augmentation de la masse osseuse.

Réduction : Les effectifs ont été ramenés au minimum permettant toutefois d'avoir un effet statistique significatif. La veille de la mise à mort, les organes non prélevés des animaux sauvages pour cette procédure seront proposés à d'autres expérimentateurs pour éviter la mise à mort

d'autres animaux. Raffinement : les procédures de ce projet sont toutes des procédures légères qui n'induisent aucune souffrance, ou minime. Néanmoins, pour veiller au respect du bien-être animal, les gestes d'injection et de ponction seront effectués par du personnel qualifié. Bien qu'aucune souffrance ne soit attendue, le poids des animaux sera surveillé afin de garantir leur bien-être. Leur comportement et leur interaction sociale seront surveillés afin de veiller au bien-être animal. En cas d'atteinte des points limites, telles qu'une perte de poids excessive ou la prostration, les animaux seront mis à mort afin d'éviter toute souffrance. Les animaux seront hébergés en présence d'enrichissement (maisonnette, tunnel, bâton à grignoter).

D'après des calculs statistiques, nous pensons utiliser au maximum 216 souris sur 4 ans pour l'ensemble de ce programme. Ce nombre a été déterminé par notre bio-informaticienne. Il sera nécessaire pour une puissance statistique suffisante et autorisera les tests de Mann-Whitney et Kruskal-Wallis.

19652 Les changements climatiques influencent l'environnement abiotique des espèces sauvages (comme la température ou la disponibilité en eau du milieu) mais également leur environnement biotique (présence de proies ou de prédateurs en particulier). Dans le contexte actuel, les modèles climatiques précisent un risque plus élevé de canicules et de sécheresses estivales dans nos régions tempérées et ces événements climatiques extrêmes peuvent avoir des conséquences écologiques à la fois directes (via la physiologie et le comportement de l'espèce) et indirectes, via la production primaire. Il est donc nécessaire d'étudier à la fois l'impact d'une restriction hydrique sur la physiologie et le comportement de ces animaux, mais aussi l'impact d'un manque de nourriture qui peut être le résultat d'un dérèglement climatique de l'écosystème. L'une des étapes majeures de la vie de nombreuses espèces vivipares étant la reproduction, il est souhaitable d'évaluer l'impact de cette double restriction sur des femelles adultes gestantes tant sur les caractéristiques de la gestation et de la reproduction que sur les caractéristiques et le devenir des juvéniles. Notre projet vise donc spécifiquement à décrire les conséquences d'une restriction hydrique et/ou nutritive lors de la gestation sur des femelles de lézards vivipares (*Zootoca vivipara* Jacquin) et sur leur descendance. La présence de cette espèce abondante en France dans les milieux froids et humides est fortement dépendante de la présence d'eau dans l'habitat et des ressources alimentaires. Dans un premier temps, on manipulera en laboratoire la disponibilité en eau de boisson (ad libitum ou en quantité restreinte) et la nourriture (ad libitum ou en quantité restreinte) pendant la durée de la gestation. Nous effectuerons un suivi des femelles (160 femelles réparties dans les 4 lots expérimentaux) au début, au milieu et à la fin de la gestation en quantifiant leur morphologie, des paramètres sanguins impliqués dans la gestion du stress et de la balance énergétique, et leur effort reproducteur. Dans un deuxième temps, nous quantifierons sans procédure expérimentale les effets intergénérationnels en mesurant les nouveaux-nés de manière non invasive au laboratoire puis, après marquage individuel, leur croissance et leur survie (à 2 mois puis à 1 an en 2022) dans des enclos semi-naturels (25 enclos avec environ 40 nouveaux-nés par enclos).

Dans les conditions de cette étude, il est impossible de remplacer le modèle biologique par un équivalent cellulaire ou non-vivant. Un échantillon important d'animaux sera utilisé pour quantifier les conséquences écophysiologiques et les effets intergénérationnels (160 femelles adultes) dans la mesure où ces animaux sauvages présentent une forte variabilité inter-individuelle, parce que les animaux seront divisés en quatre lots expérimentaux et du fait que nous effectuerons un suivi pendant une année en conditions semi-naturelles où la mortalité annuelle est identique à celle dans les populations sauvages. Ces effectifs ont été réduits au minimum par rapport aux 4 lots expérimentaux du projet et aux besoins du suivi longitudinal sur une année.

Afin de raffiner les protocoles, les animaux seront manipulés dans des conditions semi-naturelles proches de leur environnement sauvage pendant la quasi-totalité de l'expérience. En élevage, on raffinerait aussi les conditions d'élevage grâce à un enrichissement des cages et à l'utilisation de conditions climatiques optimales.

19653 Mots clés :

Diabète, malnutrition, fonction cardiaque, syndrome métabolique

Finalité du projet :

Comprendre le rôle d'une cible pour mettre au point de nouveaux médicaments pour améliorer la fonction cardiaque des patients diabétiques

Objectifs et bénéfices escomptés :

Le diabète est en pleine expansion dans notre société. Or le diabète entraîne très souvent des complications cardiaques avec notamment l'apparition d'un mauvais fonctionnement du cœur, appelé cardiopathie diabétique, et pouvant mener à l'insuffisance cardiaque. Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans cette dysfonction représente un challenge important pour les chercheurs et les cliniciens afin d'améliorer la qualité de vie des patients.

Les résultats de notre projet pourront permettre à court terme de déterminer le rôle d'une cible appelée EPAC1, déjà impliquée dans l'infarctus du myocarde. A plus long terme, notre étude vise à développer de nouveaux médicaments visant EPAC1 pour rétablir une bonne contraction du cœur chez les patients atteints de diabètes.

Nuisances prévues :

Nous avons précédemment mis au point un modèle de souris diabétiques qui présentent le même dysfonctionnement du cœur que les patients diabétiques. Des animaux avec ou sans la cible EPAC1 seront soumis à une diète riche en sucre et en gras, pour mimer une nourriture pro-diabétique, pendant 4 mois et ce, dans 3 procédures. La procédure 1 permettra de suivre l'évolution du diabète par deux tests de tolérance au glucose et à l'insuline (à 2 et 4 mois), comme réalisés chez les patients, ainsi qu'une échocardiographie sous anesthésie gazeuse, avant l'euthanasie pour analyse du diabète dans le cœur et le foie. La procédure 2 comportera une étape de chirurgie (sous anesthésie gazeuse) 1 semaine avant l'euthanasie à 4 mois pour permettre l'analyse de la bonne contraction des cellules du cœur après isolation. Enfin, la procédure 3 consistera en une analyse finale par récupération des cellules du foie pour voir l'effet du diabète sur la fonction du foie.

Une prise de poids aura lieu dans les souris sous régime riche. Toutefois, cela n'empêche pas leur mobilité.

Règles des 3R :

Remplacement : Notre projet ayant pour but d'étudier la cardiopathie diabétique impliquant un mauvais fonctionnement contractile du cœur, le recours à l'expérimentation animale est nécessaire. Toutefois, des analyses sur cellules isolées de cœur et de foie permettront de limiter le nombre d'animaux.

Réduction : Le nombre d'animaux par procédure a été calculé à l'aide d'un logiciel de statistiques afin de déterminer le plus précisément possible le nombre minimal d'animaux permettant d'obtenir des résultats statistiquement exploitables, soit au maximum 160 animaux sur 5 ans. Par ailleurs, les prélèvements d'organes foie et cœur ont été mutualisés sur chaque procédure afin de limiter le nombre d'animaux utilisés.

Raffinement : Dans le but d'améliorer le bien-être des animaux et ce, dès leur arrivée dans notre animalerie, un enrichissement de milieu est mis en place et renouvelé très régulièrement. De plus, afin de supprimer la souffrance et la douleur, les injections sont réalisées sous prémédication analgésique et anesthésique local. Par ailleurs, des points limites et critères d'arrêt adaptés à chaque procédure ont été définis.

19654 Les vaisseaux sanguins permettent l'oxygénation et la nutrition des organes. Leur formation (l'angiogenèse) joue un rôle clé au cours de la croissance mais s'arrête à l'âge adulte, sauf au cours du cycle ovarien ou de la grossesse. Elle peut cependant être réactivée dans diverses conditions pathologiques : le cancer, dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), certaines maladies génétiques touchant l'architecture du réseau sanguin. C'est le cas de la maladie de Rendu-Osler, dont les mécanismes de développement sont encore mal connus. L'une des complications graves de cette maladie est l'apparition de malformations artérioveineuses (MAVs) dans lesquelles les

artères et les veines sont directement en contact sans passer par un lit capillaire, ce qui fragilise les vaisseaux. Les mutations responsables de la maladie de Rendu-Osler touchent un gène codant un récepteur cellulaire (ALK1) essentiel au développement des vaisseaux et qui est normalement activé par les protéines BMP9 et BMP10. Notre étude vise à déterminer les fonctions respectives de chacune de ces protéines dans le développement des vaisseaux et si leur perte peut conduire à la formation de MAVs similaires à celles observées dans la maladie de Rendu-Osler.

Etant donné la spécificité par organe des signaux impliqués dans la quiescence endothéliale, et les interactions entre les différents types cellulaires qui composent les vaisseaux sanguins et les tissus, il n'est actuellement pas possible de reproduire la pathologie dans des modèles *in vitro*. Le recours à l'expérimentation animale est le seul modèle possible pour mieux comprendre la pathologie et ainsi trouver des cibles thérapeutiques innovantes. Des souris transgéniques déficientes en BMP9, ou en BMP10, ou doublement déficientes ont été générées. Nous n'attendons pas de phénotype dommageable dans ces souris. Cependant, elles seront suivies quotidiennement et si des signes de douleur sont constatés l'expérience sera interrompue. Ces modèles animaux permettront d'étudier l'angiogenèse dans différents tissus de l'organisme : la rétine, où elle est très bien caractérisée et des organes très vascularisés en croissance (poumons, foie, cœur, cerveau).

Les animaux sont nés et ont été élevés dans un établissement agréé. L'étude inclut le nombre d'animaux nécessaires, mais suffisants pour répondre aux exigences d'un test statistique qui sera appliqué pour chaque paramètre qui sera observé. Sur chaque animal, les rétines, les poumons, le cœur et le foie seront prélevés après euthanasie et permettront (1) une visualisation du système vasculaire globale par des techniques de microscopie (2) des analyses d'expression de gènes et de protéines suite à l'inactivation de BMP9 et/ou BMP10. Une autre procédure ciblera spécifiquement la formation des MAVs qui seront recherchées. Aucun prélèvement ne sera effectué sur animal non euthanasié. Le nombre d'animaux par groupe a été déterminé sur la base des données de la littérature, conduisant à un nombre total de 636 animaux. Chaque groupe d'animal pourra servir à plusieurs prélèvements chaque fois que cela est possible. Des points limites ont été mis en place et les procédures sont réalisées sous anesthésie.

Les animaux sont hébergés en groupe dans un environnement enrichi.

L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et des critères d'arrêt ont été définis afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus, pour lesquels il sera décidé de mettre en œuvre une euthanasie.

19655 Pour vivre, un reptile a besoin de maintenir sa température corporelle dans une gamme propre à l'espèce (en fonction de ses habitudes écologiques) et au statut biologique de l'animal (gestion, digestion, croissance...). Étant physiologiquement incapable de produire sa propre chaleur corporelle, le reptile dépend de la température de son environnement extérieur pour réguler sa température. Dans le cas des reptiles nocturnes vivant sous le couvert végétal en milieu tropical, ayant donc peu d'opportunité d'exposition au soleil, cela pose beaucoup de questions quant à leurs besoins physiologiques et aux stratégies comportementales pour la régulation de leur température. Comme accéder à sa température moyenne préférée est vital pour un reptile, la compréhension des besoins thermiques d'une espèce est un élément clef dans le contexte du maintien en parcs zoologiques (à but conservatoire, scientifique ou pédagogique) afin d'optimiser les conditions de vie des individus. Le manque de données de terrain fait qu'en captivité les conditions environnementales sont souvent basées sur des habitudes empiriques mais trop rarement fondées sur une réelle compréhension des habitudes écologiques de l'espèce.

Le Boa des jardins (*Corallus hortulanus*) est certainement l'espèce de Boidés arboricole la plus répandue de la forêt tropicale Sud-américaine. C'est une espèce forestière et nocturne qui vit dans les strates arbustives et arborées et dont l'aire de répartition s'étend dans tous le bassin amazonien. Bien que cette espèce soit relativement commune, aucune étude précise n'a porté sur les déplacements, l'utilisation des microhabitats et le comportement de thermorégulation de cette espèce.

L'objectif de cette étude est de suivre par radiopistage 5 individus de *Corallus hortulanus* et de décrire les caractéristiques biologiques des animaux (évolution de la température corporelle), les caractéristiques de l'environnement dans lequel ils évoluent (température ambiante, hygrométrie...) ainsi que d'obtenir des données éco-éthologiques (micro-habitat, domaine vital, comportement) permettant de comprendre des modalités de thermorégulation d'un boïdé arboricole et nocturne de milieu tropical, ce qui n'a jamais été étudié. Par analogie, les données récoltées permettront d'avoir des pistes de compréhension du mode de vie de l'autre boa arboricole emblématique de la forêt tropicale : le Boa canin (*Corallus caninus*). Cette espèce est très discrète et difficile à observer dans la nature mais se rencontre dans les mêmes environnements que le Boa des jardins. Elle est réputée pour être sensible et fragile en captivité. Les succès de reproduction de cette espèce en captivité sont relativement peu fréquents et il déclare souvent des pathologies respiratoires et digestives. Le Boa des jardins quant à lui est plus robuste en captivité, cependant bien qu'étant peut-être plus tolérant à de potentiels écarts entre les conditions captives et les conditions naturelles il n'est pas exclu que cette espèce soit souvent maintenues dans des conditions suboptimales. La compréhension de l'évolution journalière et saisonnière de la température interne ainsi que de l'utilisation de l'habitat du Boa des jardins permettra d'améliorer les conditions de vie en captivité de cette espèce et par analogie d'autres espèces occupant une niche écologique proche dans le même habitat.

Pour réduire le nombre d'individus seules 5 femelles adultes seront suivies, ceci permettant de décrire la variabilité inter-individuelle tout en minimisant le nombre d'individus.

La fixation externe d'un émetteur radio étant techniquement actuellement peu efficace chez les serpents (expérience personnelle) l'implantation d'un émetteur dans la cavité générale de l'animal est la solution retenue. Le raffinement des procédures est réalisé par l'utilisation d'analgésiques (butorphanol + meloxicam) et d'anesthésique (alfaxalone + médétomidine) lors de l'implantation des émetteurs et le choix d'émetteurs de petite taille. Enfin chaque individu sera suivi pendant l'intégralité de la procédure, jusqu'à son réveil et son retour dans le milieu naturel. Les individus seront capturés manuellement dans une zone de 20km maximum autour de la ville où sera effectuée l'implantation des émetteurs afin de faciliter le suivi. Les animaux seront conditionnés individuellement dans des sacs en toile respirante et transportés en voiture dans une caisse isotherme jusqu'au cabinet vétérinaire où sera réalisée l'implantation de l'émetteur. Celle-ci sera effectuée dans la cavité générale sous anesthésie générale et analgésie par un vétérinaire en salle de chirurgie. L'intervention chirurgicale durera environ 1 heure pour chaque individu (anesthésie, opération et reprise de tonicité). La masse de l'émetteur (5. 3g) représentera au maximum 5 % de la masse corporelle des individus ce qui correspond aux recommandations réglementaires pour les reptiles. Chaque individu sera maintenu en observation 24h, avant d'être relâché sur le site de capture. La durée du suivi sera d'environ 10 mois. A la fin du suivi les individus seront recapturés et les émetteurs retirés puis les animaux seront relâchés à l'endroit de leur dernière capture.

19656 Les cancers représentent en France la première cause de décès prématuré avant 65 ans chez l'homme et la deuxième chez la femme constituant un problème majeur de santé publique avec 382 000 nouveaux cas estimés en 2018. Pour comprendre le fonctionnement complexe de la cellule cancéreuse et faire ainsi progresser la prévention, le diagnostic et le traitement des cancers, il est indispensable de disposer de modèles intégrés animaux proches de l'Homme, permettant d'évaluer in vivo l'interaction de ces cellules avec leur environnement. Les souris représentent ainsi un modèle de choix pour les études menées en cancérologie.

Notre projet consiste à proposer aux chercheurs quatre approches basées sur Les Technologies de Reproduction Assistées (ART) :

- 1) proposer des lignées murines déjà existantes dans la communauté scientifique qui soient compatibles avec le standard sanitaire de nos animaleries. Pour cela, une décontamination par transfert d'embryons dans une souris femelle 'propre' est parfois requise
- 2) proposer une cryopréservation de lignées murines afin de se prémunir d'une perte lors d'un accident en tout genre (technique, catastrophe naturelle, pandémie...) de celles-ci car souvent

précieuses et parfois uniques et/ou d'éviter la production de souris non utilisées dans une étude active.

3) proposer une création de lignée et/ou production de cohorte par l'intermédiaire de la mise en œuvre d'une Fécondation In Vitro

4) proposer à nos chercheurs un « sauvetage » de lignées lors de reproduction naturelle défailante grâce à la technique de fécondation in vitro.

Nous prévoyons pour les 3 années à venir d'utiliser 2 040 souris.

Remplacement : Les cancers sont caractérisés par des altérations portant sur de nombreux gènes. Après une première étape d'analyses à partir de banques de données humaines et de données de cellules in vitro, le recours à la souris génétiquement modifiée permet de comprendre le rôle de ces gènes au niveau d'un organisme entier.

Réduction : Notre expertise nous permet d'avoir d'excellents résultats et donc de minimiser le nombre d'animaux requis.

Raffinement : Dans un souci de raffinement, toutes les mesures seront prises pour éviter le stress et la douleur des animaux. Ainsi, les gestes techniques sont assurés par du personnel qualifié, avec une prise en charge de la douleur en constante évolution lors des procédures chirurgicales.

19657 Les produits de santé (médicaments, dispositifs médicaux, etc.) constituent un élément clé dans la dispensation de soins de qualité aux patients. En effet, en alliant innovation et santé, la recherche et le développement s'avèrent indispensables pour favoriser le progrès médical et l'accès aux meilleurs soins à tous.

Or, par nature, ils sont destinés à être mis en contact avec le corps humain et peuvent donc entraîner des effets secondaires au niveau du site d'implantation: des dégradations importantes des tissus environnants peuvent nécessiter une ré-intervention chirurgicale. Des séquelles fonctionnelles peuvent en résulter dans les cas les plus graves. L'innocuité des produits de santé doit donc être testée pour garantir le bon rétablissement des patients après chirurgie. Par ailleurs, tout produit de santé se doit d'être efficace lors de son utilisation clinique.

Il est donc impératif, comme le souligne la réglementation (ex : ISO 10993, Pharmacopées Nationales, lignes directrices (OCDE), directive 2007/47/CE), de prouver l'efficacité des produits de santé et de réduire au minimum le risque que des réactions indésirables se manifestent avant de proposer un produit sur le marché. Nous sommes fortement engagés dans le développement de méthodes alternatives in vitro : tests de cytotoxicité, test d'irritation in vitro, test de sensibilisation in vitro, modélisation sur cultures tissulaires et analyse mathématique du risque de toxicité. Cependant, les méthodes alternatives existantes à ce jour ne permettent ni de couvrir l'ensemble des risques toxiques incombant aux produits de santé ni d'en tester intégralement l'efficacité, en particulier en raison de la complexité des mécanismes de régulation d'un organisme vivant. L'utilisation d'animaux est alors obligatoire pour y parvenir. Lorsque la législation et les normes en vigueur imposent de s'assurer de la sécurité et des performances des produits de santé sur des modèles animaux, les rongeurs et les porcins sont des modèles privilégiés pour ce type d'étude étant donné les similitudes reconnues avec l'organisme humain.

Dans ce projet, il s'agit principalement d'évaluer la performance et/ou la tolérance locale de produits de santé utilisés en diabétologie. Le diabète est un problème de santé majeur touchant dans le monde déjà 422 millions de personnes en 2014 (OMS). Le diabète de type 1 représente environ 10% des cas de diabète recensés en France et dans le monde, de plus sa prévalence et son incidence ne cessent d'augmenter chaque année (3-4 %). Il est estimé que la moitié des cas de diabète de type 1 se déclarent avant l'âge de 20 ans et nécessite des prises en charges contraignantes pour les patients. Il est donc important d'élaborer de nouvelles technologies innovantes (Inserm). Lorsque la législation et les normes en vigueur imposent de s'en assurer sur des modèles animaux, les rongeurs et les porcins sont les modèles privilégiés étant donné leurs similitudes reconnues avec l'homme.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est basé sur les recommandations des textes de référence (ex : norme ISO 10993) et sur les contraintes scientifiques (ex : nombre suffisant d'animaux pour assurer la validation scientifique des études). Dès que cela n'impacte pas la santé ni le bien-être de l'animal, l'utilisation d'un même animal est optimisée de sorte à réduire le nombre total d'animaux utilisés (réutilisation d'un même animal après une période de repos ou optimisation du nombre de sites étudiés sur un même animal). L'estimation maximale du nombre d'animaux utilisés sur les cinq années du projet est de 1000 rats, 1000 souris, 150 porcins, soit un total de 2150 animaux.

Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. Quelles que soient les études la douleur est rigoureusement contrôlée (suivi quotidien des signes de douleur par un personnel formé) et proscrite grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (ex : anesthésie/analgésie). Le personnel impliqué dans le suivi des animaux met tout en oeuvre pour diminuer au maximum toute angoisse ou stress des animaux (ex: habitude aux actes techniques, renforcement positif des interactions entre les opérateurs et les animaux. . .).

Les rongeurs et porcins sont hébergés en groupes sociaux harmonieux sauf lorsque les contraintes de l'étude l'empêchent. Dans tous les cas, pour toutes les espèces sociales, l'hébergement individuel devra être justifié scientifiquement et validé par la structure du bien-être animal. Des enrichissements standards spécifiques à chaque espèce (bâton à ronger pour les rongeurs, jouets pour les porcins) sont présents dans les hébergements. Enfin, de la musique est diffusée en salle d'hébergement.

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

19658 - Le projet actuel rentre dans le cadre d'une recherche principalement préclinique avec une partie dédiée à la recherche fondamentale. Cette étude se déroulera principalement autour de trois axes de recherche : l'épilepsie, la fonction respiratoire et la sérotonine (plus spécifiquement le récepteur sérotoninergique 2C).

- La Mort Soudaine Inattendue en Epilepsie (MSIE) est une issue qui touche chaque année 0,5% des patients épileptiques. La MSIE a souvent lieu après une crise épileptique induisant une longue apnée (arrêt respiratoire) qui aboutit à l'arrêt cardiaque puis au décès du patient. Une étude menée en post-mortem chez des victimes de MSIE a montré une altération du système sérotoninergique. La sérotonine (5-HT) étant un neurotransmetteur libéré dans le cerveau et fortement impliqué dans la régulation des neurones situés dans la partie postérieure du cerveau appelée : tronc cérébral et responsables du contrôle de la respiration. Il n'existe à ce jour aucun marqueur biologique fiable qui permet de prédire la MSIE chez le patient épileptique, ce qui limite les études qui pourraient être menées chez le patient et qui permettraient de comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués dans ce type de décès. A15+A13 Ainsi et dans le cadre de la prévention contre la MSIE, il est aujourd'hui primordial d'identifier les mécanismes neurobiologiques qui sont impliqués dans la survenue du dysfonctionnement respiratoire lié à l'épilepsie, en ayant recours aux modèles expérimentaux chez l'animal.

- Pour cette étude, notre choix s'est porté sur le modèle d'épilepsie chez le rat induit par la pilocarpine. Ce choix de modèle est justifié par les caractéristiques communes qui existent entre le modèle d'épilepsie chez le rat et celle de l'épilepsie chez l'homme qui sont détaillées ci-après :

1- La présence de crises épileptiques après l'induction d'un status epilepticus (une longue crise épileptique) par la pilocarpine.

2- La présence chez 40% des rats épileptiques d'altérations respiratoires.

3- Les rats épileptiques qui souffrent d'altérations respiratoires présentent comme chez le patient épileptique, des altérations du système 5-HTergique. Parmi l'ensemble des altérations 5-HTergique qui sont associés aux altérations respiratoires, seule celle du récepteur sérotoninergique 2C (5-HT_{2c}R) se maintient au cours du temps chez le rat épileptique suggérant la possibilité de l'implication de ce récepteur dans l'apparition du dysfonctionnement respiratoire.

4- Par les similitudes anatomiques entre les cerveaux du rat et de l'Homme, nous souhaitons enregistrer en simultané la fonction respiratoire et l'activité électroencéphalographique dans l'hippocampe et le cortex qui sont deux régions cérébrales dont l'activité épileptique est présente lors de l'épilepsie.

5- L'absence de mortalité liée aux altérations respiratoires est un grand avantage dans le modèle de rat pilocarpine. Cela permet d'investiguer l'interaction entre le 5-HT_{2c}R et la respiration chez des rats qui souffrent d'épilepsie chronique comme dans le cas des victimes MSIE.

Dans ce projet nous souhaitons caractériser le rôle fonctionnel du récepteur 5-HT_{2c}R et son implication dans la survenue des altérations respiratoires liées à l'épilepsie. Il comportera deux procédures expérimentales afin de répondre à deux objectifs principaux :

(1) Caractériser les populations cellulaires sujettes aux variations d'expression du récepteur 5-HT_{2c}R dans le tronc cérébral de rats épileptiques présentant des altérations respiratoires.

(2) Identifier par une approche pharmacologique, utilisant un agoniste et un antagoniste spécifiques du récepteur 5-HT_{2c}, le rôle fonctionnel joué par ce récepteur dans la présence des altérations respiratoires chez les rats épileptiques.

A l'issue de ce projet, nous pourrions mieux comprendre le rôle de ce récepteur dans la survenue d'altérations respiratoires liées à l'épilepsie. Le cas échéant, ce récepteur pourrait constituer une cible pharmacologique pertinente pour prévenir l'apnée fatale chez le patient épileptique victime de MSIE.

Notre engagement vis à vis des exigences des 3 R :

Remplacement : l'enregistrement simultané intra-cérébral et l'utilisation d'un protocole d'administration de plusieurs substances pharmacologiques rendent ces expériences non envisageables chez le sujet humain. L'étude des rythmes cérébraux et respiratoires au cours ou en dehors d'une crise épileptique nécessitent l'utilisation d'animaux vivants et ne peut s'envisager sur des modèles *in vitro*. Le rat est aujourd'hui la seule espèce dans laquelle ont été caractérisés des troubles respiratoires associés à l'épilepsie.

Réduction du nombre d'animaux : pour mener ce projet, nous aurons besoin d'utiliser 320 rats pendant une durée de 4 ans. Ce nombre a été réduit au maximum en nous basant sur les données bibliographiques antérieures et permettant de réaliser des analyses statistiques.

Raffinement : Pour évaluer la respiration de façon non-invasive nous utiliserons deux techniques : la thermochimie et la pléthysmographie. Des expériences préliminaires montrent que la pléthysmographie est complémentaire à la thermochimie qui permet d'enregistrer sur une plus longue période permettant d'identifier les altérations respiratoires dès l'apparition de l'épilepsie chez le rat. Seule la thermochimie sera menée sur le site 1 où se situe l'appareillage. Autrement les expériences seront effectuées à l'animalerie un second site (site 2). Pour limiter le stress lié au changement de site, les animaux seront : transportés dans des cages adaptées (couvercle avec filtre, linge opaque pour couvrir les cages), acclimatés à 3 par cage pendant 7 jours avant toute expérimentation. L'induction de l'épilepsie par la pilocarpine est une procédure sévère nécessitant un suivi accru de l'état général des animaux en se référant à une grille de score établie pour déterminer le degré de souffrance des animaux. L'acte d'implantation chirurgicale d'électrodes pour les enregistrements électro-encéphalographiques sera réalisé sous anesthésie et analgésie. En post-chirurgie, les rats seront surveillés pluri-quotidiennement jusqu'à récupération, en se référant à la grille de scores établis pour définir l'état de bien être des animaux. Toutes les mesures seront prises pour limiter la souffrance et la douleur des animaux. L'expérience sera stoppée si les points limites définies dans la grille de score sont atteints. A la fin de chaque procédure expérimentale, les rats sédatisés seront mis à mort.

19659 Contexte scientifique et objectifs de l'étude :

Cette action est l'un des volets d'un projet de recherche d'envergure qui vise une étude de l'effet d'une espèce non-indigène envahissante, le silure glane, sur des populations de poissons indigènes sensibles, les migrateurs amphihalins du bassin de la Loire.

La majeure partie de ce projet de recherche (in natura) a déjà été autorisée par le ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (APAFIS#28855-2021030816211708v1, du 12 mars 2021). Cette demande correspond à la partie qui aura lieu en laboratoire.

L'une des questions majeures dans l'étude et la gestion de cette espèce envahissante est la quantité de poissons indigènes ingurgitée par silure et par année. Cette question est centrale et n'a jamais été résolue de manière claire en milieu naturel. Il est donc impératif de répondre à cette question avant d'imaginer des mesures de gestion.

Pour répondre à cette question, des silures en milieu naturel seront équipés de capteurs d'accélération corporelle individuelle. Les données seront récupérées en temps réel sur la zone. Cette partie est hors champs de cette DAP et a déjà bénéficié d'une autorisation du ministère.

Cette partie permettra d'obtenir les données individuelles d'accélération corporelle des silures en milieu naturel pendant quasiment un an.

Concernant la partie en laboratoire :

Vingt silures seront prélevés dans le milieu naturel par les fédérations de pêches locales sur le site d'étude, avec le matériel le moins traumatisant possible (cordée d'hameçons). Deux relèves auront lieu chaque jour. Les individus seront ensuite transférés dans notre animalerie expérimentale avec un véhicule agréé. Ce service sera effectué par des pêcheurs professionnels habitués à ce genre de déplacement (ils interviennent par exemple sur les pêches de sauvegarde sur toute la façade Bretonne et Atlantique). Une fois à l'animalerie, ils seront stabulés en observation pendant 2 semaines, nourris quotidiennement avec des aliments spécifiques pour les siluridés en aquaculture (CatFish T, le Gouessant aquaculture (c)).

Après deux semaines d'adaptation, les silures seront implantés avec une marque acoustique avec capteur d'accélération dans la cavité intrapéritonéale, la même que pour les silures en milieu naturel, puis placés dans un tunnel de nage de type Blazka de 125 litres. Ils seront soumis à des tests d'effort en faisant varier le courant dans les tunnels de 0 (poisson à l'arrêt) à environ 1 longueur de corps / sec. Cette vitesse est considérée comme la vitesse de déplacement de croisière pour la plupart des espèces de poissons. Leurs consommations en oxygène sera mesurée en permanence avec une sonde à oxygène qui mesure précisément en temps réel la concentration d'oxygène dans les tunnels. Il sera alors possible de faire le lien entre les différentes valeurs d'accélération corporelle individuelle et la quantité d'oxygène consommée. Ensuite, le lien entre quantité d'oxygène consommée et quantité de matière grasse nécessaire pour brûler cet oxygène étant parfaitement connu, il sera alors possible de connaître le lien entre accélération corporelle individuelle et quantité de matière grasse brûlée. En reprenant les valeurs d'accélération corporelle individuelle obtenue en milieu naturel, il sera alors possible d'obtenir un proxy de la quantité de poisson consommée par silure et par année.

A la fin de l'expérimentation, les silures seront replacés dans leur milieu naturel, à l'endroit exact de leur capture.

Balance dommages/bénéfice :

Le nombre total d'animaux utilisés dans le cadre de ce projet sera de 20 animaux. Aucun silure ne sera sacrifié. Tous les poissons étudiés seront relâchés dans le milieu naturel, et notre expérience et les nombreuses études dans le domaine ont montré que les taux de mortalité post-opératoire sur ces espèces étaient quasiment nuls.

Conformité avec la règle des 3 R :

Cette étude vise à étudier l'impact d'une espèce prédatrice sur d'autres espèces. Il faut donc travailler sur des individus sauvages, en milieu naturel. Il est donc impossible de les remplacer.

Nous avons déterminé la taille minimale des échantillons de chaque espèce en fonction des études précédentes, et du minimum requis pour pouvoir avoir des données fiables et robustes sur lesquelles nous pourrions nous appuyer.

Enfin, absolument toutes les mesures nécessaires seront prises afin de limiter au maximum la douleur et le stress chez nos individus, ce qui de toute façon compromettrait énormément cette étude comportementale. Une attention toute particulière sera aussi apportée à la prophylaxie afin

d'éviter des pertes prématurées d'individus étudiés. Aucune mortalité n'a jamais été observée dans toutes les études précédentes avec la même méthodologie.

19660 Une dérégulation du système immunitaire avec une activation préférentielle des lymphocytes T effecteurs (Teffs) contre des cellules de son propre organisme, couplée à un défaut en nombre ou en fonction des lymphocytes T régulateurs (Tregs) est à l'origine de certaines maladies auto-immunes (MAI). Les Tregs sont des acteurs essentiels de la tolérance immunitaire car ils permettent de contrôler l'auto-immunité et l'inflammation en général. L'interleukine-2 à faible dose (IL-2fd) est un traitement qui a montré son efficacité dans les MAI à la fois dans les modèles animaux comme chez l'homme. En effet l'IL-2 agit en stimulant les Tregs. Néanmoins, une des limites du traitement par IL-2fd dans les MAI est sa demi-vie très courte et donc la nécessité de répéter les cures d'IL-2 chez le patient de façon chronique.

L'IL-2, si elle est employée à trop forte dose peut également activer les Teffs et donc contrebalancer son effet bénéfique sur les Tregs. Il semble donc important d'optimiser l'activation spécifique des Tregs par l'IL-2 et de limiter son action sur les Teffs dans le cadre de maladies inflammatoires et auto-immunes.

Dans 4 axes de recherche différents, notre laboratoire cherche à améliorer les fonctions de l'IL-2 afin d'augmenter son bénéfice dans le traitement des MAI tout en tentant de diminuer ses effets indésirables liés à ses deux principaux inconvénients cités plus haut (faible demi-vie et activation des Teffs à plus forte dose). Dans le 1er axe nous allons étudier des IL-2 modifiées (IL-2m) qui seront plus spécifiques des Tregs et auront moins d'activité sur les Teffs. Dans un 2e axe du projet, nous souhaiterions associer différentes molécules conventionnelles à l'IL-2 afin de réduire la fréquence d'administration et améliorer l'efficacité thérapeutique de ces traitements par synergie de leurs mécanismes d'action. Dans le 3e axe de recherche, nous allons étudier les relations entre IL-2, microbiote et système immunitaire. En effet nous savons que chacun de ces 3 acteurs influe sur les 2 autres mais la relation globale entre les 3 est méconnue. Cet axe, plus théorique que les 2 précédents dans un premier temps, pourra néanmoins ouvrir des perspectives de thérapie par greffe de microbiote dans les MAI. Finalement, dans un 4e axe, nous allons modifier génétiquement des Tregs pour qu'ils puissent fabriquer eux-mêmes l'IL-2 dont ils dépendent pour leur survie et leur activité ; nous parlerons de « Super-Tregs ». En effet, à l'état naturel l'IL-2 utilisée par les Tregs est essentiellement fournie par les Teffs.... Nous espérons ainsi optimiser le mécanisme d'activation des Tregs par l'IL-2 et ainsi élaborer des traitements efficaces et sans dangers pour les patients atteints de certaines MAI.

Ce projet va nécessiter l'utilisation de 2497 animaux au total. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur le principe de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ».

Remplacement. Afin de répondre au critère de remplacement dès que cela est possible dans nos études, les nouvelles molécules tout comme les SuperTregs seront testés au préalable dans des expériences in-vitro. Les combo-thérapies entre molécules conventionnelles et IL-2fd seront établies en fonction de notre expertise passée sur les traitements IL-2fd et les connaissances bibliographiques et médicales sur les molécules conventionnelles.

Réduction. Le nombre utiles au projet a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal et tenant compte de l'effectif minimal pour atteindre une puissance statistique suffisante. De plus, dès que cela sera possible, les animaux seront réutilisés dans différentes procédures. Ainsi plus de 800 animaux pourront être utilisés dans plusieurs procédures du projet.

Raffinement. Par ailleurs, dans tous nos protocoles nous veillerons à raffiner au mieux nos expériences en diminuant systématiquement les contraintes et la douleur qui peuvent être liées à la mise en œuvre expérimentale, notamment par une période d'habituation systématique avant expérimentation, un hébergement amélioré, des points d'arrêt anticipés et le recours à des anesthésie et analgésie pour limiter la douleur.

19661 Intitulé du projet : Finalisation d'une étude d'un nouvel antagoniste du récepteur H2 de l'histamine sur le sommeil chez le chat

Durée du projet : 5 ans

Finalité du projet : Recherche fondamentale et translationnelle

Mots-clés : éveil, sommeil, histamine, pharmacologie, qualité de sommeil.

Objectifs et bénéfices escomptés du projet

L'être humain est soumis à l'alternance du cycle veille-sommeil. L'éveil est un état permettant la réalisation d'activités vitales et cognitives. Durant l'éveil le cerveau reçoit des informations internes et externes et les analyse pour y répondre de manière adaptée. Inversement le sommeil lent est un état comportemental de repos, permettant à l'organisme d'assurer la récupération physique et fonctionnelle dans des conditions de dépense énergétique minimale. Notre équipe s'intéresse depuis de nombreuses années à l'histamine qui est l'un des neurotransmetteurs majeurs de l'éveil. Les neurones à histamine sont localisés dans une région située sous l'hypothalamus postérieur et émettent des prolongements dans l'ensemble du cerveau. Il existe plusieurs récepteurs à l'histamine, dénommés H1, H2 et H3. Suivant le type de récepteur et sa localisation, l'histamine libérée au cours de l'éveil va avoir des effets activateurs sur ses récepteurs cibles ou inhibiteurs sur ses récepteurs d'autorégulation. Afin de mieux comprendre les mécanismes de déclenchement et de maintien de l'éveil il est important d'identifier précisément l'action de l'histamine sur ces différents récepteurs. Ceci est rendu possible par l'utilisation d'antagonistes c'est-à-dire des molécules qui vont bloquer sélectivement l'un de ces récepteurs.

A l'inverse des récepteurs H1 et H3 dont le rôle sur le sommeil est bien démontré, celui des récepteurs H2 reste peu connu. Dans le cadre d'une autorisation précédente, nous avons obtenu une amélioration du sommeil lent à l'aide d'une nouvelle molécule ciblant spécifiquement ce type de récepteurs, l'effet restant néanmoins à être confirmé statistiquement en raison d'un petit échantillon (n=3). Cette molécule a récemment obtenu un statut « cliniquement approprié » après une série de tests démontrant son innocuité aigue et chronique chez les animaux. Notre étude nécessite donc aujourd'hui des expériences complémentaires sur un nombre réduit d'animaux afin de compléter et confirmer nos premiers résultats. Ce projet va non seulement permettre de mieux comprendre le rôle des récepteurs H2 dans la régulation de l'éveil et du sommeil mais aussi constituer une étape cruciale dans le développement d'une nouvelle piste thérapeutique pour traiter les troubles de l'éveil et du sommeil en lien avec le stress.

Nuisances prévues

A la suite de nos précédentes expériences, nous allons réaliser une analyse quantitative et qualitative du sommeil grâce à des enregistrements polysomnographiques par microélectrodes (électroencéphalogramme (EEG) électromyogramme (EMG)). En plus de l'observation de signes comportementaux, les signaux EEG, EMG sont nécessaires pour caractériser et quantifier les différents stades d'éveil et de sommeil. Les enregistrements seront d'abord menés en condition témoin sans intervention aux fins de référence, puis après administration par voie orale de l'antagoniste H2.

L'implantation des microélectrodes est réalisée sous anesthésie générale profonde avec de puissants antalgiques supprimant toute douleur pendant et après l'intervention. Les animaux récupèrent très rapidement de cette opération et présentent un comportement normal et un cycle veille-sommeil conforme. Il s'agit d'une procédure de gravité modérée pendant laquelle les animaux bénéficient d'un suivi quotidien pour assurer leur bien-être.

L'espèce choisie est le chat qui possède un cycle veille-sommeil très proche de celui de l'Homme avec notamment des stades de sommeil lent léger et profond et de sommeil paradoxal. La propension du chat à dormir en fait un sujet expérimental idéal pour la recherche sur les mécanismes du sommeil. Les connaissances actuelles, les théories et hypothèses contemporaines sur le contrôle du cycle veille-sommeil ont été largement fondées sur les données obtenues chez le chat, d'où son utilisation répandue dans cette recherche. Nous prévoyons d'utiliser au maximum trois chats pour finaliser cette étude. Nous procéderons de façon séquentielle et évaluerons les résultats obtenus sur les deux premiers individus avant de poursuivre, si nécessaire, avec le

troisième. Le projet sera terminé une fois l'ensemble des résultats collectés et les animaux surnuméraires pourront alors être replacés. A l'issue de la procédure les animaux déjà implantés pourront être soit réutilisés dans une autre étude après avis vétérinaire et nouvelle évaluation éthique, soit être désimplantés et replacés.

Application de la règle des « trois R »

Remplacement : A ce jour il n'existe pas d'alternative non animale pour étudier le sommeil. Les mammifères comme le chat sont les seuls animaux possédant un EEG aussi riche que l'EEG humain et un cycle veille/sommeil/rêve à la fois le plus proche de celui de l'homme et le mieux caractérisé. Sans le modèle chat, la mise au point des deux seuls médicaments éveillants disponibles aujourd'hui en médecine du sommeil n'aurait pas été possible : le modafinil et le pitolisant que nous avons caractérisés sont des molécules qui aident aujourd'hui les nombreux patients narcoleptiques et hypersomniaques à réguler leur vigilance, leur rythme de sommeil et à retrouver une vie quotidienne normale. L'utilisation de cette espèce est donc encore indispensable à une meilleure compréhension des mécanismes neurophysiologiques régulant les états de vigilance (cycle veille-sommeil-rêve) et au développement de nouvelles pistes thérapeutiques.

Réduction : Le nombre d'animaux de ce projet est déterminé par le nombre d'expériences restant à réaliser pour achever notre étude de ce nouvel antagoniste H2 de l'histamine. Il est réduit au strict minimum pour obtenir des résultats exploitables d'un point de vue statistique. Chaque animal sera utilisé comme son propre témoin et ceci dans plusieurs tests successifs de façon à ne pas recourir à davantage d'individus.

Raffinement : Afin de réduire au minimum les effets de nos interventions sur les animaux, nous utilisons des traitements antalgiques pour endiguer toute douleur au cours de l'intervention chirurgicale et dans les jours qui suivent. La prise en charge du bien-être des animaux comprend un protocole de soins post-opératoires défini avec notre vétérinaire désigné, un suivi quotidien, un hébergement en groupe dans une volière avec éléments d'enrichissements et de jeu. Les administrations de molécules se font par voie orale et non au moyen d'injections. Les enregistrements d'éveil et de sommeil sont réalisés à l'aide d'un système sans fil ce qui permet à l'animal d'être complètement libre de ses mouvements sans besoin le confiner dans un espace réduit.

19662 Les syndromes myélodysplasiques sont des maladies touchant la moelle osseuse et sont responsables d'un manque de cellules du sang. Elles peuvent évoluer et se transformer en leucémie aiguë (grave cancer du sang). Actuellement, le seul traitement curateur est la réalisation d'une greffe de moelle osseuse mais cette procédure n'est pas réalisable pour la majorité des patients dont le pronostic reste sombre. Récemment, une nouvelle approche thérapeutique a émergé qui consiste à armer, par génie génétique, les globules blancs du patient pour reconnaître les cellules leucémiques et les détruire. Cette approche a été validée dans la leucémie aiguë et nous proposons de pouvoir élargir l'indication de ce traitement aux syndromes myélodysplasiques de haut grade. Nous proposons d'évaluer l'effet anti-tumoral de ces globules blancs modifiés dans un modèle de souris greffées avec des cellules souches myélodysplasiques humaines qui vont reproduire la pathologie humaine. Nous précisons que les tests préliminaires in vitro ont montré une efficacité anti-tumorale de ces globules blancs modifiés sur les cellules myélodysplasiques. Malheureusement, il est impossible à l'heure actuelle de reproduire de manière in vitro une hématopoïèse complète d'un syndrome myélodysplasique avec tous ses composants et leurs interactions pour étudier l'effet anti-tumoral des globules blancs modifiés sur les cellules myélodysplasiques. Il est donc nécessaire de confirmer les résultats in vitro sur un modèle in vivo. De plus, aucun modèle mathématique ou informatique ne permet actuellement d'évaluer également cette réponse.

L'ensemble de ces procédures pouvant s'accompagner d'une douleur/angoisse modérée, tous les efforts seront entrepris pour réduire au minimum toute douleur, souffrance ou angoisse ressentie par les animaux. C'est pourquoi nous surveillerons l'état de santé des animaux tout au long des expériences afin de pouvoir intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de douleur, de souffrance ou d'angoisse. La greffe des cellules souches humaines sera

réalisée sous anesthésie générale par utilisation de kétamine et de xylazine. Le nombre d'animaux nécessaire à cette étude a été réduit au minimum sur la base des besoins imposés par les tests statistiques que nous utiliserons. De fait, un nombre total de 60 souris sera nécessaire.

Cette étude nous permettra de confirmer l'efficacité anti-tumorale des CAR-T sur les cellules myélodysplasiques dans un modèle in vivo de syndromes myélodysplasiques et en cas d'obtention de résultats positifs de débiter un essai thérapeutique clinique.

19663 Les syndromes myélodysplasiques sont des maladies touchant la moelle osseuse et sont responsables d'un manque de cellules du sang. Elles peuvent évoluer et se transformer en leucémie aiguë (grave cancer du sang). Actuellement, le seul traitement curateur est la réalisation d'une greffe de moelle osseuse mais cette procédure n'est pas réalisable pour la majorité des patients dont le pronostic reste sombre. Récemment, une nouvelle approche thérapeutique a émergé qui consiste à armer, par génie génétique, les globules blancs du patient pour reconnaître les cellules leucémiques et les détruire. Cette approche a été validée dans la leucémie aiguë et nous proposons de pouvoir élargir l'indication de ce traitement aux syndromes myélodysplasiques de haut grade. Nous proposons d'évaluer l'effet anti-tumoral de ces globules blancs modifiés dans un modèle de souris greffées avec des cellules souches myélodysplasiques humaines qui vont reproduire la pathologie humaine. Nous précisons que les tests préliminaires in vitro ont montré une efficacité anti-tumorale de ces globules blancs modifiés sur les cellules myélodysplasiques. Malheureusement, il est impossible à l'heure actuelle de reproduire de manière in vitro une hématopoïèse complète d'un syndrome myélodysplasique avec tous ses composants et leurs interactions pour étudier l'effet anti-tumoral des globules blancs modifiés sur les cellules myélodysplasiques. Il est donc nécessaire de confirmer les résultats in vitro sur un modèle in vivo. De plus, aucun modèle mathématique ou informatique ne permet actuellement d'évaluer également cette réponse.

L'ensemble de ces procédures pouvant s'accompagner d'une douleur/angoisse modérée, tous les efforts seront entrepris pour réduire au minimum toute douleur, souffrance ou angoisse ressentie par les animaux. C'est pourquoi nous surveillerons l'état de santé des animaux tout au long des expériences afin de pouvoir intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de douleur, de souffrance ou d'angoisse. La greffe des cellules souches humaines sera réalisée sous anesthésie générale par utilisation de kétamine et de xylazine. Le nombre d'animaux nécessaire à cette étude a été réduit au minimum sur la base des besoins imposés par les tests statistiques que nous utiliserons. De fait, un nombre total de 60 souris sera nécessaire.

Cette étude nous permettra de confirmer l'efficacité anti-tumorale des CAR-T sur les cellules myélodysplasiques dans un modèle in vivo de syndromes myélodysplasiques et en cas d'obtention de résultats positifs de débiter un essai thérapeutique clinique.

19664 La réalisation d'études de toxicologie, tolérance locale, pharmacocinétique et de pharmacologie de sécurité et/ ou d'efficacité est une obligation réglementaire lors du développement d'un médicament humain ou vétérinaire, pour un dispositif médical ou pour toute substance chimique. L'objectif de ce projet est la réalisation des études réglementaires de toxicologie générale et de tolérance locale, et des études préliminaires (Recherche de dose, dose maximale tolérée, étude de pharmacocinétique, pharmacologie et pharmacodynamique) chez le chien. Ces études consistent en administration unique ou répétée du produit à tester suivi d'observations régulières des animaux, comportement, poids, évaluation des effets sur les paramètres sanguins ou urinaires, évaluation des fonctions respiratoires, musculaires et cardiovasculaires et analyse macroscopique ou histopathologique. Le choix du chien est basé sur la réglementation en vigueur (ICH, FDA, EMA, ...) qui demande la réalisation d'études précliniques sur 2 espèces dont une espèce non rongeur. Le chien est une des espèces non rongeurs acceptées et le choix de cette espèce se fait sur la base des données de pharmacocinétique, métabolisme, pharmacodynamique et en fonction des analogies homme-chien. Le nombre d'animaux utilisés est défini par la réglementation et est adapté à la nécessité d'obtenir des résultats fiables sur un effectif suffisant tout en limitant le nombre d'animaux au strict nécessaire. Ce nombre total est estimé à 4900 animaux pour 5 ans. Ce nombre important s'explique

par la variété importante d'études dans ce projet et la durée du projet (5 ans). Il n'est actuellement pas possible de substituer l'animal de laboratoire par des méthodes alternatives car le modèle doit pouvoir mimer au mieux les interactions complexes biologiques et physiologiques retrouvées chez l'être humain et doit aussi permettre la sémiologie clinique. Pour améliorer leur bien-être, les animaux sont hébergés en groupes sociaux sauf incompatibilité avec la procédure expérimentale ou incompatibilité comportementale. Les animaux sont hébergés dans des boxes équipés de planchette de repos avec à disposition divers jouets. Les animaux bénéficient plusieurs fois par semaine d'un temps d'exercice dans une zone dédiée. Les techniques engendrant le moins d'inconfort ou sur une durée la plus courte possible pour l'animal seront privilégiées. Les autres techniques ou procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie avec le cas échéant un protocole d'analgésie adapté. Les animaux sont suivis quotidiennement sous la supervision d'un vétérinaire. Des points limites précoces sont appliqués de telle sorte qu'en cas de signes cliniques ayant des répercussions significatives sur le bien-être de l'animal, des mesures sont rapidement prises pour limiter la souffrance (mise en place d'un traitement analgésique, diminution de la dose testée, suspension de la procédure ou euthanasie).

19665 Les recherches en écologie et biologie de la conservation animale impliquent d'avoir recours à l'utilisation d'animaux sauvages, dans leur habitat naturel, à fins scientifiques. Une part de ces recherches impose de les capturer et les contenir temporairement captifs, ce qui induit un stress inévitable. Tout l'enjeu de la protection de ces animaux sauvages utilisés à fins scientifiques est de savoir gérer simultanément le stress et les risques liés aux gestes expérimentaux à appliquer. Les personnels concernés doivent donc suivre une formation spécifique obligatoire, qui leur apporte simultanément les bonnes pratiques de suivi et de gestion (1) du stress des animaux, et (2) des risques associés aux gestes à pratiquer. Ces deux compétences ne peuvent pas être enseignées (i) sans pratique : le recours à des démonstrations sur des animaux vivants est inévitable, (ii) sur des animaux d'origine captive : ces derniers ne stressent pas comme les animaux sauvages car ils sont adaptés et acclimatés à l'Homme, avec un stress en réponse à la capture et la manipulation atténué. Les animaux sauvages ont une réaction au stress 'adaptative' (pour échapper aux prédateurs) qui doit être évaluée, contenue, et prise en compte de la conception à la mise en œuvre des procédures. Une formation spécifique adaptée à l'utilisation d'animaux de la faune sauvage non-hébergée à fins scientifiques a donc été créée, et agréée en 2015, avec mise en œuvre sur des espèces de faune sauvage non-hébergée.

Le fondement pédagogique du module complémentaire spécifique de cette formation est que les apprenants soient formés avec des démonstrations pratiques (Demos) sur un modèle animal le plus proche possible du leur. La formation permet déjà de se former sur reptiles (serpents, tortues), oiseaux et mammifères. La présente demande est la copie conforme du projet #9867 (contenant les mêmes procédures), autorisé en 2019, mais étend la formation à 3 nouveaux modèles: 2 lézards (*Podarcis muralis*, *Zootoca vivipara*), et 1 amphibien urodèle (*Calotriton asper*), et un nouvel Etablissement Utilisateur. L'équipe enseignante concernée travaille déjà sur ces 3 modèles, et les démonstrations se feront dans le cadre d'études existantes, ce qui minimise le nombre d'animaux utilisés spécifiquement pour la formation. Les lézards vivipares et les calotritons proviendront de populations captives maintenues dans des enclos/vivarium simulant des conditions naturelles, avec maintien de phénotypes comportementaux sauvages. Les lézards des murailles d'origine non-captive ne seront utilisés qu'en cas d'indisponibilité des lézards vivipares. Ces deux lézards ont été choisis car ils sont couramment utilisés en écologie, communs et abondants. La formation repose sur 4 Demos, de gravité légère:

Démo1(Procédure n°1 sur Lézard, n°2 sur Urodèle)- Méthodes expérimentales faiblement invasives, incluant le marquage par brûlure d'écaille (lézards), les prélèvements sanguins complexes (sinus rétro-orbital chez les lézards, phlébotomie chez l'urodèle), et la mesure de consommation d'oxygène (lézards).

Démo2 (Procédure n°3 sur Lézard, n°4 sur Urodèle) - Méthodes d'anesthésie par application cutanée sur urodèle, par inhalation et par injection sur lézard, et injection sous-cutanée d'un transpondeur.

Démo3 (Procédure n°5 sur Lézard, n°6 sur Urodèle) - Reconnaissance de signes de détresse induits par la captivité temporaire, l'anesthésie (réveil) et/ou le marquage électronique par transpondeur;

Démo4 (Procédure n°7 sur Lézard, n°8 sur Urodèle) – Examen d'hygiène et de santé animale (prélèvements sanguins, prévention sanitaire).

Ces 4 Démos sont réalisées sur les 2 groupes taxonomiques, ce qui fait un total de 8 procédures. Le nombre total d'animaux utilisés en procédure par session sera de 6 adultes par groupe (2 pour Démo1 ; 2 pour Démo2 et 3 ; 2 pour Démo4). Nous ferons une session de formation par an, avec 2 groupes de 5 apprenants par session. Pendant 5 ans, cela fera au maximum 60 adultes utilisés pour 50 apprenants formés.

Remplacer : Le but pédagogique est de (dé)montrer aux apprenants des méthodes et pratiques alternatives aux pratiques communes (Raffinement), et le cas échéant, leur préconiser des formations par tutorat complémentaires pour finaliser leur acquisition de l'autonomie technique. Les Démos dans des conditions réalistes (sur animaux avec phénotype sauvage) sont donc indispensables pour atteindre ces objectifs pédagogiques. Ces enseignements pratiques ne peuvent pas être délivrés in silico ou ex vivo.

Réduire : Un groupe taxonomique donné ne sera utilisé en Démo que s'il y a au moins 3 apprenants par session (max. 5) travaillant sur ce groupe. Le nombre d'individus à utiliser par Démo a été réduit au maximum (N=2 ; recommandation CNEA). Les individus de la Démo2 seront réutilisés dans la Démo3. La moitié des individus utilisés font également partie de projets de recherche, et sont donc mutualisés : la totalité des procédures sur calotritons, ainsi que les prélèvements de sang (Procédure n°1), et suivi sanitaire (Procédure n°7) sur lézard vivipare sont mutualisés avec le suivi de routine des populations captives. Enfin, les manipulations seront filmées pour enrichir la formation sans augmenter le nombre d'animaux utilisés.

Raffiner. L'enjeu pédagogique est le raffinement : évaluer et minimiser le stress des animaux sauvages pendant les procédures. C'est la trame transversale à toutes les Démos. Les formateurs ont été choisis parmi les personnes les plus expérimentées en France sur ces groupes (et vétérinaires pour Démo2). Les responsables de Démos enseigneront la pratique sûre et rapide de gestes techniques courants, avec minimisation du temps de stress. En cas d'individu approchant un état de stress pathologique, il sera immédiatement mis au calme sous surveillance (quelques minutes), puis relâché sur son lieu de capture. La mise en captivité temporaire sera associée à des mesures de réduction du stress (obstruction visuelle, abris). La douleur induite par les implantations sera compensée par un anesthésique-analgésique local (EMLA), sauf pour le prélèvement de sang rétro-orbital sur lézards du fait de risques secondaires (pression sanguine). Le vétérinaire référent décidera du traitement à apporter à tout individu morbide. Le stress induit par les manipulations sera mesuré à partir des indicateurs comportementaux et variations de glycémie.

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

19666 Le projet actuel rentre dans le cadre A30 recherche principalement préclinique avec une partie dédiée à la recherche fondamentale. Cette étude se déroulera principalement autour de trois axes de recherche : l'épilepsie, la fonction respiratoire et la sérotonine (plus spécifiquement le récepteur sérotoninergique 2C).

- La Mort Soudaine Inattendue en Epilepsie (MSIE) est une issue qui touche chaque année 0,5% des patients épileptiques. La MSIE a souvent lieu après une crise épileptique induisant une longue apnée (arrêt respiratoire) qui aboutit à l'arrêt cardiaque puis au décès du patient. Une étude menée en post-mortem chez des victimes de MSIE a montré une altération du système sérotoninergique. La sérotonine (5-HT) étant un neurotransmetteur libéré dans le cerveau et fortement impliqué dans

la régulation des neurones situés dans la partie postérieure du cerveau appelée : tronc cérébral et responsables du contrôle de la respiration. Il n'existe à ce jour aucun marqueur biologique fiable qui permet de prédire la MSIE chez le patient épileptique, ce qui limite les études qui pourraient être menées chez le patient et qui permettraient de comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués dans ce type de décès. Ainsi et dans le cadre de la prévention contre la MSIE, il est aujourd'hui primordial d'identifier les mécanismes neurobiologiques qui sont impliqués dans la survenue du dysfonctionnement respiratoire lié à l'épilepsie, en ayant recours aux modèles expérimentaux chez l'animal.

- Pour cette étude, notre choix s'est porté sur le modèle d'épilepsie chez le rat induit par la pilocarpine. Ce choix de modèle est justifié par les caractéristiques communes qui existent entre le modèle d'épilepsie chez le rat et celle de l'épilepsie chez l'homme qui sont détaillées ci-après :

1- La présence de crises épileptiques après l'induction d'un status epilepticus (une longue crise épileptique) par la pilocarpine.

2- La présence chez 40% des rats épileptiques d'altérations respiratoires.

3- Les rats épileptiques qui souffrent d'altérations respiratoires présentent comme chez le patient épileptique, des altérations du système 5-HTergique. Parmi l'ensemble des altérations 5-HTergique qui sont associés aux altérations respiratoires, seule celle du récepteur sérotoninergique 2C (5-HT_{2c}R) se maintient au cours du temps chez le rat épileptique suggérant la possibilité de l'implication de ce récepteur dans l'apparition du dysfonctionnement respiratoire.

4- Par les similitudes anatomiques entre les cerveaux du rat et de l'Homme, nous souhaitons enregistrer en simultané la fonction respiratoire et l'activité électroencéphalographique dans l'hippocampe et le cortex qui sont deux régions cérébrales dont l'activité épileptique est présente lors de l'épilepsie.

5- L'absence de mortalité liée aux altérations respiratoires est un grand avantage dans le modèle de rat pilocarpine. Cela permet d'investiguer l'interaction entre le 5-HT_{2c}R et la respiration chez des rats qui souffrent d'épilepsie chronique comme dans le cas des victimes MSIE.

Dans ce projet nous souhaitons caractériser le rôle fonctionnel du récepteur 5-HT_{2c}R et son implication dans la survenue des altérations respiratoires liées à l'épilepsie. Il comportera deux procédures expérimentales afin de répondre à deux objectifs principaux :

(1) Caractériser les populations cellulaires sujettes aux variations d'expression du récepteur 5-HT_{2c}R dans le tronc cérébral de rats épileptiques présentant des altérations respiratoires.

(2) Identifier par une approche pharmacologique, utilisant un agoniste et un antagoniste spécifiques du récepteur 5-HT_{2c}, le rôle fonctionnel joué par ce récepteur dans la présence des altérations respiratoires chez les rats épileptiques.

A l'issue de ce projet, nous pourrions mieux comprendre le rôle de ce récepteur dans la survenue d'altérations respiratoires liées à l'épilepsie. Le cas échéant, ce récepteur pourrait constituer une cible pharmacologique pertinente pour prévenir l'apnée fatale chez le patient épileptique victime de MSIE.

Notre engagement vis à vis des exigences des 3 R :

Remplacement : l'enregistrement simultané intra-cérébral et l'utilisation d'un protocole d'administration de plusieurs substances pharmacologiques rendent ces expériences non envisageables chez le sujet humain. L'étude des rythmes cérébraux et respiratoires au cours ou en dehors d'une crise épileptique nécessitent l'utilisation d'animaux vivants et ne peut s'envisager sur des modèles in vitro. Le rat est aujourd'hui la seule espèce dans laquelle ont été caractérisés des troubles respiratoires associés à l'épilepsie.

Réduction du nombre d'animaux : pour mener ce projet, nous aurons besoin d'utiliser 320 rats pendant une durée de 4 ans. Ce nombre a été réduit au maximum en nous basant sur les données bibliographiques antérieures et permettant de réaliser des analyses statistiques.

Raffinement : Pour évaluer la respiration de façon non-invasive nous utiliserons deux techniques : la thermochimie et la pléthysmographie. Des expériences préliminaires montrent que la pléthysmographie est complémentaire à la thermochimie qui permet d'enregistrer sur une plus

longue période permettant d'identifier les altérations respiratoires dès l'apparition de l'épilepsie chez le rat. Seule la thermochimie sera menée sur le site 1 où se situe l'appareillage. Autrement les expériences seront effectuées à l'animalerie un second site (site 2). Pour limiter le stress lié au changement de site, les animaux seront : transportés dans des cages adaptées (couvercle avec filtre, linge opaque pour couvrir les cages), acclimatés à 3 par cage pendant 7 jours avant toute expérimentation. L'induction de l'épilepsie par la pilocarpine est une procédure sévère nécessitant un suivi accru de l'état général des animaux en se référant à une grille de score établie pour déterminer le degré de souffrance des animaux. L'acte d'implantation chirurgicale d'électrodes pour les enregistrements électro-encéphalographiques sera réalisé sous anesthésie et analgésie. En post-chirurgie, les rats seront surveillés pluri-quotidiennement jusqu'à récupération, en se référant à la grille de scores établis pour définir l'état de bien être des animaux. Toutes les mesures seront prises pour limiter la souffrance et la douleur des animaux. L'expérience sera stoppée si les points limites définies dans la grille de score sont atteints. A la fin de chaque procédure expérimentale, les rats sédatisés seront mis à mort.

19667 Le SARS-CoV-2, virus responsable de la COVID-2019 pour Coronavirus disease 2019 est un nouveau coronavirus découvert dans la ville de Wuhan dans la province de Hubei en Chine en décembre 2019. Il est responsable d'une épidémie dont l'épicentre se trouve en Chine. L'épidémie s'étend à de nombreux pays, dont la France et est actuellement qualifiée de pandémie. Les coronavirus sont des virus à ARN enveloppés appartenant à la famille des Coronaviridae, genre betacoronavirus. Chez l'homme, six espèces de coronavirus étaient jusqu'alors connues : les HCoV saisonniers, le SRAS –CoV, le MERS-CoV et maintenant le SARS-CoV-2 identifié comme le septième Coronavirus pathogène pour l'homme. Ce coronavirus est constitué d'un ARN génomique, d'une nucléocapside protéique (N), d'une enveloppe constituée d'une bicouche lipidique, d'une enveloppe protéique (E), de protéine membranaire (M) et de protéine spike (S).

Des études sont en cours pour tester des thérapies possibles pour la COVID-19 afin de répondre au plus vite à cette pandémie. En effet, 115 vaccins candidats sont signalés, dont 78 en développement actif confirmé. À la même date, 8 essais cliniques vaccinaux sont listés parmi les 410 essais relatifs à la COVID-19. Cinq vaccins en cours d'étude clinique sont centrés sur la protéine S, parfois dans son intégralité, sous la forme d'ADN ou d'ARNm codant pour cette protéine. Certaines molécules vont traiter les symptômes, telles que le Remdesivir qui est un antiviral. D'autres groupes testent l'utilisation de la transfusion de plasma de patients guéris de la COVID-19, contenant des anticorps dirigés contre le virus, et qui pourrait transférer cette immunité à un patient souffrant de la COVID-19. Des antiparasitaires sont également testés tel que l'Ivermectine, permettant de réduire la charge virale du coronavirus en 48h mais le stade de développement est précoce car limité à l'étude en laboratoire sur des cellules. Actuellement, en l'absence de médicament, un traitement symptomatique est appliqué aux cas bénins. Il s'agit de limiter les effets importuns : maux de tête, maux de gorge, courbatures. Pour cela, les patients peuvent prendre du paracétamol (Doliprane, Dafalgan, Efferalgan).

Les cas les plus graves sont admis dans des unités dédiées en service de réanimation. Les patients sont plongés dans un coma artificiel, ils sont sous assistance respiratoire et suivent souvent des traitements antibiotiques. Certaines de ces stratégies ne sont pas spécifiques au pathogène et elles sont associées à de nombreux effets secondaires. Les nouvelles stratégies cherchent à induire une réponse immune cellulaire et/ou humorale mémoire en

limitant les effets secondaires et pour cela les approches ciblent plus spécifiquement les protéines constituant le SARS-CoV-2.

Nous aimerions immuniser les primates non humains avec un pool de peptides spécifiques du SARS-Cov-2 capables d'activer une réponse immune de type B et/ou T (pool de peptides validés préalablement in vitro et chez la souris) afin de tester l'effet de deux molécules thérapeutiques (candidats médicaments). Ces molécules sont des anticorps bi spécifiques qui cibleraient à la fois les cellules T et les cellules B. Nous souhaitons déterminer si ces candidats thérapeutiques ont la capacité de réduire la réponse immune induite par l'immunisation avec le pool de peptides. Nous souhaiterions également évaluer la PK/PD des deux candidats thérapeutiques.

Ce type d'étude nécessite une preuve d'efficacité in vivo dans des modèles précliniques, c'est pourquoi nous voulons tester ces thérapies chez le primate non humain après avoir eu des résultats satisfaisants in vitro et in vivo chez la souris.

Nous souhaiterions également évaluer la PK/PD des deux candidats thérapeutiques en deux phases : phase 1a et phase 1b : la phase 1a a été réalisée avec n = 2 animaux. Les résultats de cette première manipe nous permettent d'ajuster rapidement le protocole afin d'optimiser au maximum l'action des molécules thérapeutiques. Nous souhaitons donc modifier cette saisine afin d'ajouter cette phase 1b qui conduira à 3 injections des molécules thérapeutiques en IV au lieu d'une seule. L'objectif étant à la fin de comparer les deux résultats de l'étape 1a et 1b, si nécessaire reproduire ces étapes ou passer à la phase fonctionnelle 2a ou 2b.

Le nombre d'animaux utilisés au maximum sera de 20 primates non humains pour combiner un nombre réduit d'animaux avec une pertinence statistique. Le suivi des animaux sera quotidien et la gestion de la douleur maîtrisée le plus adéquatement possible afin d'apporter les soins nécessaires le plus rapidement aux animaux.

De façon à diminuer le stress, la souffrance et la douleur, toutes les procédures de ce projet seront réalisées chez ces animaux sous anesthésie générale et un traitement antalgique, qui ne sera pas anti-inflammatoire au vu de la rationalité de ce projet, il leur sera donné de façon adaptée en fonction de la procédure. Les animaux sont hébergés avant protocole expérimental en volière, de façon à préserver leur mode de vie en communauté. Au cours du protocole expérimental les individus traités sont hébergés dans des cages séparées, mais jointives permettant la vision et la communication entre congénères. Un enrichissement alimentaire (fruits et/ou légumes) est donné quotidiennement, un enrichissement par jeux (différentes activités) est donné en rotation dans les cages selon un programme hebdomadaire. Enfin, un aménagement (perchoirs, cordes...) des cages permet un enrichissement de mouvements. Les tests statistiques qui seront réalisés seront des tests non paramétriques appelés t-test, plus précisément retrouvés dans la catégorie unpaired t-test, Mann Whitney test pour comparer chaque groupe de peptide en fonction du groupe contrôle. Il pourra également être réalisé des tests dit One way-ANOVA, pour comparer tous les groupes les uns avec les autres ou tous les groupes en fonction du groupe contrôle.

19668 Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont caractérisées par une succession d'épisodes inflammatoires entrecoupés de périodes de rémission de durée variable. Le traitement pharmacologique des MICI, principalement la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique, est basé sur l'utilisation d'agents pharmacologiques, diminuant de façon non spécifique l'inflammation et les réponses immunitaires. Néanmoins, la stratégie classique d'escalade thérapeutique a parfois montré une certaine inefficacité à contrôler la maladie et à éviter les complications, nécessitant généralement le recours à la chirurgie. Ce constat conduit à considérer la cicatrisation de la muqueuse comme un objectif thérapeutique. Des études récentes ont montré que la cicatrisation complète de la muqueuse intestinale réduit les taux de rechute et d'hospitalisation, ainsi que le recours à la chirurgie chez les patients. L'idée de diminuer le risque de rechute en favorisant la cicatrisation de la muqueuse, et plus particulièrement la réparation de l'épithélium intestinal, en couplant le traitement pharmacologique à une approche nutritionnelle constitue une nouvelle piste de recherche.

Le but de cette étude sera donc de montrer l'efficacité de différents mélanges d'acides aminés (AA) couplés ou non à des traitements pharmacologiques anti-inflammatoires chez la souris. Dans ce contexte, nous testerons dans un premier temps l'efficacité de la glycine seule ou couplée à un mélange de thréonine, glutamate, méthionine sur la cicatrisation de la muqueuse, après induction d'un stress inflammatoire. Nous avons choisi la glycine parce qu'elle serait capable de diminuer l'inflammation. Coupler cet AA au mélange thréonine, glutamate et méthionine pourrait potentialiser cet effet. Nous avons, en effet, déjà démontré l'efficacité du mélange thréonine/glutamate/méthionine pour améliorer la cicatrisation de la muqueuse, mais ce mélange n'agit pas sur les paramètres de l'inflammation intestinale. Dans la seconde partie de nos travaux nous évaluerons l'efficacité de trois traitements anti-inflammatoires qui seront ou non couplés au mélange d'AA le plus efficace. Nous avons choisi l'infliximab (IFX) et l'ustekinumab (UKN) qui sont

des anti-inflammatoires connus pour soigner les MICI, et l'orexine (Oxa) un neuropeptide capable de réduire les phénomènes inflammatoires. Ces expériences seront réalisées chez la souris C57BL/6 mâle chez qui une colite modérée sera induite par ajout de 3,5% de DSS dans l'eau de boisson pendant 5 jours.

La durée de l'expérimentation pour les deux études sera de 18 jours : 7 jours d'habituation, 5 jours de traitement au DSS (J0 à J5) et 6 jours de récupération avec ou sans intervention nutritionnelle ou médicamenteuse. Les souris seront par ailleurs nourries avec un régime standard avec un libre accès à la nourriture et à l'eau de boisson pendant toute l'expérimentation. Un score reflétant l'état d'inflammation et de bien-être des animaux sera établi pour chaque souris.

Cette étude inclura au total 168 souris. La première procédure évaluera l'efficacité de la glycine seule ou couplée à un mélange de thréonine, glutamate, méthionine afin de définir le mélange d'AA le plus efficace. A la fin du traitement au DSS (J5), les animaux seront identifiés et répartis au hasard dans 5 groupes expérimentaux de 12 souris (N=60). Chaque étude inclura un groupe d'animaux témoins ayant une muqueuse saine, ne recevant ni DSS ni traitement, qui nous permettra d'évaluer l'efficacité des molécules étudiées. Les AA seront donnés à partir de J5 pendant 6 jours par gavage afin de s'assurer que tous les animaux reçoivent la même dose. Au cours de la deuxième procédure, le mélange d'AA le plus efficace sera couple ou non à un traitement anti-inflammatoire. Une seule injection de l'IFX et de l'UKN en intra-péritoneal (i. p.) sera réalisée à J5 et l'Oxa sera administrée en i. p. 1 fois par jour pendant 6 jours à partir de J5. Cette seconde étude inclura 9 groupes de 12 animaux (N=108).

Ce projet nécessite de mimer les événements impliqués dans l'inflammation intestinale et sa cicatrisation, les modèles animaux sont donc irremplaçables pour identifier les mécanismes cellulaires et moléculaires épithéliaux impliqués dans la réparation intestinale après un épisode inflammatoire aigu.

Le nombre d'animaux par groupe est de 12. Ce nombre d'animaux est le minimum nécessaire pour obtenir des résultats exploitables sur le plan statistique, en prenant en compte la variabilité interindividuelle et le fait que nous testons des effets qui sont probablement de faible intensité.

Les animaux seront placés en cages collectives dans des conditions favorables à leur bien-être, et l'environnement sera enrichi au moyen de maisonnettes et de tunnels. Les gavages et injections seront administrés par un expérimentateur chevronné.

L'utilisation du DSS est responsable de douleurs abdominales associées à une diarrhée si la dose est trop élevée. Les antalgiques ayant souvent des effets sur les processus inflammatoires, il est difficile de les utiliser sans biaiser l'interprétation des résultats. Les animaux seront surveillés quotidiennement avec évaluation de leur poids, de l'aspect physique (état du poil, prostration, faciès) et de leur fèces (consistance, présence de sang), afin de déterminer un score pour chaque animal. Pour chaque animal nous disposerons ainsi d'une fiche de suivi qui compilera les traitements et la surveillance journalière. Si les points limites fixés (score maximum pour un des points pendant plus de 2 jours) étaient atteints, l'animal sera euthanasié.

Aucun prélèvement ne sera effectué au cours de l'expérimentation. A la fin de l'expérimentation tous les animaux seront euthanasiés. Lors de l'euthanasie une ponction cardiaque sous anesthésie à l'isoflurane sera réalisée par une personne expérimentée. Les animaux seront ensuite décapités et différents organes seront prélevés. Des études histologiques de la muqueuse intestinale nous permettront de vérifier l'efficacité des traitements.

19669 L'obésité est un facteur de risque majeur des complications cardiométaboliques telles que le diabète de type 2 ainsi que les maladies cardio-vasculaires et hépatiques. Cependant, certains individus obèses semblent protégés des complications métaboliques de l'obésité. L'hypothèse de la « limite d'expansion du tissu adipeux » propose que chaque individu possède sa propre capacité de stockage de graisses au sein de son tissu adipeux blanc (TAB) et que lorsque celle-ci est atteinte, les lipides vont se déposer de manière ectopique dans différents organes et contribuer au développement de l'insulinorésistance par des mécanismes de lipotoxicité. Dans ce contexte, la dysfonction adipocytaire, qui altère la capacité de stockage et d'expansion saine du TAB, est un

élément physiopathologique clé des complications cardiométaboliques associées à l'obésité. Cependant, les mécanismes moléculaires rendant l'adipocyte dysfonctionnel et insulino-résistant restent peu connus.

Nos travaux préliminaires font état de l'implication du cholestérol dans la mise en place de la dysfonction adipocytaire. Nous avons notamment montré que l'estérification du cholestérol dans l'adipocyte est primordiale : chez la souris nourrie avec un régime gras et présentant un TAB dysfonctionnel, la capacité d'estérification est diminuée. Nos données chez des patients obèses et en culture cellulaire confirment le rôle clé de l'estérification du cholestérol dans l'homéostasie adipocytaire.

Dans l'adipocyte le cholestérol est estérifié par la Stérol O-acyltransférase 1 qui catalyse l'estérification d'un acide gras sur la fonction alcool du cholestérol. Son rôle dans l'adipocyte n'a jamais été étudié. Dans les cellules, l'accumulation de cholestérol libre est délétère et l'estérification de ce dernier permet de tamponner ses effets cytotoxiques. L'objectif de ce projet est de mieux comprendre le rôle de l'estérification du cholestérol sur la dysfonction adipocytaire ainsi que sur les complications métaboliques qui en découlent (insulino-résistance, complications hépatiques et complications cardiaques). Nous faisons l'hypothèse que l'estérification du cholestérol dans l'adipocyte est un processus cellulaire protégeant le TAB au cours de l'obésité. Pour tester cette hypothèse, nous générerons les souris déficientes pour Soat1 dans l'adipocyte en croisant des souris floxées pour Soat1 avec des souris exprimant la Cre –recombinase sous le promoteur de l'Adiponectine qui est spécifique des adipocytes. Nous avons pour objectif de réaliser le phénotypage métabolique de ces animaux en les challengeant avec différents régimes induisant une accumulation de cholestérol dans le tissu adipeux (par l'utilisation d'un régime riche en graisses- high fat diet – HFD et régime riche en cholestérol) et en analysant la fonction adipocytaire ainsi que les complications métaboliques qui y sont associées (complications hépatiques, cardiaques et métaboliques : dyslipidémies, insulino-résistance).

Nous nous sommes efforcés de respecter dans ce projet la règle des 3 R. Le projet préconise l'utilisation d'un nombre de 432 animaux, ce qui, dans un souci de réduction correspond au nombre minimal d'animaux permettant d'obtenir des résultats significatifs. Nous avons précédemment défini la cinétique de l'apparition des complications métaboliques associées à la prise d'un régime gras ou riche en cholestérol et donc raffiné le nombre d'animaux et le temps de l'expérimentation. Nous avons pris en compte le bien-être animal, un examen régulier permettra de prévenir les risques de stress et de souffrances. Nous avons intégré la gestion de la souffrance animale en utilisant les analgésiques adaptés à chaque procédure. Nos expériences chez l'animal sont indispensables pour observer des réponses physiologiques intégrées mais nous effectuerons plusieurs études en cultures cellulaires afin de remplacer au maximum l'utilisation des souris.

19670 Les troubles neurologiques sont des maladies du système nerveux central ou périphérique, c'est-à-dire qu'elles touchent le cerveau, la moelle épinière, les nerfs crâniens et les nerfs périphériques. Il existe de nombreuses pathologies cérébrales dont certaines ont été décrites dès le 19^{ème} siècle : maladie d'Alzheimer, maladie de Huntington, maladie de Parkinson. Les autres troubles neurologiques les plus courants comprennent l'épilepsie, la sclérose latérale amyotrophique (également appelée maladie de Charcot), la schizophrénie et la sclérose en plaques. Un français sur deux est touché directement ou indirectement par une pathologie cérébrale. Dans les pays à revenus élevés, la maladie d'Alzheimer et autres démences sont la deuxième cause de mortalité en 2019.

Actuellement, de nombreuses maladies neurodégénératives sont incurables et très fréquentes chez les personnes de plus de 65 ans comme la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson. L'architecture complexe du cerveau et ses nombreuses interactions avec l'organisme limitent la portée des études in silico et in vitro de ces pathologies cérébrales. L'utilisation de modèles de rongeurs mimant les troubles neurologiques est donc essentielle afin d'obtenir une meilleure compréhension de leurs développements et/ou et de favoriser la mise au point de traitements thérapeutiques.

L'objectif du présent projet est l'élevage de lignées génétiquement modifiées de rats et de souris reproduisant des troubles neurologiques. Cela permettra d'approfondir la caractérisation de ces modèles. Ultimement, ces études pourraient permettre d'identifier des substrats moléculaires et biologiques caractéristiques des pathologies cérébrales et de développer de nouvelles cibles thérapeutiques. Afin de satisfaire au raffinement, l'hébergement des animaux sera réalisé dans des locaux appropriés avec des conditions optimales de température et d'hygrométrie avec un cycle jour/nuit de 12h/12h. De plus, un enrichissement sera systématiquement placé dans chaque cage et le personnel sera habilité à réaliser les différentes procédures dans le respect des règles d'éthique, de bien-être animal et du principe des 3R. Les surveillances quotidiennes des animaux permettront d'identifier d'éventuels animaux en souffrance et de prendre les mesures appropriées (surveillance accrue, mise à mort dans les cas les plus graves). Le nombre d'animaux est calculé selon les protocoles expérimentaux de manière à obtenir le minimum d'animaux par groupe permettant des résultats significatifs et homogènes. Afin de constituer les différents lots expérimentaux, il est estimé que sur les 5 années du projet un total de 90000 animaux est nécessaire.

19671 La tétraspanine 8 (Tspan8) est une protéine dont l'expression corrèle à l'agressivité de plusieurs cancers chez l'humain dont le cancer de la prostate (CaP). Néanmoins, son rôle dans le développement et la progression tumorale du CaP ainsi que les mécanismes impliqués restent à préciser. Néanmoins, des études montrent que le niveau d'expression de Tspan8 pourrait représenter un biomarqueur d'intérêt dans l'évaluation de l'agressivité du CaP et de sa capacité à disséminer dans l'organisme. La protéine Tspan8 constituerait également une cible thérapeutique d'intérêt. Dans cette optique, ce projet cherche à 1) valider l'impact du niveau d'expression de Tspan8 sur la prolifération et la dissémination tumorale in vivo et 2) caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans ces phénomènes.

Le nombre d'animaux inclus dans ce projet a été optimisé conformément à la règle des 3Rs (Remplacement, Réduction, Raffinement). L'ensemble du projet comprendra 310 souris NOD SCID âgées de 2 à 4 mois, et se déroulera sur 5 années. Ce nombre a été calculé afin de garantir une valeur statistique à l'étude menée.

En effet, de nombreuses études in vitro réalisées en amont ont permis de démontrer un lien entre le niveau d'expression de Tspan8 et la prolifération tumorale ainsi que le potentiel de dissémination. Cependant, ces études sur cellules ne peuvent pas se substituer aux études sur un organisme entier afin d'évaluer le rôle de l'expression de Tspan8 sur le développement tumoral et métastatique dans des conditions physiologiques. Au cours de ce projet, le nombre d'animaux nécessaire est réduit au maximum en sélectionnant uniquement les expérimentations essentielles. Des cellules de cancer de la prostate humaine seront implantées en sous cutanée ou par greffe orthotopique intra-prostatique. Le suivi de la prolifération tumorale et le développement de métastases seront évalués par mesure directe au pied à coulisse (tumeurs sous cutanées), par imagerie à différents temps post-implantation (tumeurs orthotopiques) ou dissection et par détection de biomarqueurs circulants dans le sérum. La surveillance quotidienne des animaux permettra de déceler les premiers signaux de stress, de douleurs ou d'inconfort pour l'animal qui pourront être améliorés par l'administration d'antalgiques avant l'atteinte des points limites définis. Les conditions d'hébergement seront optimisées (portoirs ventilés, température, hygrométrie, luminosité, densité animale, enrichissement de milieu avec coton pour la nidification, bâtonnet de bois pour ronger et cabane de cachette).

19672 Les troubles neurologiques sont des maladies du système nerveux central ou périphérique, c'est-à-dire qu'elles touchent le cerveau, la moelle épinière, les nerfs crâniens et les nerfs périphériques. Il existe de nombreuses pathologies cérébrales dont certaines ont été décrites dès le 19ème siècle : maladie d'Alzheimer, maladie de Huntington, maladie de Parkinson. Les autres troubles neurologiques les plus courants comprennent l'épilepsie, la sclérose latérale amyotrophique (également appelée maladie de Charcot), la schizophrénie et la sclérose en plaques. Un français sur deux est touché directement ou indirectement par une pathologie cérébrale. Dans les pays à

revenus élevés, la maladie d'Alzheimer et autres démences sont la deuxième cause de mortalité en 2019.

Actuellement, de nombreuses maladies neurodégénératives sont incurables et très fréquentes chez les personnes de plus de 65 ans comme la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson. L'architecture complexe du cerveau et ses nombreuses interactions avec l'organisme limitent la portée des études *in silico* et *in vitro* de ces pathologies cérébrales. L'utilisation de modèles de rongeurs mimant les troubles neurologiques est donc essentielle afin d'obtenir une meilleure compréhension de leurs développements et/ou et de favoriser la mise au point de traitements thérapeutiques.

L'objectif du présent projet est l'élevage de lignées génétiquement modifiées de rats et de souris reproduisant des troubles neurologiques. Cela permettra d'approfondir la caractérisation de ces modèles. Ultimement, ces études pourraient permettre d'identifier des substrats moléculaires et biologiques caractéristiques des pathologies cérébrales et de développer de nouvelles cibles thérapeutiques. Afin de satisfaire au raffinement, l'hébergement des animaux sera réalisé dans des locaux appropriés avec des conditions optimales de température et d'hygrométrie avec un cycle jour/nuit de 12h/12h. De plus, un enrichissement sera systématiquement placé dans chaque cage et le personnel sera habilité à réaliser les différentes procédures dans le respect des règles d'éthique, de bien-être animal et du principe des 3R. Les surveillances quotidiennes des animaux permettront d'identifier d'éventuels animaux en souffrance et de prendre les mesures appropriées (surveillance accrue, mise à mort dans les cas les plus graves). Le nombre d'animaux est calculé selon les protocoles expérimentaux de manière à obtenir le minimum d'animaux par groupe permettant des résultats significatifs et homogènes. Afin de constituer les différents lots expérimentaux, il est estimé que sur les 5 années du projet un total de 90000 animaux est nécessaire.

19673 La mesure du temps est vitale, afin de synchroniser les fonctions biologiques aux variations annuelles des contraintes environnementales. Les espèces saisonnières utilisent la photopériode comme indicateur du temps qui passe, ce paramètre étant intégré au niveau du cerveau. Les régulations neuroendocrines induites, impliquant notamment les hormones thyroïdiennes, sont relativement bien connues, contrairement aux mécanismes régissant la temporalité de ces régulations. Le but de notre projet est d'identifier les régulations de gènes (et leur localisation) impliquées dans le contrôle saisonnier de la reproduction. Nous proposons pour cela d'exploiter le phénotype d'une espèce primate saisonnière dont la photosensibilité est dépendante du sexe. En effet, lorsque les animaux sont maintenus en photopériode constante pendant 6 mois (jours courts pour simuler l'hiver), mâles et femelles réagissent différemment au cours du temps, en particulier en fin d'hiver. En effet, si l'axe reproducteur est complètement 'éteint' depuis le début de l'hiver (arrêt total des cycles ovariens, régression testiculaire totale), celui-ci est réactivé chez le mâle uniquement en fin d'hiver, cela se traduisant par une recrudescence testiculaire. Les femelles ne redémarreront leurs cycles ovariens qu'à la transition à la photopériode estivale (jours longs), quelques semaines plus tard. La fin de l'hiver est donc caractérisée par une distinction physiologique nette entre mâles et femelles, ceci étant régi au niveau du cerveau. Les mécanismes de régulations de ces modifications saisonnières sont pour le moment inconnus.

Nous allons donc dans ce projet étudier au plan transcriptomique les régulations de gènes qui s'opèrent entre début et fin d'hiver chez mâles et femelles. Pour cela, des animaux (3 par groupe expérimental, 12 animaux au total) seront caractérisés sur le plan physiologique avant d'être sacrifiés afin d'analyser leur cerveau. Tous les animaux seront donc impliqués dans 4 procédures expérimentales, réalisées en séquence, une seule fois par animal: un prélèvement sanguin, urinaire et fécal (Procédure 1, classe légère), une biopsie cutanée avec anesthésie locale (Procédure 2, classe légère), une mesure de la composition corporelle par résonance magnétique nucléaire (Procédure 3, classe légère) et le suivi sur 4 jours des performances métaboliques dans un dispositif de calorimétrie indirecte (Procédure 4, classe modérée). A l'issue de cette dernière procédure, les animaux seront euthanasiés afin de récupérer l'ensemble de leurs organes, et plus particulièrement le cerveau, pour des analyses futures. Bien que l'objectif premier de ce projet soit d'étudier les

régulations opérées dans le cerveau, l'ensemble des organes sera stocké à -80°C dans une banque d'organes.

Le principe de REDUCTION est appliqué puisque seuls 3 animaux par groupe expérimental (12 animaux au total) seront impliqués dans ce projet. Ce chiffre constitue un minimum statistique pour déceler des régulations significatives entre les groupes expérimentaux tout en limitant au maximum le recours aux animaux. Il n'est néanmoins pas possible de REMPLACER l'utilisation des animaux par des méthodes alternatives compte-tenu de la nature des régulations à caractériser. En effet, le phénomène de sensibilité à la photopériode est observé dans le cadre naturel de synchronisation de l'organisme avec les variations de la photopériode. Les processus moléculaires sous-jacents ne peuvent pas être modélisés ou analysés avec des approches *in vitro*. De plus, le recours à une espèce primate se justifie par l'effet du sexe sur la temporalité des régulations de l'axe reproducteur chez cet animal, qui est unique par rapport à ce qui est connu d'autres espèces saisonnières (oiseaux, hamsters et moutons), ceci étant probablement lié aux traits d'histoire de vie de cette espèce. Enfin, l'ensemble des procédures expérimentales appliquées a été RAFFINE au cours des dernières années afin de limiter le stress et le mal-être des animaux. Tous les animaux seront surveillés quotidiennement afin de s'assurer du bien-être des animaux utilisés. Pour cela, des indicateurs comme le poids de l'animal, la prostration, l'absence d'alimentation, des symptômes apparents de gêne ou de douleur (irritations, etc) ou enfin des troubles du comportement (agressivité, sur-léchage, etc) sont particulièrement suivis. Le raffinement sera par ailleurs assuré grâce à une bonne maîtrise des procédures réalisées par du personnel qualifié.

A terme, les résultats du projet constitueront une étape préliminaire à la compréhension des mécanismes qui sous-tendent l'horloge biologique circannuelle.

19674 Ce projet intitulé : « Intérêt de la thérapie cellulaire dans la prévention des lésions d'organes après un choc hémorragique associé à une rhabdomyolyse » fait suite à un précédent projet et est prévu pour une durée de 5 ans.

La physiopathologie du patient polytraumatisé est complexe. Elle associe souvent choc hémorragique et lésions traumatiques. Le choc hémorragique induit une baisse brutale et importante du volume circulant responsable d'une diminution de la perfusion tissulaire. L'association des traumatismes et du choc hémorragique engendrent des lésions tissulaires/cellulaires qui libèrent des molécules pouvant mener à une réponse inflammatoire systémique excessive et conduire au syndrome de défaillance multi-viscérales. La rhabdomyolyse, fréquemment présente chez les patients polytraumatisés et notamment les polytraumatisés de guerre, se caractérise par la dégradation des cellules du muscle squelettique libérant ainsi leur contenu dans la circulation générale. Parmi les lésions d'organes, l'insuffisance rénale aiguë est une complication sévère et fréquente chez les patients polytraumatisés atteints de rhabdomyolyse.

Dans ces cas complexes, la réanimation post-hémorragie améliore la circulation du sang dans les organes, mais ne résout pas les lésions liées à l'activation de la réponse inflammatoire systémique ou aux désordres associés à la rhabdomyolyse par exemple, qui contribuent de manière importante au développement de défaillances d'organes. Il est donc nécessaire de trouver des thérapeutiques pour prévenir l'apparition de ces lésions.

Les Cellules Stromales Mésoenchymateuses (CSM) principalement issues de la moelle osseuse, sont de puissants modulateurs des réponses immunitaires et participent à la réparation de ces tissus lésés notamment grâce à la sécrétion d'un large éventail de molécules bioactives et de vésicules extracellulaires (VEs). D'autre part, leur efficacité peut être optimisée en modulant l'environnement de culture des cellules, c'est le concept de "priming" cellulaire. Les VEs sont de tous petits organites émis par les cellules dans l'espace extracellulaire. Les éléments qui les composent sont entourés d'une membrane. Elles sont produites par les cellules afin de communiquer entre elles et peuvent aussi être utiles à la réparation de cellules lésées. Dans ce contexte d'urgence, nécessitant la disponibilité très rapide d'un outil thérapeutique, l'utilisation d'un produit de sécrétion (milieu de culture contenant des facteurs solubles et/ou vésicules extracellulaires) préparés à l'avance, facilement conservables et prêts à l'emploi quand il y en a besoin, apparaît comme une stratégie

innovante particulièrement intéressante pour la prévention de l'apparition des lésions tissulaires post hémorragie traumatique.

L'objectif de cette étude *in vivo* est de valider et optimiser l'utilisation des CSM et de leurs produits de sécrétion des CSM (milieu conditionné MC ou vésicules extracellulaires VEs) sur l'apparition des altérations tissulaires (rein, foie, intestin, poumon, cœur etc...) dans un modèle de choc hémorragique traumatique (par hémorragie associée à une rhabdomyolyse) réanimé chez le rat. L'induction de la rhabdomyolyse sera réalisée par injection de glycérol dans les muscles des pattes. Au maximum, 490 rats mâles non consanguins (Sprague Dawley) sont prévus pour ce projet. En effet, leur taille permet des interventions chirurgicales techniquement plus faciles à réaliser et de prélever des quantités d'échantillons plus importantes que chez la souris. Nous souhaitons qu'ils soient non consanguins afin de mieux représenter la variabilité inter-individuelle observée chez l'Homme. Ce projet sera réalisé par étapes successives avec prise de décision sur l'arrêt ou la poursuite de l'étude.

La première étape (30 rats) permettra de déterminer les conditions de réalisation du modèle pathologique (dose de glycérol à injecter et durée d'exploration dans le cadres de nos points limites). La 2ème étape (65 rats) permettra de sélectionner les traitements et les doses efficaces à un temps précoce (H6). Enfin, nous réaliserons, dans les étapes 3 et 4 (395 rats), l'étude thérapeutique pour évaluer l'effet de nos traitements (CSM, MC et VE) sélectionnés à l'étape 2 dans notre modèle Hémorragie/Rhabdomyolyse/Réanimation déterminé à l'étape 1.

Les critères de jugement de la sévérité du modèle ainsi que des effets bénéfiques des traitements seront évalués lors de la mise à mort des animaux, tout d'abord grâce à l'analyse des échantillons sanguins et urinaires mais également sur les analyses histologiques tissulaires. Toutes les procédures seront effectuées sous anesthésie générale avec analgésie.

Ces études chez l'animal demeurent essentielles car elles fournissent des informations fondamentales sur la pharmacocinétique, la toxicité, et le mécanisme d'action des traitements par produits de thérapie cellulaire qui ne peuvent pas être remplacés par d'autres méthodes. Elles ne peuvent pas être remplacées uniquement par des modèles cellulaires. Cependant, en accord avec le principe de réduction nos expérimentations *in vivo* seront réalisées par étapes permettant d'éliminer au fur et à mesure des hypothèses non valables. Par ailleurs, seules les propositions thérapeutiques dont des effets bénéfiques auront été préalablement démontrés *in vitro* seront étudiées dans ce protocole. Enfin, concernant le raffinement, le confort et le respect du bien-être des animaux étant une de nos priorités, un soin constant sera porté pour assurer l'antalgie par injections d'anesthésiques locaux et d'antalgique.

Nous veillerons également à l'apparition de signes d'inflammation ou d'infection, chez les animaux avec une gradation de soins et de décisions entre état normal et points limites. Lorsque la gradation atteint un niveau appelé « Points limites », l'animal sera mis à mort par surdose de gaz anesthésiant. Par ailleurs, les conditions d'hébergement des animaux seront enrichies avec des jouets.

19675 De nombreux travaux ont montré, tant chez les rongeurs que chez les primates, qu'il y avait pendant la grossesse un transfert constant de cellules foetales vers la mère. Ces cellules sont bien tolérées par le système immunitaire de la mère et persistent des décennies après l'accouchement en se nichant principalement dans la moelle osseuse. Des études ont montré que ces cellules pouvaient quitter la moelle et migrer vers un tissu maternel lésé (cerveau, cœur, peau et autres) pour participer à sa réparation.

Les plaies chroniques représentent un enjeu majeur de santé public, tant à l'échelle individuelle où elles sont associées à une morbidité importante (infections, douleurs, impotence fonctionnelle, dépression, transformation tumorale, ...), qu'à l'échelle collective car elles sont associées à des dépenses de santé élevées et prolongées dans le temps. Il apparaît donc important de développer de nouveaux traitements efficaces et facilement accessibles pour les problèmes de cicatrisation cutanée.

Les cellules foetales transférées chez la mère pourraient représenter une source de cellules souches capables d'aider à la cicatrisation des plaies maternelles. Il a en effet été mis en évidence

l'implication de certaines voies de signalisation dans la mobilisation de ces cellules au sein des plaies maternelles.

Le but de ce projet est de caractériser les cellules fœtales transférées chez la mère en cas de plaie, d'explorer le(s) voie(s) de recrutement et de tester leurs effets dans des modèles pathologiques de cicatrisation retardée.

Les 4 procédures du projet sont :

1. Effectuer une caractérisation approfondie de la nature et des potentialités des cellules microchimériques fœtales
2. Identifier et tester les voies de signalisation qui pourraient être mises en jeu dans le recrutement ciblé des cellules fœtales
3. Évaluer l'effet des chimiokines identifiées sur le recrutement des cellules fœtales dans différents modèles de cicatrisation pathologique retardée
4. Évaluer le rôle des cellules fœtales dans la cicatrisation cutanée chez la souris en condition allogénique (accouplement de souris de fonds génétique différents)

Nous réaliserons sur les femelles post-partum des plaies cutanées afin de déclencher la migration des cellules fœtales vers les plaies maternelles. La réalisation de ces plaies cutanées est une procédure de classe modérée qui sera effectuée sous anesthésie générale. Une analgésie pré- et post-opératoire et un suivi quotidien de l'état des souris permettront de s'assurer du bien-être des animaux.

Ces expériences permettront d'évaluer l'effet de ces cellules sur la cicatrisation maternelle par rapport à des souris vierges et d'identifier des voies de signalisation visant à augmenter leur recrutement. Nous pourrions isoler ces cellules afin de mieux caractériser leur nature et leurs potentialités. Nous étudierons aussi le rôle des cellules fœtales dans des modèles de cicatrisation cutanée retardée qui reflètent mieux la situation observée chez l'homme où les retards de fermeture des plaies sont liés à des pathologies de la cicatrisation telles que le diabète ou la drépanocytose. Enfin, nous étudierons les capacités pro-cicatrisantes des cellules fœtales chez la souris en condition allogénique.

L'utilisation de souris comme modèle de cicatrisation humaine a été validée, permettant d'avoir une vision intégrative des différentes phases de la cicatrisation. Nous utiliserons différents modèles afin de répondre à ces questions :

- 2 modèles murins exprimant un gène rapporteur fluorescent (GFP ou Tomato) permettant de repérer les cellules d'origine fœtale chez la mère. Les deux rapporteurs seront comparés et nous utiliserons le modèle permettant de repérer les cellules fœtales avec le plus de sensibilité et spécificité

- 2 modèles murins de cicatrisation pathologique retardée modèles de drépanocytose. Nous comparerons ces 2 modèles afin de déterminer le meilleur modèle de cicatrisation pathologique.

Par ailleurs, nous utiliserons 2 autres modèles non transgéniques de cicatrisation retardée : un traitement induisant un vieillissement cutané pathologique ou un traitement inducteur de diabète.

Ce projet impliquera l'utilisation de 600 souris pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est l'optimal requis pour analyser de manière fiable et statistique la stratégie expérimentale développée précédemment. Ce projet a été conçu de manière à respecter la règle des 3 R.

Remplacement : La cicatrisation cutanée est un phénomène complexe et prolongé dans le temps reposant sur de nombreux types cellulaires. Le transfert des cellules fœtales de la moelle vers la peau au cours de la cicatrisation nécessite un organisme entier dont la complexité ne peut être recréée in vitro.

Réduction : A cause des variabilités inter-animales et intergroupes, un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables et non valides. La taille minimale des groupes expérimentaux ne peut pas être déterminée a priori par un test statistique. En accord avec notre expérience et la littérature, il faudra 12 animaux par groupe pour obtenir des résultats

statistiquement significatifs. Des tests biostatistiques non paramétriques seront réalisés (test de whitney-mann-wilcoxon). Par ailleurs, nous utilisons le dispositif anti-contraction pour faire les plaies permettant de limiter au maximum la variabilité technique dû aux contractions des plaies chez les souris. De plus, les expériences seront regroupées afin de limiter le nombre de groupes contrôles.

Raffinement : Dans le respect du bien-être animal et pour limiter la douleur et le stress, les biopsies cutanées seront réalisées sous anesthésie générale et une analgésie pré et post-opératoire sera administrée. Les conditions d'hébergement sont :

- Hébergement en portoirs ventilés en pression positive (4 souris/cages)
- Salle d'hébergement en surpression
- Cycle nyctémère de 12h (8h-20h jour / 20h- 8h nuit)
- Hygrométrie est de 55% (+/- 10%)
- Température comprise entre 20°C et 24°C
- Change litière/abreuvement/nourriture 1 fois par semaine + vérification quotidienne.

Nous veillerons également à l'enrichissement de l'environnement de nos souris, à l'aide de maison de type igloo et de maisonnettes et de coton, disponibles au sein de l'animalerie. Les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum.

Des points limites précis ont été définis en termes d'aspect des animaux, de comportement (locomotion), de perte de poids et de signes de douleurs ; ces points limites nous permettront de mettre à mort les animaux de façon anticipée en cas de détérioration marquée de l'état général, afin de limiter toute souffrance.

Par ailleurs, les animaux ne présentent pas de phénotypes dommageables dans les conditions d'élevage au sein de notre animalerie.

Les résultats de ces travaux devraient permettre de proposer de nouvelles approches thérapeutiques pour les plaies chroniques chez l'homme.

19676 Le syndrome d'apnées du sommeil (SAS) est le trouble respiratoire nocturne le plus fréquent dans la population. Il produit des variations constantes de pression partielle en oxygène entraînant une hypoxie intermittente : HI, qui a des conséquences systémiques majeures telles que hypertension, troubles respiratoires, résistance à l'insuline, et cellulaires telles que stress oxydatif, inflammation. Le sexe biologique est un facteur de risque important : il y a plus d'hommes que de femmes atteintes de SAS (pour un ratio de 2:1) et chez les femmes la prévalence du SAS augmente après la ménopause. De plus le SAS n'induit pas d'hypertension chez les femmes, suggérant une protection hormonale, et un rôle potentiel pour l'hormonothérapie chez les femmes ménopausées souffrant de SAS. Un obstacle important à ce développement est que les connaissances cliniques et fondamentales sur les interactions entre les hormones ovariennes et l'HI sont très peu connues. Par exemple, on ne sait pas par quel récepteur et dans quel tissu ces hormones seraient efficaces contre les conséquences de l'HI.

Le présent projet a pour but de déterminer l'effet de l'ovariectomie sur la pression artérielle, l'activité électrique du cœur et la résistance à l'insuline (3 paramètres précédemment étudiés chez les mâles soumis à l'HI) à la suite de l'exposition de souris femelles à l'HI, mimant le SAS.

Ce projet nécessitera 126 souris femelles et mettra en œuvre des modèles expérimentaux in vivo et in vitro.

Les souris femelles subiront une ovariectomie sous anesthésie et des analgésiques pré et post opératoires seront utilisés. Ensuite, elles seront exposées à la normoxie ou à l'HI. A différents temps d'exposition à l'HI ou à la normoxie, des mesures de paramètres métaboliques seront effectuées. A l'issue du protocole d'exposition, les animaux seront mis à mort pour étudier, dans différents organes et tissus, l'effet de l'HI et de l'ovariectomie via des techniques in vitro, de biologie cellulaire, moléculaire et de biologie des protéines.

Le choix de travailler avec des souris exposées à la normoxie ou à l'HI s'est fait car l'utilisation d'un modèle murin est encouragée par des travaux précédents dans lesquels ont été reproduits les

conséquences délétères du SAS. Tous les échantillons seront conservés de façon optimale dans le but de pérenniser le matériel de travail. Le choix des techniques est varié et nous sommes dans l'obligation d'utiliser diverses techniques (in vivo et in vitro) pour tester des hypothèses très mécanistiques.

La règle des 3R a été respectée au maximum. Pour ce projet, le modèle animal ne peut être « remplacé » par un autre modèle cellulaire puisqu'il n'existe aucune méthode alternative à l'expérimentation animale permettant de comprendre l'effet de l'HI sur les organes et l'organisme entier. En revanche, suite à des travaux antérieurs, le nombre d'effectif par groupe pour observer des éventuelles différences significatives a été « réduit » au maximum. Un logiciel d'analyses statistiques sera utilisé pour réaliser des tests statistiques adaptés aux paramètres à évaluer (t-tests, tests de variance unidirectionnelle (ANOVA) suivis de tests post-hoc). Enfin le « raffinement » consiste en un hébergement selon les règles de bien-être des animaux dans une animalerie adaptée et autorisée. Les animaux ne seront jamais manipulés dès leur arrivée dans l'animalerie mais uniquement après une semaine de stabulation. Les animaux seront observés quotidiennement dans leur cage pendant toute la durée de l'hébergement et du protocole d'hypoxie, et pesés au moins une fois par semaine, pour s'assurer de leur bien-être, de leur état de santé et de l'atteinte des points limites. L'eau et la nourriture seront à volonté et des enrichissements seront à leur disposition dans les cages d'hébergement, les cages exposées à la normoxie ou à hypoxie étant exemptes de tout enrichissement. Pour le bon déroulement du projet, les expériences seront réalisées par des expérimentateurs expérimentés. Pour toute procédure invasive ou occasionnant de la douleur, les souris seront anesthésiées. En cas d'apparition de signes de souffrance (prostration ou immobilité prolongée, absence de toilettage, isolement, apathie vocalisation inhabituelles...) ou blessure, saignement, irritation importante, agressivité non naturelle envers ses congénères, perte de poids supérieure à 15% de la masse corporelle au cours du protocole, l'animal concerné sera retiré du protocole. Le responsable de projet prendra la décision d'exclure un animal s'il a atteint l'état critique des points limites. Pendant la période d'exposition à l'HI, les animaux feront l'objet d'une surveillance accrue et d'un suivi du poids tous les deux jours. Néanmoins, lors des dernières études réalisées, il a été très rare de voir des animaux atteindre une perte de poids de 15%. Concernant le suivi postopératoire, la suture sera examinée quotidiennement. Si une ouverture ou une infection de la plaie chirurgicale sont observées, le personnel de soins ou le vétérinaire de l'animalerie seront avisés rapidement pour qu'ils procèdent au traitement adéquat.

D'un point de vue scientifique, ce travail servira de prémices à la compréhension de la physiopathologie du SAS dans un contexte hormonal, en améliorant les connaissances sur les interactions entre les systèmes hormonaux et les conséquences de l'HI. In fine, cela permettra de mieux comprendre pourquoi les hommes et les femmes souffrant de SAS développent des conséquences distinctes.

19677 Ce projet a pour but d'évaluer les effets potentiellement nauséux de nouveaux candidats-médicaments dans un modèle de conditionnement au goût chez le rongeur, modèle bien décrit dans la littérature. Pour cela, les animaux suivront une procédure classique d'apprentissage associatif dans laquelle ils apprendront à associer une boisson spécifique avec un état physique (exemple = eau associée à un état normal ; une boisson sucrée associée à un état nauséux). Ils pourront alors exprimer qu'ils ressentent les effets nauséux d'un candidat-médicament en évitant de consommer la boisson sucrée associée à cet état.

Pour ce projet, il est prévu un nombre maximal de 1500 animaux sur 5 ans (750 souris/750 rats).

La conception de ce projet prend en compte la règle des 3R.

Remplacement : dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le rongeur car il n'existe pas de méthode de substitution (in vitro ou in silico) pour évaluer les effets d'une nouvelle molécule sur ses effets nauséux ou son potentiel à modifier les capacités cognitives. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité, la toxicité et la pharmacocinétique d'un candidat médicament. A ce jour, le rongeur est l'espèce qui est la plus adaptée à ce type de modèle d'étude.

Réduction : Un nombre minimal et suffisant d'animaux par groupe est utilisé afin d'analyser de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et d'effectuer des analyses statistiques.

Raffinement : dans ce projet, le raffinement sera obtenu par :

- . le suivi des signes cliniques (mesure du poids, observation de l'état général de l'animal et signes de déshydratation)
- . le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.
- . Une restriction hydrique limitée sur la période d'inactivité des animaux et un accès ad libitum sur des plages de temps suffisantes pour permettre un apport hydrique normal
- . La familiarisation des animaux aux procédures expérimentales (habituation à un accès contrôlé à l'eau)
- . Un enrichissement particulièrement important dans la cage d'hébergement pour les animaux isolés

19678 Le projet consiste à développer différents vaccins contre le SARS-CoV2 (COVID-19), Influenza (Grippe) et PCV2 (circovirus porcin) et à définir les meilleures compositions et voies d'injections. En l'état actuel des connaissances technologiques, il n'est pas possible de réaliser ce type d'expérience totalement in vitro et donc de remplacer l'utilisation d'animaux, notamment en ce qui concerne l'induction de réponse immunitaire primaire. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, les formules moléculaires seront analysées et présélectionnées par une série d'essais in vitro sur cellules immunitaires en culture. Cette sélection in vitro des meilleures formules moléculaires contribuera à réduire le nombre d'individus inclus dans l'expérimentation animale et permettra d'affiner le protocole d'immunisation en fonction du type de réponses immunitaires désirées. Seules les formules présentant un intérêt entreront dans les immunisations chez la souris. Un calcul des effectifs nécessaires basé sur une variable biologique simple (production d'anticorps) nous permettra d'atteindre une significativité des résultats avec un minimum d'animaux. Enfin, les contrôles positifs (antigène immunogène connu) seront co-administrés avec les antigènes testés pour mutualiser les groupes et réduire le nombre d'animaux nécessaires. Afin de raffiner notre approche in vivo, les effets toxiques et inflammatoires potentiellement délétères pour les animaux seront aussi testés in vitro. De plus, les animaux seront toujours hébergés en groupes avec un enrichissement du milieu. Un suivi quotidien des animaux sera réalisé. L'utilisation d'analgésique sera réalisée si nécessaire et suivant les procédures décrites dans ce projet afin de réduire au minimum la douleur, la souffrance et l'angoisse de l'animal. Pour ce projet, nous utiliserons 400 souris d'un projet déjà autorisé dans un autre établissement utilisateur (EU) et qui seront finalement manipulées dans l'EU mentionné dans cette DAP.

19679 Le projet s'inscrit dans le cadre de l'intérêt de la santé et du bien-être de l'homme et du respect de l'environnement. Le laboratoire étudie la biologie des moustiques et teste l'efficacité de substances actives ou de préparations insecticides sur des souches de moustiques nuisants. Ces études nécessitent la production d'une quantité importante de moustiques de populations différentes, de l'oeuf à l'adulte en insectariums. A cette fin, les élevages de moustiques nécessitent la réalisation de repas de sang qui ne peuvent pas toujours être réalisés artificiellement. Ces repas sont effectués sur cobayes anesthésiés, exposés aux piqûres de moustiques dont les espèces ne tolèrent pas ou mal le repas de sang artificiel. Hormis la réalisation d'une piqûre d'anesthésiant en sous-cutanée aucune autre manipulation n'est effectuée sur les animaux. Cette injection permet la réduction du stress et de la gêne liée à la manipulation de l'animal ou aux piqûres de moustiques. Aucune démangeaison, allergie cutanée, inflammation, aucun comportement anormal ou apparition de pathologies dus à l'ensemble de la procédure et à sa répétition n'est observé. Dans un souci de réduire la fréquence d'exposition à l'anesthésique et aux piqûres de moustiques, un intervalle minimal de 15 jours est respecté entre deux utilisations du même individu. La procédure nécessite 12 cobayes pour maintenir 10 souches de moustiques. De plus, le personnel habilité a recours à un procédé d'alimentation artificiel pour insectes. Bien que cette méthode alternative ne se substitue pas entièrement à l'animal vivant, elle permet de limiter l'exposition des animaux. Le nombre de cobayes utilisés au total sur 5 ans est estimé à 30. Vivant naturellement en groupe, les cobayes

sont élevés en cage par paire. Les animaux reçoivent, en plus des soins et visites quotidiennes obligatoires, une attention particulière et des soins spécifiques : supplémentation en vitamine C, coupe régulière des griffes, régime de fruits et légumes frais adaptés à leur physiologie. Leur condition de vie et la qualité des soins leur permettent une espérance de vie moyenne de 4 ans. Au-delà, ils sont proposés à l'adoption.

19680 Afin qu'un nouveau composé devienne un médicament sûr et efficace, des études précliniques doivent être réalisées afin de vérifier l'effet du composé sur les grandes fonctions de l'organisme (système respiratoire, système cardiovasculaire, système digestif, système nerveux central, fonction rénale...). L'objectif de ce projet est la réalisation des études de Pharmacologie de sécurité et d'efficacité chez le rongeur (rat et souris). Ces études sont requises par la réglementation avant les essais cliniques chez l'homme ou une étape nécessaire dans le développement du produit pour s'assurer de son efficacité. Il n'est pas possible de substituer l'animal par des méthodes alternatives car le modèle doit pouvoir mimer au mieux les interactions complexes biologiques et physiologiques retrouvées chez l'être humain. Le choix du rongeur se justifie par la nécessité d'une analogie entre l'animal et l'Homme et en prenant en compte les données scientifiques disponibles. Le nombre d'animaux utilisé est adapté à la nécessité d'évaluation des résultats sur un effectif suffisant et correspond à ce qui doit être mis en œuvre pour des études de ce type. Ce nombre est estimé à 8950 animaux. Dès que cela est possible, l'évaluation de plusieurs fonctions physiologiques sera réalisée au sein d'une même étude, réduisant ainsi le nombre d'animaux utilisés. Ces études consistent en une administration unique ou répétée du produit à tester, suivi d'observations régulières des animaux, de la consommation alimentaire et du poids, et évaluation des effets du produit sur la fonction rénale, sur les paramètres respiratoires ou cardiaques, sur le système digestif ou sur d'autres fonctions. Des prélèvements de sang peuvent être faits pour évaluer l'exposition au produit ou dans le cadre de l'évaluation.

Pour améliorer leur bien-être, les animaux sont hébergés en groupes sociaux dès que cela est compatible avec la procédure expérimentale. Les animaux sont hébergés sur litière et reçoivent un enrichissement adapté tel que papier kraft, bâtonnets de bois à ronger et tunnels. Des points limites précoces sont appliqués de telle sorte qu'en cas de signes cliniques ayant des répercussions significatives sur l'animal, des mesures sont rapidement prises pour limiter la souffrance (mise en place d'un traitement analgésique, diminution de la dose testée, suspension de la procédure ou euthanasie).

19681 L'addiction est une pathologie cérébrale caractérisée par des aspects compulsifs et chroniques. L'auto-administration de substances addictives a montré que le modèle murin est pertinent pour l'étude pré-clinique. Ce modèle a déjà permis d'identifier des aspects cellulaires et moléculaires des adaptations neuronales induites par l'administration de drogues d'abus. Ainsi, les substances addictives induisent des changements du nombre de synapses dans une structure cérébrale fortement impliquée dans l'addiction : le striatum. Nous avons publié une étude montrant que la cocaïne induit la formation de synapses sur les neurones du striatum, et nous avons démontré que cette formation est contrôlée par la voie de signalisation des MAPkinases. Cependant, le mécanisme moléculaire précis reste à identifier. Notre projet vise à tester l'hypothèse selon laquelle la protéine WAVE2 serait impliquée dans la formation de nouvelles synapses. Identifier un tel rôle représente une piste thérapeutique potentielle. Nous avons généré des vecteurs viraux avec une stratégie dite dominant-négatif afin de tester notre hypothèse. Notre objectif est d'étudier le rôle de WAVE2 dans la formation de synapses induites par l'administration de cocaïne et d'établir une relation avec les comportements addictifs.

Cette étude sera réalisée chez la souris *Mus musculus* et il a été estimé que 280 individus seront nécessaires pour le projet. La règle des 3R sera scrupuleusement respectée. Pour le remplacement, celui-ci n'est pas possible : Notre projet vise à étudier la formation de synapses glutamatergiques entre le cortex et le striatum, et leur formation dépend de la libération de dopamine venant des axones de l'aire tegmentale ventrale. Ainsi, notre projet nécessite une approche *in vivo* puisque le phénomène étudié prend place dans l'interaction entre plusieurs structures cérébrales.

Pour la réduction, l'analyse statistique des études sera optimisée afin de réduire le nombre d'animaux utilisés pour chaque expérience. De plus, nous savons de nos expériences passées et publiées, combien d'animaux sont nécessaires tout en limitant ce nombre au minimum. Pour le raffinement, les animaux venant de l'extérieur bénéficieront d'une acclimatation d'une semaine. Ils seront hébergés avec un cycle jour/nuit adapté et avec la boisson et la nourriture ad libitum. Les cages sont enrichies avec un nid. Les souris feront l'objet d'un contrôle quotidien par une personne compétente. Ces contrôles doivent permettre de repérer tout animal malade ou blessé et de prendre les mesures appropriées. Des méthodes seront mises en place pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux (injection d'antalgiques ou bien euthanasie par injection d'une surdose d'anesthésique).

19682 Ce projet de recherche fondamentale, durant 60 mois, vise à déterminer le rôle du sommeil paradoxal (SP) et de son activité cérébrale sur la consolidation de la mémoire émotionnelle et l'apprentissage olfactif. Le sommeil chez les mammifères s'organise en deux états distincts, le sommeil lent et le SP. Ce deuxième sommeil est le principal siège des rêves présentant souvent un fort contenu émotionnel. L'hypothèse classique suggère que le SP serait un état favorable au traitement des émotions et au renforcement des souvenirs pertinents pour l'individu. Le but de l'étude est de :

1-rechercher l'impact d'un stress chronique, de l'apprentissage émotionnel (de peur) et olfactif sur l'activité neuronale lors du SP et de

2- démontrer que le SP joue un rôle dans l'apprentissage olfactif.

Dans ce contexte, nous utiliserons des animaux, issus d'un croisement d'une souche de souris transgénique TRAP2, et d'une souche de souris *cfos::GFP*. TRAP2 permet de marquer définitivement l'activation neuronale à un instant *t* de la vie de l'animal. Ainsi, nous pourrions analyser l'activation neuronale avant et après chaque apprentissage ou stress chronique en condition basale et après une privation de SP. Ces souches sont viables et fertiles : aucune anomalie de l'expression du transgène n'est indiquée dans la littérature.

Ce projet prévoit un nombre de 190 souris mâle de type transgénique TRAP2 *cfos::GFP* réparties en 6 lots expérimentaux. Tous les animaux seront soit exposés à la procédure 1 (impact du Stress chronique sur l'activité neuronale lors du Sommeil Paradoxal), la procédure 2 (Impact de l'apprentissage émotionnel sur l'activité neuronale lors du Sommeil Paradoxal) ou la procédure 3 (Etude de l'interaction entre apprentissage olfactif et Sommeil Paradoxal). Toutes seront mises à mort en fin de procédure pour des analyses post-mortem des cerveaux. Suivant les lots, l'animal sera soumis à différents protocoles :

Protocole 1 (classe modérée) : Les animaux seront implantés d'électrodes EEG/EMG sous anesthésie. Cette procédure est utilisée depuis de nombreuses années dans notre laboratoire et optimisée pour limiter son impact sur le bien-être animal. Après une période de récupération, les animaux sont enregistrés en barils individuels afin d'identifier leur activité cérébrale. Des mesures d'enrichissements seront mises en place pour permettre à l'animal d'exprimer un maximum de comportements naturels et compenser son isolement social durant les expérimentations.

Protocole 2 (classe modérée) : Ensuite, nous exposerons les animaux, âgées de 12-16 semaines, à une privation spécifique de SP. Cette privation conduit, une fois terminée, à une accumulation du SP dans un court laps de temps permettant d'observer son activation neuronale soit par injection d'hydroxytamoxifen (4-OHT), marquant définitivement l'activation neuronale à un instant *t* (TRAP2), soit par l'expression directe de *c-Fos*. Cette procédure a été initialement élaborée, au sein de notre laboratoire, afin de limiter l'impact de l'expérimentation sur le bien-être animal.

Protocole 3 (classe modérée) : Pour confirmer l'influence du stress chronique sur l'activité du SP, un lot expérimental sera soumis à une succession quotidienne de stress léger pendant 7 jours. L'injection de 4-OHT et la perfusion se feront après un rebond de SP. Nous observerons alors par techniques d'immuno-marquage l'activation neuronale présente durant le SP avant et à la fin de la semaine de stress.

Protocole 4 (classe modérée) : Dans un autre lot expérimental, les animaux seront soumis à un conditionnement de peur associé à un contexte suivi d'un rebond de SP (injection 4-OHT). Quelques jours plus tard, une évaluation d'un rappel au contexte sera effectuée sans stimulus de peur. Finalement, l'animal sera soumis à un rebond de SP puis perfusé. Nous évaluerons tous les jours leur état de santé durant la procédure. Cette dernière permettra d'évaluer l'impact de l'apprentissage émotionnel sur l'activation neuronale durant le SP.

Protocole 5 (classe modérée) : Nous présenterons des odeurs aux derniers lots expérimentaux dans le but d'observer l'activation neuronale durant le SP suite à un apprentissage olfactif ainsi que l'influence d'une privation chronique de SP sur cet apprentissage. Cette procédure consiste en la présentation de deux énantiomères de limonènes durant plusieurs jours. Nous validerons ensuite l'apprentissage par un test discriminatif de ces odeurs. Puis, les animaux seront suivis le lot expérimental perfusés après un rebond de SP ou une présentation d'odeur. Le limonène étant une odeur appétitive, elle n'induit donc pas d'effet négatif sur le bien-être animal.

L'étude du sommeil et son rôle dans l'exécution de tâches comportementales nécessite de travailler sur l'animal vivant non anesthésié. Nous ne pouvons pour l'instant envisager l'utilisation de modèles strictement in vitro. Certains de ces actes induisent un stress faible ou modéré. Une prise en charge de la douleur est réalisée pendant et après l'implantation. Chaque acte est également espacé dans le temps pour diminuer le stress. Un suivi du bien-être animal est réalisé quotidiennement.

Exigences des 3R :

Remplacement :

Le SP est un état de vigilance spécifique aux mammifères. Son étude ne peut être conduite sur des animaux de niveau phylogénétique inférieur (mouche, poisson rouge...). La neuroimagerie humaine, la modélisation in silico ou les cultures cellulaires ne constituent pas encore d'alternatives crédibles au modèle rongeur pour l'étude de mécanismes cellulaires, de la mémoire et de l'apprentissage. C'est pourquoi nous profiterons des avantages que procure l'utilisation de souris de types transgéniques afin d'analyser ces processus neurobiologiques complexes.

Réduction :

La petite taille des lots de souris a été calculée au plus juste à partir de nos études antérieures utilisant les mêmes tests comportementaux dans le but de générer des données reproductibles dont la significativité sera validée par les tests statistiques adaptés. Elle tient donc compte des "erreurs et échecs" qui peuvent survenir à chaque étape de la procédure expérimentale depuis la préparation des animaux sous anesthésie mais aussi lors des tests expérimentaux pour lesquels il est connu qu'un nombre non négligeable d'animaux ne répondent pas de manière satisfaisante, nécessitant de facto leur retrait des échantillons expérimentaux.

Raffinement :

De par notre expérience d'utilisateurs d'animaux à des fins scientifiques, nous sommes conscients que notre étude requiert que les individus soient constamment placés dans les meilleures conditions psychophysiologiques. Les conditions d'élevage, de soins post-opératoires, d'hébergement et les différentes étapes de la procédure expérimentale sont maîtrisées. Les expérimentations seront réalisées par des personnels compétents, formés et suivis dans leur carrière dans le cadre de leur formation continue de l'expérimentation animale.

Des critères fixés d'interruption des expérimentations et d'exclusion (souffrance physique et psychique, perte de poids...) seront estimés avec une grille d'évaluation quotidienne, leur impact étant délétère sur le sommeil, les capacités d'apprentissage et de mémorisation.

Mots clés : Sommeil Paradoxal, TRAP2, olfaction, émotion, mémoire

19683 L'injection intraveineuse de Concanavalline A (ConA) est un modèle largement utilisé d'hépatite aiguë chez la souris. Contrairement à plusieurs autres modèles de lésions hépatiques aiguës, celles induites par la ConA sont principalement médiées par l'activation et le recrutement de cellules T inflammatoires dans le foie. Le modèle ConA a des caractéristiques de pathogenèse et des similitudes pathologiques importantes avec des hépatites humaines autoimmunes, l'hépatite virale

aiguë ou des atteintes de toxicité médicamenteuse conduisant à une activation du système immunitaire et inflammatoire.

La finalité de cette étude est d'analyser l'effet anti-inflammatoire et protecteur de nos composés dans un modèle de souffrance hépatocytaire.

Aucun modèle in-vitro ou ex-vivo n'existe pour mimer toutes les composantes inflammatoires ainsi que les souffrances induites aux hépatocytes hépatiques. Un travail important est réalisé au préalable in-vitro sur des cellules humaines dans le but de sélectionner les meilleures molécules à développer. Nous veillerons à ne tester que des molécules les plus avancées dans leur développement et les plus optimisées pour des études in-vivo, présentant une absence de toxicité cellulaire ainsi que des propriétés ADME et de pharmacocinétiques adéquates permettant d'envisager une efficacité in-vivo.

Le projet se découpe en 2 phases : une pilote (80 animaux) et une phase expérimentale (360 animaux). Au total, sur l'ensemble des 3 années du projet: 440 animaux maximum seront utilisés.

Les souris se verront administrer un composé ou un placebo par voie orale 1h avant l'induction de la pathologie hépatique par la ConA. La ConA injectée par voie intra veineuse dans la veine de la queue, aura pour objectif d'engendrer une souffrance hépatocytaire aiguë et le relargage dans la circulation sanguine de transamines (ALT et AST) témoignant de l'inflammation hépatique. Un prélèvement sanguin dont l'étude pilote déterminera le temps optimal suivi d'une mesure de ces transaminases dans le plasma permettra ainsi d'évaluer l'effet des composés testés. Nous serons tout particulièrement vigilants quant au suivi clinique des animaux tout au long des études. Tout animal présentant des modifications de comportement, des signes de prostration ou de souffrance visible sera exclu de l'expérience et euthanasié. Un avis vétérinaire sera demandé en cas de besoin. Les souris seront hébergées en groupe de 5 à 6 animaux en cages jetables type Innovive et auront à leur disposition de l'eau et de la diète à volonté ainsi qu'un environnement enrichi pour permettre l'interaction sociale (dômes plastiques rouges pour se cacher et des plaques de ouate). Il est à noter que ce modèle de ConA est un modèle réversible c'est à dire que les animaux récupèrent une fonction hépatique normale spontanément au bout de quelques jours.

Le test statistique t de student pour échantillons indépendants sera utilisé pour montrer l'effet d'une dose par rapport au groupe contrôle ou au groupe de référence (correction Mann Whitney en cas d'absence de normalité), et le test Anova sera utilisé pour comparer les différentes doses ou différents composés testés entre eux. Une valeur de $p < 0.05\%$ sera utilisée pour déterminer la valeur statistique.

19684 L'immunisation contre les antigènes majeurs du SARS-CoV-2 est la stratégie développée par les vaccins anti-COVID19 avec les plateformes mRNA et Adénovirus. L'effet attendu de la vaccination contre l'infection par les coronavirus y compris le SARS-CoV-2 est la montée d'une immunité adaptative protectrice chez l'individu vacciné qui est validée principalement par la présence d'anticorps dirigés contre la protéine S. La limitation de cette stratégie vaccinale est un risque de générer des mutations chez le virus pouvant le rendre résistant. Ceci peut s'avérer être le cas si la protection contre l'infection virale n'est pas optimale parmi certains groupes de population dont les sujets ayant un système immunitaire moins efficace due à des désordres du métabolisme comme le diabète. Il est donc important de proposer une stratégie vaccinale alternative qui ciblerait plus particulièrement cette catégorie d'individus. La stratégie proposée ici repose sur la délivrance de peptides viraux (PV) issus des antigènes majeurs du SARS-CoV-2 et greffés à des nanoparticules d'or (AuNPs) dans la cellule immunocompétente afin d'initier une réponse humorale spécifique contre le pathogène.

L'utilisation de protéines seules ou de peptides d'intérêt seuls pour une immunisation peut ne pas déclencher une réponse immunitaire suffisamment efficace. Dans les techniques d'immunisation classiques, l'ajout d'un adjuvant à des protéines d'intérêt ou l'ajout de la protéine KLH à des peptides d'intérêt servent à augmenter la réponse immunitaire. L'injection d'AuNPs-peptides viraux (AuNPs-PV) chez la souris est une stratégie vaccinale originale qui sera comparée à ces 2 techniques d'immunisation classiques.

Dans un 1er temps, deux voies d'injection seront testées afin de sélectionner la voie génératrice d'une réponse immunitaire plus importante : la voie sous-cutanée (SC) et la voie intramusculaire (IM). Le pouvoir antigénique pouvant varier en fonction des antigènes, 3 KLH-peptides S et la protéine S complète couplés à l'adjuvant de Freund (méthode vaccinale classique) seront injectés par voie SC ou IM à des groupes de 5 souris. Lors de cette 1ère étape, 40 souris seront nécessaires (procédure 1).

Dans un 2e temps, 2 KLH-peptides N et la protéine N (nucléocapside) complète couplés à l'adjuvant de Freund seront utilisés pour d'autres immunisations via la voie d'injection sélectionnée à l'étape précédente afin d'obtenir des anticorps dirigés contre ces antigènes. Pour cette étape, 15 souris seront nécessaires (procédure 2).

La dernière étape consistera à tester notre stratégie de vaccination en utilisant les 3 peptides S et les 2 peptides N utilisés lors des étapes précédentes et greffés cette fois-ci à des AuNPs. Cette étape nécessitera 25 souris (procédure 2).

Au total, 80 souris seront nécessaires à la réalisation de ce projet. Des prélèvements de sang seront nécessaires pour le suivi de l'évolution de l'immunisation.

Remplacement : l'évaluation du pouvoir vaccinal ne peut se faire que sur un système vivant complet.

Réduction : les tests de voie d'injection servent à déterminer la meilleure voie d'administration pour une meilleure réponse immunitaire et permettent de réduire le nombre d'animaux utilisés dans les étapes suivantes. Si certains peptides ne montrent pas de pouvoir antigénique lors de cette étape, ils ne seront pas utilisés dans l'étape impliquant les AuNPs.

Raffinement : les souris seront hébergées dans des cages munies d'enrichissement, dans une salle avec un environnement contrôlé (cycle jour/nuit, température, hygrométrie, ventilation, bruit). L'eau et la nourriture seront disponibles à volonté. Les souris seront observées et pesées régulièrement afin de suivre leur état de santé.

19685 L'arthrite rhumatoïde est une maladie inflammatoire chronique dégénérative qui touche les articulations et se traduit cliniquement par une inflammation, un gonflement, des douleurs et raideurs articulaires. C'est une maladie auto-immune caractérisée par un dérèglement du système immunitaire et l'apparition d'auto-anticorps. Plusieurs cytokines sont impliquées dans le processus inflammatoire pathologique et dans les destructions tissulaires associées. Les nouveaux traitements de biothérapies ciblent ces cytokines et cellules inflammatoires: TNF-alpha, IL1, IL6, lymphocytes T et B.

L'objectif de ce projet est d'évaluer la tolérance et l'efficacité de nouvelles thérapies contre l'arthrite rhumatoïde dans un modèle pathologique chez le lapin. Le projet comportera 2 phases: 1) la mise au point et la caractérisation du modèle par différentes techniques d'induction, 2) l'évaluation comparative des traitements de biothérapie.

On estime qu'un nombre de 200 lapins maximum seront utilisés pour les 5 ans de la demande, soit environ 40 lapins par an.

Principe des 3R :

Remplacement : Remplacement : La mise au point, l'évaluation et l'optimisation des traitements nécessitent l'utilisation d'un système in vivo reproduisant les conditions cliniques pathologiques : anatomie et physiologie, cibles thérapeutiques, critères d'évaluation, régime de traitement. En amont, des méthodes in vitro sont utilisées pour vérifier l'affinité, le mécanisme d'action ou la toxicité des produits testés.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisés pour chaque étude est estimé d'après les données de la littérature, l'expérience de notre établissement et les guides réglementaires sur le nombre d'individus nécessaire pour réaliser une analyse statistique pertinente. Classiquement, un même traitement est administré à 4 à 6 animaux.

• Raffinement : Les animaux seront hébergés dans des cages individuelles. Le milieu est enrichi par des plateformes, morceaux de bois pour que les animaux puissent jouer, ainsi que des carottes, du persil et du foin. Une visite quotidienne est effectuée. Un protocole de suivi des animaux est mis en

place, avec évaluation de la douleur, traitement analgésique systématique et symptomatique et points-limites.

19686 Dans l'organisme, les artères et les veines sont les principaux sites de thrombose, c'est à dire les lieux de formation d'un caillot de sang au sein du vaisseau. Les conséquences de ces thromboses sont importantes et peuvent mettre en jeu la vie des personnes.

La thrombose artérielle reste la pathologie la plus connue, de par ses maladies associées : infarctus du myocarde, accident vasculaire cérébral, etc. . Les principaux médicaments antiplaquetaires utilisés lors d'un traitement ont permis de réduire considérablement la survenue de nouveaux épisodes thrombotiques. Malheureusement, l'utilisation de telles substances peut provoquer des risques de saignement chez les patients. Nous avons développé un agent dirigé contre un récepteur des plaquettes qui inhibe la thrombose artérielle chez la souris et le singe sans entraîner de risque hémorragique. Cette molécule a été testée chez l'homme : elle présente une bonne tolérance et fait l'objet d'une étude clinique chez des patients présentant un accident vasculaire cérébral.

Parallèlement, d'autres études ont démontré la participation active des plaquettes dans la thrombose veineuse. Le risque majeur chez ces personnes est le devenir des caillots formés au niveau des veines, pouvant se loger au niveau des poumons et provoquer une embolie pulmonaire. L'objectif de cette étude est d'évaluer si notre molécule et sa cible jouent un rôle dans la thrombose veineuse.

Pour cette étude, nous utiliserons et caractériserons un nouveau modèle de thrombose veineuse dans la souris. Ce modèle repose sur l'inhibition de 2 protéines majeures de la coagulation par administration dans la circulation sanguine, de petits ARN interférents bloquant leurs expressions. Le modèle induit une thrombose veineuse dans les vaisseaux, qui est proportionnelle à la dose de siRNA injectés après 2-3 jours. Les conséquences sont similaires à une thrombose veineuse chez l'homme avec un déséquilibre accru des facteurs de coagulation, un phénotype pro-coagulant. En combinant un marqueur spécifique de la thrombose et une technique d'imagerie adaptée, nous pourrions observer aux temps précoces, l'apparition d'agrégats fibrino-plaquetaires chez l'animal. Les animaux consommant les facteurs de coagulations et des plaquettes ont un risque de saignement accru et peuvent déclencher des hémorragies. L'avantage de ce modèle est qu'il reproduit particulièrement bien la thrombose veineuse chez l'homme et peut donc permettre d'identifier de nouvelles cibles pour traiter cette maladie particulièrement dangereuse chez l'homme.

Réduction

Le modèle de thrombose veineuse présente l'avantage d'être extrêmement facile à mettre en œuvre et a déjà été publié. Ceci permet d'éviter toute mise au point utilisant des animaux supplémentaires. De plus, le nombre d'animaux utilisés dans chaque groupe sera le plus petit possible, soit 8, afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. Nous utiliserons un test Mann-Whitney ou un test ANOVA pour comparer les différents groupes avec un post-test de Dunn.

Ces choix permettent de réduire considérablement le nombre d'animaux nécessaires.

Raffinement

Un soin particulier sera apporté afin de diminuer le stress et la douleur de tous les animaux utilisés dans ce projet.

Pendant toutes les expérimentations, les animaux sont surveillés par du personnel entraîné. Pour les procédures invasives, un traitement anesthésique et analgésique sera administré aux animaux. Si les points limites définis dans cette saisine sont atteints, les procédures expérimentales seront interrompues afin de réduire la souffrance induite à l'animale.

Remplacement

Il est impossible de reproduire la thrombose veineuse in vitro en raison de sa complexité. En effet le risque hémorragique dépend des interactions entre les vaisseaux et la composition du sang. Cet examen ne peut donc pas être réalisé de manière satisfaisante in vitro. En conséquence, nous proposons d'utiliser un modèle de thrombose veineuse chez la souris

Nous utiliserons 296 souris pour mener à bien ce projet.

19687 Avec un taux de croissance de 8,8% par an, l'aquaculture est le secteur agroalimentaire qui croît le plus dans le monde, et la moitié des poissons consommés proviennent de cette activité. À l'heure actuelle la connaissance du sexe de manière non invasive chez les poissons constitue une préoccupation majeure pour les éleveurs. Chez de nombreuses espèces comme le bar, la daurade, le maigre ou le turbot, le sexe de chaque poisson n'est connu que relativement tardivement : lors de la maturation, où il est alors possible de collecter les gamètes. Cela pose un souci de taille pour la gestion des géniteurs et des cheptels en général. En effet, 1) la maturation étant tardive cela complique les programmes de sélection en imposant de conserver des individus pendant de nombreuses années, alors qu'ils ne seront potentiellement pas utilisés et 2) chez la majorité des poissons, les femelles présentent de bien meilleurs taux de croissance que les mâles, avec un dimorphisme pondéral allant de 70% chez les jeunes stades à 30% chez les poissons de 2 ans et plus. La production en éclosérie de populations à majorité femelles est donc une question économiquement capitale, cet objectif sera grandement facilité par la connaissance précoce de la répartition des sexes en fonction des évolutions de stratégie de production larvaire. Nous proposons ici l'utilisation de petites molécules impliquées dans la régulation de nombreux processus biologiques circulantes dans le sang (les micro-ARN ou miARN) comme marqueur du sexe d'une espèce avec un intérêt majeur en aquaculture, le Bar (*Dicentrarchus labrax*). Le but ultime du projet étant de développer un capteur de micro-ARN spécifique du sexe mâle ou femelle et donc permettant de sexer les poissons précocement. Le miARN-184 ayant été identifié, dans nos études préliminaires, comme étant exprimé différemment entre les mâles et les femelles, nous souhaitons mieux comprendre le rôle de ce miARN par des tests fonctionnels *in vivo*. Cela consiste en l'injection d'une solution de miARN-184 de synthèse permettant de mimer ou d'inhiber l'action de ce miARN. Un total de 60 poissons sera utilisé sur l'ensemble du projet puisque 20 individus seront injectés par condition (témoins, le mime miARN et l'inhibiteur miARN). La règle des 3R a été prise en compte dans ce projet de la façon suivante : 1) Le Remplacement n'est pas possible dans le cas présent car nous étudions une espèce dans son milieu d'élevage. 2) Réduire, en utilisant le minimum de poissons pour répondre à nos objectifs. Ces effectifs ont été calculés à partir de données d'expérimentations précédentes et de la littérature pour assurer une puissance de détection suffisante des effets escomptés. Ils seront prélevés directement en condition d'aquaculture. 3) Le raffinement est assuré ici par les compétences des agents de la station expérimentale de l'Ifremer dans l'élevage du Bar. Les poissons seront placés dans des bassins en nombre suffisant pour assurer le déplacement en bancs. Les procédures d'anesthésie et d'euthanasie sont également maîtrisées par l'équipe de la plateforme et permettent de limiter le stress de l'expérience et la rapidité de la mise à mort.

19688 La Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie génétique qui touche le muscle chez l'enfant, provoquant une faiblesse musculaire généralisée et évolutive. Les patients sont contraints à l'usage du fauteuil roulant vers l'âge de 10 ans, et décèdent d'insuffisance respiratoire ou cardiaque vers l'âge de 30 ans. À ce jour, il n'existe pas de solution thérapeutique curative sur le marché pour la DMD. Cependant, il a été démontré que si l'on administre un traitement à base de corticostéroïdes, très tôt chez les jeunes patients, ils en tirent un profit en terme de prolongement de leur capacité ambulatoire et de retard de l'apparition des signes d'insuffisance respiratoire.

Les modèles animaux précliniques doivent être placés dans les mêmes conditions que les patients pour répondre au plus près aux questions de niveaux d'efficacité attendus des différentes approches thérapeutiques testées (thérapie génique, cellulaire, pharmacologique). Actuellement le traitement aux corticostéroïdes est quotidien et est plus ou moins bien toléré sur le long terme, cette étude a pour objectif de décrire de manière quantifiée et exhaustive l'effet de différentes posologies de traitement à base de Methylprednisolone sur un modèle de rat développé au laboratoire qui présente l'ensemble des symptômes observés chez les patients. Dans une étude pilote nous avons testé l'administration hebdomadaire en intramusculaire d'une dose à 0,75mg/kg sur des rats à 2 temps (encore asymptomatique mais également lorsque la maladie était établie), nous avons observé une amélioration fonctionnelle uniquement chez les rats déjà symptomatiques, aussi nous

pensons qu'il est possible que pour empêcher l'installation de la maladie chez les animaux juvéniles il faille soit augmenter la dose soit le nombre d'injections hebdomadaires.

A cette fin dans cette nouvelle étude, nous souhaitons tester trois protocoles de traitement avec des doses et des fréquences d'administration différentes par rapport à l'étude précédente. Cette étude utilisera un total de 90 rats, qui seront traités de l'âge de 3 semaines jusqu'à l'âge de 3 mois ou de l'âge de 5 mois jusqu'à l'âge de 6 mois et comparés à des rats DMD non traités et à des rats sains, suivis de la même manière et sur la même période. En fonction des résultats histologiques et fonctionnels le traitement pourra être prolongé jusqu'à 6 mois pour le traitement précoce et jusqu'à 9 ou 12 mois pour le traitement tardif.

Ce nombre d'animaux a été réduit au minimum en tenant compte de la variabilité observée dans une population de rats DMD tout en ayant suffisamment de matériel pour réaliser toutes les analyses biologiques nécessaires à l'évaluation de la maladie et devrait nous permettre de pouvoir mieux orienter la posologie du traitement pour des études ultérieures sur le long cours. Les études in vitro utilisant les corticoïdes sur les cellules myogéniques de différents modèles animaux DMD montrent une amélioration de la survie des cellules mais cela ne peut cependant pas remplacer les études in vivo pour appréhender les effets sur l'organisme entier et l'apparition éventuelle d'effets secondaires à long terme, il est donc nécessaire d'avoir recours à une validation sur notre modèle de rat.

Les rats seront évalués à l'aide de méthodes utilisées chez les patients et adaptées aux rats. Les rats seront habitués aux manipulations dès leur plus jeune âge et seront hébergés par 2-3 individus dans des cages contenant des enrichissements correspondant à leur espèce. Ils seront observés deux fois par jour afin de suivre au plus près les éventuelles complications liées à leur maladie. Des points limites précis et suffisamment précoces pour leur éviter toute souffrance prolongée et inutile ont par ailleurs été définis permettant d'intervenir soit avec des analgésiques soit par la mise à mort avant que les animaux puissent souffrir. Tout comme lors de la première étude s'il n'y avait pas d'effet sur les temps précoces, l'étude serait stoppée pour limiter le nombre de rats utilisés.

19689 La douleur est une émotion qui met en jeu un système d'alerte physiologique essentiel à l'intégrité des individus. L'évolution des recherches montre que la douleur concerne une vaste part du règne animal, jusqu'aux poissons. L'étude de la douleur permet donc de proposer des traitements thérapeutiques et des traitements vétérinaires. L'étude de la douleur est aussi une question d'éthique, puisqu'elle doit influencer nos comportements afin d'éviter de confronter des animaux, de laboratoire, de rente, en captivité, familiers, à des situations douloureuses.

La douleur peut devenir persistante, handicapante, délabrante, à la suite de remodelages inappropriés, ou irréversibles, de réseaux neuronaux. Cette situation délétère de «maladie» affecte 20% de la population, qui déclare éprouver un type de douleur persistante au moins 2-3 mois/an. L'arsenal antalgique au sens large, est pléthorique et particulièrement efficace pour prendre en charge la douleur aiguë. Cet arsenal est souvent inadapté pour des prises en charge au long cours, puisque les traitements chroniques à base d'anti-inflammatoires, de morphiniques, d'anti-dépresseurs, pour ne citer qu'eux, possèdent des effets indésirables importants. Notre projet d'équipe vise donc à proposer des nouvelles cibles pharmacologiques pour prendre en charge la douleur chronique. Notre cible est une protéine, un canal ionique, qui permet l'excitation de certains neurones et dont l'inactivation dans la moelle épinière provoque une analgésie chez la souris. Cette cible est aussi présente dans les neurones de la moelle épinière humaine.

Notre projet est axé sur le rôle de cette protéine dans la transition de l'état sain à l'état douloureux chronique et sur l'évaluation préclinique d'inhibiteurs de cette protéine. En effet, nous avons découvert que ce canal jouait un rôle dans un groupe de neurones organisé en "portillon cellulaire" qui empêche le transfert d'informations sensorielles chez l'individu sain, mais qui transmet des informations inappropriées chez le douloureux chronique.

Notre démarche est conforme à la règle des 3R et aux recommandations sur l'éthique de l'expérimentation animale de la douleur.

Remplacement:

La perception de douleur est un phénomène appréhendé par l'organisme conscient, et lui seul (excluant un travail sur cultures cellulaires). Chez l'homme, la dimension émotionnelle de la douleur est un paramètre confondant, qui rend difficile la constitution de petites cohortes homogènes. A l'inverse, les modèles animaux sont homogènes et fournissent des résultats reproductibles. La combinaison de différents modèles animaux calibrés permet d'approcher de manière paramétrée la diversité des cohortes humaines. La variété des techniques de modifications génétiques chez la souris permet de visualiser ou de cibler spécifiquement des mécanismes cellulaires ou des protéines. L'expérimentation humaine ne peut atteindre ce niveau de résolution. De même, l'état des connaissances ne permet pas encore une modélisation mathématique des phénomènes cérébraux impliqués dans ces douleurs. Nous considérons donc le recours à la souris comme guidé par des considérations scientifiques, techniques et éthiques.

Réduction:

Nous étudions la plupart des animaux nés dans nos élevages puisque nous étudions males et femelles, et variants mono- ou bi-alléliques à partir d'élevages de variants tri-alléliques par exemple. Nos principales grilles de lecture sont l'électrophysiologie, qui permet d'obtenir une multitude d'enregistrements de neurones identifiés à partir d'un seul animal, et l'immunofluorescence qui permet de réaliser une multitude de combinaisons de marqueurs à partir d'un animal. En étudiant des neurones pré-identifiés, nous évacuons l'hétérogénéité des résultats liée au grand nombre de phénotypes spinaux. Autre point, nous avons choisi un modèle de douleur chronique pour sa reproductibilité à la fois d'un animal à un autre, et aussi d'un expérimentateur à un autre. Nos méthodes statistiques concernant des données pairées ou non pairées, paramétriques ou non paramétriques sont déjà éprouvées.

Raffinement:

Les lignées choisies ont un phénotype non dommageable. Les manipulations potentiellement anxiogènes sont réalisées sous anesthésie. Les manipulations potentiellement douloureuses sont réalisées pendant une analgésie pharmacologique, et cette analgésie peut-être reconduite en cas de nécessité. Le choix du modèle SNI est orienté par le fait qu'il concerne une zone limitée au bord de la patte postérieure que les animaux protègent en adoptant une posture analgésique, simple inclinaison de la patte. In vivo, nous quantifions la douleur par une recherche des seuils (en testant le bord de la patte), et pas plus. C'est aussi l'évolution de ces seuils qui caractérisent les effets antalgiques/analgsésiques de nos candidats antalgiques. Les souris hébergées dans une animalerie EOPS (zéro pathogènes, peu d'opportunistes, zéro parasites) vivent en groupe à l'intérieur desquels elles ne reçoivent pas les mêmes traitements, ce qui élimine le stress d'isolement et la propagation de la douleur sociale. Les cages présentent un enrichissement intermédiaire qui stimule l'activité et limite l'agressivité.

Notre projet pour 5 ans impliquant une équipe de 5 à 7 personnes nécessitera 2522 souris issues de plusieurs lignées spécifiques déjà élevées dans nos animaleries. Les procédures décrites dans ce document ne nécessiteront aucune mise au point et sont des standards pour l'étude de la perception sensorielle reconnus dans le monde académique et dans l'industrie.

19690 Les maladies cardiovasculaires sont les pathologies non-transmissibles les plus communes et causent 17,9 millions de décès chaque année, ce qui correspond à 31% des décès totaux. Un excès de poids, une augmentation de la pression sanguine et une alimentation riche en sucre peuvent causer une maladie cardiovasculaire. De plus, la pollution, le tabagisme et d'autres mauvaises habitudes de vie sont des facteurs de risques de ces pathologies.

Les maladies cardiovasculaires sont un groupe de maladies qui rassemblent les maladies cardiaques congénitales, les cardiomyopathies hypertrophique et dilatée, les maladies vasculaires, les arythmies cardiaques, les myocardites.

L'athérosclérose est une maladie multifactorielle et une des premières causes de mortalité associée à une maladie cardiovasculaire. Cette pathologie chronique évolue pendant plusieurs décennies chez les patients et atteint différents organes et les cellules immunitaire. Ce processus peut être local ou systémique.

Une obésité, une intolérance au glucose et une dyslipidémie sont souvent accompagnées d'une augmentation de la pression sanguine amenant à des troubles cardiaques ou à une maladie cardiaque périphérique. A long terme, une hypertension artérielle peut éventuellement provoquer une insuffisance cardiaque et une insuffisance rénale progressive.

Les complications cardiovasculaires sont les principales causes liées à la mortalité chez les patients diabétiques. La cardiomyopathie diabétique est une dysfonction ventriculaire apparaissant chez les patients diabétiques en absence d'hypertension et de maladies des artères coronaires.

Les maladies cardiaques congénitales sont les pathologies les plus communes chez les nouveaux nés. Pendant le développement embryonnaire, presque un tiers des maladies congénitales se manifestent avec des effets sévères dans la structure et la fonction cardiaque. Ces maladies incluent le syndrome de Down (trisomie 21) et le syndrome de Marfan.

Dans le domaine de la recherche des pathologies cardiovasculaires, les animaux jouent un rôle vital. Ces modèles sont pertinents pour être manipulés et détecter des indicateurs physiologiques de ces maladies. Ces dernières années, de nombreux travaux ont été réalisés dans ce domaine grâce aux modèles animaux. Néanmoins, il n'existe à ce jour aucun traitement permanent pour traiter la plupart des maladies cardiovasculaires.

Pour être valide, un modèle alternatif aux modèles animaux devrait prendre en compte l'ensemble des phénomènes biochimiques et physiologiques qui ont lieu chez l'animal. A ce jour, les tests in vitro ou les modèles informatiques ne permettent pas de rendre compte de l'ensemble de ces phénomènes. Aucune méthode alternative n'est envisageable pour reproduire le plus fidèlement les troubles cardiovasculaires et donc, étudier le potentiel effet bénéfique de nouvelles stratégies thérapeutiques.

L'objectif du présent projet est l'élevage de lignées génétiquement modifiées de rats et de souris reproduisant des troubles cardiovasculaires. Cela permettra d'approfondir la caractérisation de ces modèles. Ultiment, ces études pourraient permettre d'identifier des substrats moléculaires et biologiques caractéristiques des maladies cardiovasculaires et de développer de nouvelles cibles thérapeutiques. Afin de satisfaire au raffinement, l'hébergement des animaux sera réalisé dans des locaux appropriés avec des conditions optimales de température et d'hygrométrie avec un cycle jour/nuit de 12h/12h. De plus, un enrichissement sera systématiquement placé dans chaque cage et le personnel sera habilité à réaliser les différentes procédures dans le respect des règles d'éthique, de bien-être animal et du principe des 3R. Les surveillances quotidiennes des animaux permettront d'identifier d'éventuels animaux en souffrance et de prendre les mesures appropriées (surveillance accrue, mise à mort dans les cas les plus graves). Le nombre d'animaux est calculé selon les protocoles expérimentaux de manière à obtenir le minimum d'animaux par groupe permettant des résultats significatifs et homogènes. Afin de constituer les différents lots expérimentaux, il est estimé que sur les 5 années du projet, un total de 3000 est nécessaire.

19691 Les maladies cardiovasculaires sont les pathologies non-transmissibles les plus communes et causent 17,9 millions de décès chaque année, ce qui correspond à 31% des décès totaux. Un excès de poids, une augmentation de la pression sanguine et une alimentation riche en sucre peuvent causer une maladie cardiovasculaire. De plus, la pollution, le tabagisme et d'autres mauvaises habitudes de vie sont des facteurs de risques de ces pathologies.

Les maladies cardiovasculaires sont un groupe de maladies qui rassemblent les maladies cardiaques congénitales, les cardiomyopathies hypertrophique et dilatée, les maladies vasculaires, les arythmies cardiaques, les myocardites. . .

L'athérosclérose est une maladie multifactorielle et une des premières causes de mortalité associée à une maladie cardiovasculaire. Cette pathologie chronique évolue pendant plusieurs décennies chez les patients et atteint différents organes et les cellules immunitaire. Ce processus peut être local ou systémique.

Une obésité, une intolérance au glucose et une dyslipidémie sont souvent accompagnées d'une augmentation de la pression sanguine amenant à des troubles cardiaques ou à une maladie

cardiaque périphérique. A long terme, une hypertension artérielle peut éventuellement provoquer une insuffisance cardiaque et une insuffisance rénale progressive.

Les complications cardiovasculaires sont les principales causes liées à la mortalité chez les patients diabétiques. La cardiomyopathie diabétique est une dysfonction ventriculaire apparaissant chez les patients diabétiques en absence d'hypertension et de maladies des artères coronaires.

Les maladies cardiaques congénitales sont les pathologies les plus communes chez les nouveaux nés. Pendant le développement embryonnaire, presque un tiers des maladies congénitales se manifestent avec des effets sévères dans la structure et la fonction cardiaque. Ces maladies incluent le syndrome de Down (trisomie 21) et le syndrome de Marfan.

Dans le domaine de la recherche des pathologies cardiovasculaires, les animaux jouent un rôle vital. Ces modèles sont pertinents pour être manipulés et détecter des indicateurs physiologiques de ces maladies. Ces dernières années, de nombreux travaux ont été réalisés dans ce domaine grâce aux modèles animaux. Néanmoins, il n'existe à ce jour aucun traitement permanent pour traiter la plupart des maladies cardiovasculaires.

Pour être valide, un modèle alternatif aux modèles animaux devrait prendre en compte l'ensemble des phénomènes biochimiques et physiologiques qui ont lieu chez l'animal. A ce jour, les tests in vitro ou les modèles informatiques ne permettent pas de rendre compte de l'ensemble de ces phénomènes. Aucune méthode alternative n'est envisageable

pour reproduire le plus fidèlement les troubles cardiovasculaires et donc, étudier le potentiel effet bénéfique de nouvelles stratégies thérapeutiques.

L'objectif du présent projet est l'élevage de lignées génétiquement modifiées de rats et de souris reproduisant des troubles cardiovasculaires. Cela permettra d'approfondir la caractérisation de ces modèles. Ultiment, ces études pourraient permettre d'identifier des substrats moléculaires et biologiques caractéristiques des maladies cardiovasculaires et de développer de nouvelles cibles thérapeutiques. Afin de satisfaire au raffinement, l'hébergement des animaux sera réalisé dans des locaux appropriés avec des conditions optimales de température et d'hygrométrie avec un cycle jour/nuit de 12h/12h. De plus, un enrichissement sera systématiquement placé dans chaque cage et le personnel sera habilité à réaliser les différentes procédures dans le respect des règles d'éthique, de bien-être animal et du principe des 3R. Les surveillances quotidiennes des animaux permettront d'identifier d'éventuels animaux en souffrance et de prendre les mesures appropriées (surveillance accrue, mise à mort dans les cas les plus graves). Le nombre d'animaux est calculé selon les protocoles expérimentaux de manière à obtenir le minimum d'animaux par groupe permettant des résultats significatifs et homogènes. Afin de constituer les différents lots expérimentaux, il est estimé que sur les 5 années du projet, un total de 60000 est nécessaire.

19692 Les maladies cardiovasculaires sont les pathologies non-transmissibles les plus communes et causent 17,9 millions de décès chaque année, ce qui correspond à 31% des décès totaux. Un excès de poids, une augmentation de la pression sanguine et une alimentation riche en sucre peuvent causer une maladie cardiovasculaire. De plus, la pollution, le tabagisme et d'autres mauvaises habitudes de vie sont des facteurs de risques de ces pathologies.

Les maladies cardiovasculaires sont un groupe de maladies qui rassemblent les maladies cardiaques congénitales, les cardiomyopathies hypertrophique et dilatée, les maladies vasculaires, les arythmies cardiaques, les myocardites. . .

L'athérosclérose est une maladie multifactorielle et une des premières causes de mortalité associée à une maladie cardiovasculaire. Cette pathologie chronique évolue pendant plusieurs décennies chez les patients et atteint différents organes et les cellules immunitaire. Ce processus peut être local ou systémique.

Une obésité, une intolérance au glucose et une dyslipidémie sont souvent accompagnées d'une augmentation de la pression sanguine amenant à des troubles cardiaques ou à une maladie cardiaque périphérique. A long terme, une hypertension artérielle peut éventuellement provoquer une insuffisance cardiaque et une insuffisance rénale progressive.

Les complications cardiovasculaires sont les principales causes liées à la mortalité chez les patients diabétiques. La cardiomyopathie diabétique est une dysfonction ventriculaire apparaissant chez les patients diabétiques en absence d'hypertension et de maladies des artères coronaires.

Les maladies cardiaques congénitales sont les pathologies les plus communes chez les nouveau-nés. Pendant le développement embryonnaire, presque un tiers des maladies congénitales se manifestent avec des effets sévères dans la structure et la fonction cardiaque. Ces maladies incluent le syndrome de Down (trisomie 21) et le syndrome de Marfan.

Dans le domaine de la recherche des pathologies cardiovasculaires, les animaux jouent un rôle vital. Ces modèles sont pertinents pour être manipulés et détecter des indicateurs physiologiques de ces maladies. Ces dernières années, de nombreux travaux ont été réalisés dans ce domaine grâce aux modèles animaux. Néanmoins, il n'existe à ce jour aucun traitement permanent pour traiter la plupart des maladies cardiovasculaires.

Pour être valide, un modèle alternatif aux modèles animaux devrait prendre en compte l'ensemble des phénomènes biochimiques et physiologiques qui ont lieu chez l'animal. A ce jour, les tests *in vitro* ou les modèles informatiques ne permettent pas de rendre compte de l'ensemble de ces phénomènes. Aucune méthode alternative n'est envisageable

pour reproduire le plus fidèlement les troubles cardiovasculaires et donc, étudier le potentiel effet bénéfique de nouvelles stratégies thérapeutiques.

L'objectif du présent projet est l'élevage de lignées génétiquement modifiées de rats et de souris reproduisant des troubles cardiovasculaires. Cela permettra d'approfondir la caractérisation de ces modèles. Ultiment, ces études pourraient permettre d'identifier des substrats moléculaires et biologiques caractéristiques des maladies cardiovasculaires et de développer de nouvelles cibles thérapeutiques. Afin de satisfaire au raffinement, l'hébergement des animaux sera réalisé dans des locaux appropriés avec des conditions optimales de température et d'hygrométrie avec un cycle jour/nuit de 12h/12h. De plus, un enrichissement sera systématiquement placé dans chaque cage et le personnel sera habilité à réaliser les différentes procédures dans le respect des règles d'éthique, de bien-être animal et du principe des 3R. Les surveillances quotidiennes des animaux permettront d'identifier d'éventuels animaux en souffrance et de prendre les mesures appropriées (surveillance accrue, mise à mort dans les cas les plus graves). Le nombre d'animaux est calculé selon les protocoles expérimentaux de manière à obtenir le minimum d'animaux par groupe permettant des résultats significatifs et homogènes. Afin de constituer les différents lots expérimentaux, il est estimé que sur les 5 années du projet, un total de 60000 est nécessaire.

19693 La ricine et l'abrine sont des toxines végétales extrêmement toxiques considérées comme des armes potentielles de bioterrorisme. La ricine est classée dans la catégorie B des agents bioterroristes dans la liste du CDC (Centers for Diseases Control and Prevention) aux Etats-Unis. Il n'existe actuellement aucune contre-mesure médicale en cas d'intoxication par ces toxines. Ce projet s'inscrit dans un programme gouvernemental de recherche et de développement de lutte contre le terrorisme nucléaire, radiologique, biologique et chimique (programme NRBC).

Des molécules (chimiques ou biologiques) inhibitrices de la ricine ont été développées et caractérisées. Encore faut-il disposer de tests de diagnostic qui permettent d'identifier la ricine comme responsable d'une intoxication pour utiliser ces molécules efficacement en traitement. Il est donc nécessaire de disposer de tests diagnostiques performants (sensibles et spécifiques) pour repérer la présence de toxines. L'évaluation des performances des tests de diagnostic rapide d'une intoxication à la ricine ou à l'abrine développés dans notre laboratoire, ainsi que l'efficacité des molécules thérapeutiques, nécessitent un modèle *in vivo* d'intoxication à la ricine ou l'abrine. Il s'agit notamment de déterminer quelles sont les quantités de toxines effectivement décelables dans les fluides biologiques. Ces mesures ne peuvent être réalisées que *in vivo* du fait de la diffusion des molécules dans tout l'organisme. Concernant les molécules thérapeutiques (anticorps et molécules chimiques) d'ores et déjà évaluées et sélectionnées *in vitro*, il s'agit maintenant de les évaluer *in vivo*, afin de prendre en compte leurs paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques. Le projet a donc pour but :

- d'évaluer des tests rapides de détection (ELISA et bandelettes) de ces deux toxines dans les fluides biologiques après leur administration,
- d'évaluer l'efficacité de molécules thérapeutiques pour traiter une intoxication avec chacune des toxines.

Il sera réalisé sur un modèle rongeur, né et élevé dans des établissements agréés à des fins scientifiques. Leur nombre de 4986 a été réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats interprétables d'un point de vue statistique. L'administration des toxines ainsi que des molécules thérapeutiques sera réalisée sous anesthésie. L'état de santé et le bien-être des animaux, hébergés en groupes, seront surveillés tout au long de l'expérience et évalués grâce à une grille codifiant le niveau de douleur. Dans ce cas, des protocoles d'analgésie réfléchis au préalable, seront mis en œuvre pour soulager les animaux. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. Le vétérinaire de l'installation sera alors alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie. Dans le cadre du bien-être animal, des modules seront ajoutés dans les cages d'hébergement afin de varier les activités des animaux.

19694 Un grand nombre d'étude suggère que l'inflammation chronique est impliquée dans la mise en place et/ou l'aggravation d'un grand nombre de pathologies. L'inflammation permet de se débarrasser des bactéries, des virus et parasites mais dans certaines conditions, elle rentre dans une phase anormale perdurant plusieurs semaines voire des années, on parle alors d'inflammation chronique. Elle peut aboutir à la défaillance d'un ou plusieurs organes qui, à long terme peut évoluer en pathologies chroniques de type métaboliques, comme le diabète, auto-immunes comme la sclérose en plaques (SEP) ou neurodégénératives comme la maladie de Parkinson. Ce dérèglement peut être provoqué par les facteurs environnementaux, la sédentarité, le stress ou encore l'alimentation.

Depuis quelques années, des études sont centrées sur le lien entre les bactéries composant notre flore intestinale, le microbiote, et l'inflammation. L'une des théories suggère que l'altération ou le déséquilibre de ce microbiote aboutirait à la perméabilité de la barrière intestinale. L'intestin deviendrait plus perméable permettant à certaines molécules bactériennes, comme les lipopolysaccharides (LPS) de franchir la barrière intestinale et se retrouver dans le sang, provoquant ainsi une inflammation et un déclin de la fonction immunitaire.

Les molécules agissent via un mécanisme d'action totalement inédit, fruit de plusieurs années de travaux. Leurs mécanismes d'action et leur efficacité ont été validés in vitro et in vivo dans plusieurs modèles murins comme la maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI), la maladie de Parkinson ou encore la SEP. Le but de cette étude est de mieux caractériser l'effet de molécules sur la composante inflammatoire commune à ces pathologies. Nous avons donc choisi le modèle LPS qui présente à la fois les caractéristiques inflammatoires mais aussi des caractéristiques neurodégénératives et métaboliques.

Ce modèle consiste à injecter à la souris du LPS qui provoque une réaction inflammatoire systémique à court terme puis une neurodégénérescence et une insulinoresistance à plus long terme. Des souris mâles seront réparties dans 7 groupes expérimentaux : un groupe de souris témoin non injectées, un groupe de souris LPS non traité, un groupe de souris LPS traité avec une molécule de référence, un groupe de souris LPS traité avec une molécule de la même famille que les molécules d'intérêt, ainsi qu'un groupe de souris LPS traité avec nos molécules d'intérêt. Des analyses seront ensuite effectuées pour déterminer l'effet du traitement sur l'aspect clinique, sur le profil inflammatoire, biochimique et sur la survie.

Cette étude sera réalisée sur un total de 400 animaux. La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée sur le terrain:

1) réduction, le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum (notamment grâce à la présélection des molécules dans un projet précédent) tout en permettant de générer des données statistiques solides ; des études statistiques basées sur les résultats d'autres études nous permettent de prédire le nombre d'animaux suffisant pour obtenir les réponses à nos interrogations.

2) raffinement, les procédures prennent en compte des temps de récupération entre chaque manipulation stressante pour les souris (prises de sang, injections des molécules, glucose challenges) et un nombre optimisé de prélèvements visant à réduire le stress et la fatigue des animaux. " Un enrichissement se fera par ajout de coton de nidation.

3) remplacement, les études in vitro et sur animaux invertébrés ne permettent pas l'étude de comportements complexes et le développement multifactoriel de la maladie; le rongeur est donc une des espèces les plus appropriées pour ce type d'étude.

Ce projet rentre dans le cadre d'un projet plus global ayant pour but de développer des molécules à potentiel thérapeutique et de les amener aux essais cliniques chez l'Homme

19695 L'objectif principal de ce projet est d'induire des modèles de dégénérescence rétinienne chez les primates non humains (PNH) compatibles avec l'évaluation de l'innocuité et de l'efficacité des transplantations de photorécepteurs dérivés de cellules souches. Les dégénérescences rétiniennes héréditaires telles que la dystrophie bâtonnets-cônes sont une cause majeure de cécité humaine causée par un grand nombre de mutations dans plus de 200 gènes exprimés dans la rétine - dont certains n'ont pas encore été identifiés. Ces maladies ne surviennent pas spontanément chez les PNH, ce qui rend difficile l'évaluation de la thérapie cellulaire chez eux, alors qu'ils constituent le modèle animal pertinent qui présente une macula.

Nous proposons de générer des modèles macaques avec dégénérescence rétinienne des photorécepteurs et d'évaluer leur utilité pour étudier la faisabilité à court terme de la transplantation de photorécepteurs chez des macaques immunodéprimés afin d'éviter tout rejet des cellules transplantées. Nous transplanterons des photorécepteurs dérivés de cellules souches pluripotentes humaines induites dans la zone dégénérée.

Pour ce projet on utilisera des PNH, seule espèce ayant des propriétés anatomiques similaires à l'homme au niveau de l'œil, notamment de la rétine. Le recours à l'animal est nécessaire, car aucun milieu de culture ou système synthétique ne permet aujourd'hui de reproduire la complexité architecturale des cellules de la rétine. Ce projet s'appuie sur des études préalables in vitro et chez le rongeur. Le nombre d'animaux (20) a été réduit au minimum nécessaire pour obtenir des données statistiquement significatives. Chaque animal est utilisé pour l'ensemble des étapes du projet, de l'injection intraoculaire au prélèvement des tissus d'intérêt pour l'analyse. La mise en œuvre d'un suivi longitudinal non invasif (imagerie in vivo sur les animaux anesthésiés) minimise le nombre d'animaux utilisés ainsi que la contrainte qui leur est imposée. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions et des critères de points limites sont prévus pour prendre en compte des effets inattendus. Les actes chirurgicaux sont réalisés sous anesthésie générale et entraînent une douleur modérée. Une observation régulière des animaux sera faite pour détecter tout signe de détresse, et si cela est jugé nécessaire, la douleur postopératoire sera gérée par l'administration d'analgésiques. Les animaux seront hébergés en groupe, dans des conditions enrichies en favorisant les interactions sociales.

19696 La réalisation d'études de toxicologie et de pharmacologie de sécurité est une obligation réglementaire lors du développement d'un médicament humain. Ces études servent à évaluer la sécurité d'un médicament avant les premiers essais cliniques chez l'homme. L'objectif de ce projet est la réalisation des études réglementaires de toxicologie générale, pharmacologie de sécurité et de tolérance locale, et des études préliminaires (Recherche de dose, dose maximale tolérée, étude de pharmacocinétique, pharmacologie et pharmacodynamique) chez le primate non humain. Ces études consistent en administration unique ou répétée du produit à tester suivi d'observations régulières des animaux, suivi du poids, évaluation des effets sur les paramètres sanguins ou urinaires, évaluation des fonctions respiratoires, musculaires et cardiovasculaires et des effets sur le comportement et le système nerveux central et analyse histopathologique. Le choix du primate non humain est basé sur la réglementation en vigueur (ICH, FDA, EMA, ...) qui demande la réalisation d'études précliniques sur 2 espèces dont une espèce non rongeur. Le primate non humain est une des espèces non rongeurs acceptées sous réserve que le candidat médicament est destiné à traiter des pathologies humaines invalidantes ou mortelles et sous réserve qu'il existe

des éléments scientifiques indiquant que la finalité de la procédure ne peut être atteinte en utilisant d'autres espèces.

Le nombre d'animaux utilisé est défini par la réglementation et est adapté à la nécessité d'obtenir des résultats fiables sur un effectif suffisant tout en limitant le nombre d'animaux au strict nécessaire. Ce nombre est estimé à 6242 animaux pour 5 ans. Ce nombre important s'explique par la variété importante d'études dans ce projet et la durée du projet (5 ans). Il n'est actuellement pas possible de substituer l'animal de laboratoire par des méthodes alternatives car le modèle doit pouvoir mimer au mieux les interactions complexes biologiques et physiologiques retrouvées chez l'être humain et doit aussi permettre la sémiologie clinique. Pour améliorer leur bien-être, les animaux sont hébergés en groupes sociaux sauf incompatibilité avec la procédure expérimentale ou incompatibilité comportementale. Les animaux sont hébergés dans des volières ou des cages avec à disposition des perchoirs ou barrières visuelles ou balançoires et divers jouets. Des mélanges de fruits secs, graines, cacahuètes ou autres friandises sont distribués tous les jours dans de la litière permettant aux animaux de fourrager. Un programme d'habituation des animaux est mis en place dès la 1^{ère} semaine d'arrivée afin d'acclimater le animaux à leur nouvel environnement, aux conditions d'hébergement et aux procédures. Les techniques engendrant le moins d'inconfort ou sur une durée la plus courte possible pour l'animal seront privilégiées. Les autres techniques ou procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie avec le cas échéant un protocole d'analgésie adapté. Les animaux sont suivis quotidiennement sous la supervision d'un vétérinaire. Des points limites précoces sont appliqués de telle sorte qu'en cas de signes cliniques ayant un impact significatif sur le bien-être de l'animal, des mesures sont rapidement prises pour limiter la souffrance (mise en place d'un traitement analgésique, diminution de la dose testée, suspension de la procédure ou euthanasie).

19697 L'obésité est majoritairement la conséquence d'une surconsommation d'aliments à haute densité énergétique comme le régime hyperlipidique (HL), et constitue un des défis de santé public les plus sérieux du 21^{ème} siècle. L'obésité mondiale a presque triplé depuis 1975.

En plus d'être un facteur de risque de maladies métaboliques et cardiovasculaires, le surpoids et l'obésité affectent les fonctions cérébrales et ont été associés à une haute prévalence de troubles anxieux par rapport à la population générale : le besoin d'identifier des interventions thérapeutiques appropriées est imminent.

Tout comme chez l'humain, les modèles rongeurs d'obésité induite par régime HL présentent des comportements anxieux accrus.

De manière intéressante, l'obésité ainsi que les troubles anxieux sont associés dans les études cliniques à un dysfonctionnement d'une région cérébrale nommée le cortex insulaire (ou insula). Cependant, il n'est pas encore clair si le dysfonctionnement de l'insula pourrait contribuer à l'anxiété induite par l'obésité. Nous proposons donc d'évaluer chez la souris l'impact du régime HL sur la fonction de base de l'insula et au cours de comportements anxieux, et de manipuler l'activité de l'insula afin d'atténuer l'anxiété induite par le régime HL.

Afin d'y parvenir, les souris seront soumises à un régime alimentaire hyperlipidique pendant douze semaines. A la huitième semaine de ce régime, une injection intra-cérébrale d'un vecteur viral sera effectuée par chirurgie stéréotaxique. Après quatre semaines de repos, le niveau d'anxiété sera mesuré au cours de deux tests comportementaux, puis les souris seront mises à mort pour analyser le cerveau.

Sur le long terme, ce projet constitue une étape nécessaire pour un meilleur diagnostic et traitement des patients souffrants d'obésité et d'anxiété.

Remplacer : L'étude intégrée des effets de la nutrition sur des aspects comportementaux et de fonctionnement cérébral est permise uniquement grâce à l'utilisation du modèle de rongeur soumis à de la nourriture obésogène. Il n'est donc pas possible de remplacer ce modèle souris par des modèles in vitro ou in silico.

Réduire : Le nombre d'animaux a été réduit au strict nécessaire afin d'obtenir une analyse fiable (le nombre d'animaux estimé permet d'effectuer des tests statistiques) du comportement et de l'activité

neuronale de la région cérébrale d'intérêt. Nous estimons que 256 souris seront nécessaires pour mener à bien ce projet d'une durée de 5 ans.

Raffiner : Les animaux seront hébergés en cages collectives enrichies en nids de coton afin de limiter le stress dû à l'isolement. La température, l'hygrométrie et le cycle jour/nuit seront régulés dans l'animalerie agréée. Les animaux auront à disposition de la nourriture et de l'eau à volonté. Ils seront surveillés quotidiennement par les animaliers tout au long de leur vie, et bénéficieront d'une surveillance plus particulière par les expérimentateurs en période expérimentale.

L'état général des animaux (état du pelage, sociabilité, posture, mobilité, ...) sera inspecté. En cas de signe de mal-être, la procédure expérimentale sera arrêtée, et l'animal sera isolé et soigné. Les éventuelles agressions entre congénères seront stoppées par l'isolement de l'agresseur, et la victime sera soignée (désinfection des plaies, aide à la cicatrisation). En l'absence d'amélioration significative de l'état de l'animal, il sera euthanasié dans les 48h.

Des mesures de raffinement sont appliquées au cours des techniques expérimentales qui seront pratiquées par du personnel formé et compétent. Pour la chirurgie réalisée sous anesthésie générale, le matériel sera aseptisé, la température de l'animal maintenue grâce à des tapis chauffants, un suivi post-opératoire sera effectué. L'administration d'antalgique est systématique avant la chirurgie afin d'éviter la souffrance péri-opératoire et sera renouvelée toutes les 24h sur 3 jours maximum en cas de persistance de douleur. Lors des tests comportementaux, les souris seront préalablement habituées à être manipulées.

Des points limites généraux et spécifiques aux procédures ainsi que des critères d'arrêts sont définis afin de limiter la douleur au minimum, sans remettre en cause les résultats du projet.

19698 Notre plateforme d'irradiation propose un service d'irradiation de rongeurs de laboratoire qui comprend la mise à disposition des équipements pour les utilisateurs autorisés ou la réalisation par le personnel de la plateforme, d'irradiations corps entier ou de zone ciblée selon les besoins du demandeur. Dans ce contexte, la plateforme peut accueillir temporairement des animaux extérieurs à l'établissement utilisateur dont elle dépend. Ces animaux sont inclus dans des demandes d'autorisation de projet rattachées aux établissements d'expérimentation dont dépend le concepteur du projet et demandeur de la prestation. Les chercheurs utilisent l'irradiation soit comme sujet d'étude direct pour comprendre les effets cellulaires et moléculaires des radiations ionisantes avec ou sans co-exposition chimique ou comme outil pour créer après transplantation cellulaire des modèles murins de cancers humains affectant les cellules sanguines. . La technique de greffe de moelle osseuse est utilisée pour réduire le nombre d'animaux et amplifier les animaux modèles de formes tumorales complexes. Cette demande d'autorisation de projet a pour objectif d'autoriser uniquement les protocoles d'irradiation effectuées par la plateforme pour des utilisateurs extérieurs à l'établissement. La plateforme s'engage à réaliser les irradiations seulement si les animaux sont inclus dans une demande d'autorisation de projet qui a reçu un avis favorable de la part du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Cette demande est formulée pour un nombre de 2000 souris et 250 rats sur 5 ans. La plateforme s'engage à référencer pour chaque demande les numéros d'autorisation des projets ainsi qu'à mettre en place un décompte des animaux irradiés pour le compte des utilisateurs extérieurs. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de leur présence sur la plateforme d'irradiation et le vétérinaire de notre installation sera prévenu dès le moindre signe de souffrance afin de mettre en place un traitement approprié.

19699 Il est actuellement admis par la communauté scientifique l'implication de *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) dans la survenue de la polyarthrite rhumatoïde de l'adulte. En outre *P. gingivalis* est impliqué dans la survenue de plusieurs pathologies cardiovasculaires et neurologiques. Récemment sur une étude réalisée dans notre laboratoire, nous avons mis en évidence un titre d'anticorps anti- *P. gingivalis* élevé dans certains sous-groupes d'arthrites juvéniles idiopathiques. L'implication de *P. gingivalis* dans ces maladies ouvre la possibilité à d'autres approches thérapeutiques tel que la vaccination.

Nous souhaitons en particulier étudier les réponses immunitaires induites par une stratégie vaccinale chez la souris et le rat qui constitue un modèle d'arthrite inflammatoire régulièrement utilisé.

Ces études ne peuvent se faire *in vitro* car le but est de suivre les schémas d'immunisation de l'animal après immunisation par voie orale ou nasale et sous cutané. Les modèles murin et rat sont des références afin d'évaluer la réponse humorale et cellulaire selon différentes voies d'administration et selon différents vaccins utilisés. Le nombre d'animaux a été réduit au maximum sans entraver l'interprétation des résultats et leur significativité au plan statistique.

Le nombre total de souris a été fixé à 600 souris et 100 rats soit au maximum 700 animaux au total. Ce total ne peut statistiquement pas être réduit.

Cet effectif a été réduit au maximum sans mettre en péril l'interprétation statistique des résultats. Les prélèvements sanguins s'effectueront sous anesthésie générale.

Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. La douleur est rigoureusement contrôlée grâce à des points limites évalués en amont, et gérée grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (myorelaxant / anesthésie/analgésie). Par ailleurs, les animaux sont hébergés en groupes harmonieux (par 2); dans un environnement enrichi (copeaux, matériel de nidification, bâtonnets à ronger). Enfin, l'eau et la nourriture sont mises à disposition "ad libitum" et de la musique est diffusée en salle d'hébergement pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux.

19700 De nombreuses disciplines de la recherche biomédicale ont recours à l'utilisation de souris portant une ou plusieurs modifications génétiques. Certaines lignées portent un caractère supplémentaire par addition d'un gène (lignées transgéniques) alors que d'autres sont déficientes pour un gène qui a été rendu inactif soit en permanence, soit sous l'effet d'un traitement chimique, soit sous l'effet d'un autre gène. Il existe actuellement plusieurs milliers de ces lignées de souris.

L'élevage des lignées doit être pris en charge par du personnel compétent, selon des règles strictes afin d'assurer le bien-être des animaux et d'ajuster le nombre d'animaux produits aux besoins des projets de recherche qui y ont recours. Ce projet concerne la décontamination de 250 lignées (environ 50 nouvelles lignées par an sur 5 ans) et leur élevage en zone protégée (barrières SOPF, SPF ou isolateur) pour répondre à la demande des chercheurs.

La décontamination des lignées est réalisée en produisant des embryons par fécondation *in vitro* et en les transférant stérilement par voie chirurgicale dans une femelle receveuse rendue apte à la gestation après accouplement avec un mâle vasectomisé. Les jeunes qui naissent sont ensuite accouplés pour établir une nouvelle colonie. Pour une partie des lignées, le génotype des animaux doit être déterminé à partir d'un prélèvement sanguin.

La chirurgie des animaux se fait sous anesthésie gazeuse et des analgésiques leurs sont fournis systématiquement en pré-opératoire, et éventuellement en post-opératoire, pour limiter toute éventuelle douleur. Ils sont surveillés pendant plusieurs jours post-chirurgie pour vérifier qu'ils récupèrent bien et ne souffrent pas. Les animaux en élevage sont vérifiés régulièrement pour détecter précocement toute situation anormale et éviter toute souffrance inutile (bataille, plaies...).

La nécessité de recourir à ces modèles animaux est justifiée dans chacun des projets qui les utilisent. Le nombre d'animaux produits pour chaque lignée est révisé périodiquement avec les chercheurs en fonction de leurs projets, afin d'ajuster au mieux ce nombre aux besoins réels et d'éviter de produire des animaux inutilement. Les dommages infligés aux animaux en élevage sont limités aux prélèvements de sang pour les jeunes animaux qui doivent être génotypés par cette procédure. Les lignées élevées ne présentent pas de phénotype dommageable pour l'animal.

Le niveau de sévérité est modéré pour la vasectomie des mâles, le traitement superovulatoire des femelles donneuses et la réimplantation chirurgicale d'embryons et léger pour le génotypage sur prélèvements sanguins sur animaux en élevage.

Cette activité conduira, en 5 ans, à l'utilisation d'environ 13300 souris utilisées pour décontaminer des lignées, qui seront ensuite élevées de façon centralisée et utilisées dans plusieurs dizaines de projets autorisés.

19701 Les porcs sont régulièrement utilisés dans la recherche biomédicale dans les domaines du médicament humain. L'objectif de ce projet est d'évaluer la réponse inflammatoire locale ainsi que le processus de cicatrisation d'une plaie après l'application de deux colles chirurgicales différentes utilisées pour des sutures cutanées.

L'enjeu de ce projet est de démontrer l'efficacité de ces colles sur la cicatrisation tout en garantissant un effet barrière anti-microbienne.

Pour cela, six porcs femelles de 20-25 kg seront inclus dans ce projet et répartis en 2 groupes. Suivant le groupe d'attribution, les sites d'applications seront prélevés à 2 ou 4 semaines après l'application.

Six plaies seront faites au niveau du dos de chaque animal. L'animal sera préalablement tranquilisé (Azapérone 1 à 2 mg/kg) puis anesthésié de manière générale ("pig cocktail" 0.1 mg/kg).

Les plaies seront des incisions linéaires, 3 à gauche et 3 à droite d'au moins 8 cm de longueur. Les deux colles chirurgicales seront administrées sur un même animal mais de manière aléatoire. L'application des colles chirurgicales sera faite "en aveugle", cela signifie que les personnes responsables de l'évaluation de l'inflammation locale et du processus de cicatrisation ne seront pas celles qui auront appliqué la colle sur la plaie. Les animaux seront observés au moins une fois par jour. Les animaux seront pesés une fois par semaine. L'évaluation de la tolérance locale et le processus de cicatrisation seront évalués avant l'application puis à 5 min, 15 min, 1h, 2h, 4h, 8h and 24h après application puis une fois par jour jusqu'à 2 ou 4 semaines qui suivent l'application.

Les animaux seront ensuite euthanasiés au bout de deux ou quatre semaines, les sites d'applications seront collectés et seront examinés pour déterminer précisément le degré de l'inflammation et le niveau de cicatrisation. L'impact de l'application de la colle sur les tissus sera également évalué lors de l'analyse des tissus prélevés.

Tout geste technique réalisé sur l'animal sera fait par un personnel expérimenté et selon les bonnes pratiques vétérinaires en vigueur.

Aucune méthode alternative ne permettant actuellement de reproduire une réponse à l'inflammation ou un processus de cicatrisation au niveau d'une plaie, il est indispensable de recourir à l'animal entier. L'animal ne peut pas être remplacé.

Dans ce projet 6 animaux seront inclus. C'est le nombre d'animaux minimal pour avoir des résultats interprétables.

Les animaux seront hébergés en groupe de 2 ou 3 pendant la période d'accoutumance puis individuellement à partir de la réalisation des plaies et cela jusqu'à la fin de la phase animale. Cet hébergement en individuel est nécessaire car il faut éviter le contact entre les animaux (chevauchement) ce qui pourrait fausser les résultats de l'étude.

Une attention particulière sera portée aux animaux pour avoir un enrichissement du milieu adapté pour éviter l'ennui: contact visuel et olfactif entre congénères, surface suffisante de l'hébergement, présence de jouets...

Un suivi quotidien (voir plusieurs fois par jour) sera mis en place permettant l'observation générale des animaux.

19702 Le sommeil est un processus physiologique qui a longtemps été considéré comme un phénomène passif, alors qu'une véritable activité cérébrale a lieu lors de ses différentes phases, participant au bon fonctionnement de l'ensemble de l'organisme. Il permet notamment la consolidation de la mémoire mais joue également un rôle vital dans le maintien des fonctions physiologiques, par exemple en assurant l'élimination des toxines accumulées lors des phases de veille. Le manque de sommeil ou l'altération de sa qualité, qui affecte 30 à 35% de la population générale, sont des facteurs de risque des maladies cardiovasculaires, du diabète, des troubles anxieux et même de

démence. Par ailleurs, les troubles neurodégénératifs, dont l'incidence est croissante du fait, notamment, du vieillissement de la population, sont fréquemment associés à des troubles du sommeil. Chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, les perturbations du rythme veille-sommeil sont corrélées avec la sévérité des troubles cognitifs. 60 à 70% des patients parkinsoniens présentent, quant à eux, des insomnies associées à une désorganisation de l'architecture du sommeil et des endormissements diurnes irrépessibles. Ces troubles du sommeil seraient d'ailleurs un marqueur diagnostique précoce de ces maladies avec une apparition antérieure de quelques années aux troubles cognitifs. On comprend alors que, dans ce contexte, le développement de thérapies dans cette thématique soit un enjeu de santé publique.

Pouvoir proposer une évaluation par des mesures fiables et quantitatives des perturbations des cycles veille/sommeil ainsi que de l'alternance des différentes phases est donc essentiel dans un processus de développement préclinique pour un futur médicament. Nous proposons, dans ce projet, de développer en premier la méthodologie et les outils technologiques au sein de notre structure permettant de quantifier les différents stades de sommeil. Pour ce faire, nous utiliserons des enregistrements électroencéphalographiques couplés à des enregistrements électromyographiques pour définir les différentes phases du sommeil et d'éveil et leur enchaînement. Notre but sera ensuite d'évaluer l'effet de molécules en développement sur ces paramètres et leur potentiel thérapeutique.

Pour ce projet, nous allons utiliser 20 lots de 16 souris.

Dans le but d'avoir des résultats les plus fiables possibles, notre projet répond au maximum aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement :

Remplacement : Ce projet a pour but de mesurer l'efficacité de composés sur les états de veille et de sommeil, or le sommeil ne peut s'étudier que dans les conditions *in vivo* chez l'animal entier. L'utilisation des animaux est donc indispensable à une meilleure compréhension des mécanismes neurophysiologiques durant différents états de vigilance.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est réduit à son minimum sans compromettre l'objectif du projet et la validité des expériences qui seront menées.

Raffinement : Les études sur le sommeil nécessitent des observations sur des animaux non anesthésiés vivants dans de bonnes conditions physiologiques. Le bien-être des animaux est donc une condition *sine qua non* de chaque étape de l'expérimentation. Le projet implique la mise en place d'un système d'enregistrement électroencéphalographiques et d'un système d'enregistrement électromyographiques chez le rongeur avec une chirurgie de classe modérée. Les expérimentateurs formés porteront une attention particulière au raffinement des procédures afin de limiter la douleur, la soulager si elle ne peut être évitée par l'utilisation d'antalgiques les plus adaptés à chaque étape. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de douleur. Cette grille nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance et de procéder à l'arrêt de l'expérience si le point limite est atteint. Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux.

19703 Les tumeurs cérébrales font partie des cancers avec les plus mauvais pronostics. Parmi celles-ci les gliomes (tumeurs des cellules gliales) sont les plus répandus. Leur malignité est extrêmement variable d'un patient à l'autre. Les plus sévères d'entre eux, de grade IV ou glioblastomes, sont de plus résistants aux thérapies conventionnelles (chirurgie suivie d'une radio-chimiothérapie). . . Le projet consiste à évaluer les effets anti-tumoraux de différentes approches thérapeutiques (chimiothérapie délivrée par voie générale ou locale associée ou non à une radiothérapie) dans des modèles de tumeurs gliales induites chez les rongeurs à leur emplacement anatomique habituel par implantation intracrânienne de cellules de gliome.

Un suivi longitudinal et non-invasif de la croissance tumorale pourra être réalisé par l'utilisation des techniques d'imagerie optique comme la bioluminescence et la fluorescence *in vivo*, ou de l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM).

Pour ce projet d'une durée de 5 ans, il est prévu un nombre maximum de 600 souris et 200 rats.

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

Réduction : Un nombre minimal et suffisant d'animaux par groupe est utilisé afin d'analyser de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et d'effectuer des analyses statistiques.

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

- . le recours à des procédures les moins invasives possibles
- . le suivi d'éventuel signes cliniques
- . la détermination des points limites
- . le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.
- . un protocole analgésique adapté pour la chirurgie et la période post-opératoire et un suivi post-opératoire de l'état de santé des animaux avec des soins et un enrichissement adaptés afin de permettre une bonne récupération des animaux
- . la réduction du volume sanguin prélevé grâce à l'amélioration de la sensibilité des méthodes d'analyse

19704 TIEG1 (TGF- β Inducible Early Gene 1) est un facteur de croissance découvert par le laboratoire du Dr Spelsberg dans les cellules osseuses humaines.

Chez l'homme, la protéine TIEG1 est exprimée dans différents tissus et types cellulaires notamment certaines cellules mammaires, l'utérus, le cerveau, le pancréas ainsi que les tissus musculaires. De plus, il a été mis en évidence une nette diminution de l'expression de TIEG1 dans le cancer du sein et des ovaires impliquant ainsi ce gène comme marqueur potentiel des cellules cancéreuses. Une expression anormale de TIEG1 a aussi été montrée chez des patients atteints d'ostéoporose, de cardiomyopathie et de cataracte. Il a été démontré que la protéine TIEG1 est fortement exprimée dans les muscles. À notre connaissance, personne n'a encore examiné les défauts potentiels des muscles squelettiques chez les souris TIEG1 qui ont été modifiées génétiquement afin de ne pas exprimer ce facteur de croissance.

Le but de cette étude sera de caractériser l'effet de l'absence de cette protéine TIEG1 sur les propriétés mécaniques des muscles à contraction lente et rapide.

Ce projet de recherche est pluridisciplinaire et a pour but de caractériser le rôle du gène TIEG1 sur le système musculaire à travers des essais mécaniques sur des muscles rapide (EDL) et lent (soleus) Ainsi, une approche expérimentale et une approche multi physique seront appliquées pour mieux comprendre les relations entre les propriétés structurelles et mécaniques. A long terme, ce travail permettra de définir de nouvelles stratégies thérapeutiques pour les pathologies du système musculo-squelettique.

Plus concrètement, cette étude demandée pour une durée de 5 ans va être réalisée sur une population totale de 358 souris femelles réparties en 2 groupes

[WT] n= 179 C57BL/6 âgées de 12 semaines

[KO] n=179 souris KO tieg1 âgées de 12 semaines (phénotype non dommageable dans cette tranche d'âge.

A leur arrivée, les animaux sont stabulés par 4 dans des cages ventilées allentown. Les souris disposeront de nourriture et d'eau à volonté (biberon avec capsule et eau potable) dans un environnement contrôlé (un éclairage artificiel avec photopériodes 7h-19h température et humidité), Du papier cardé sera disposé dans les cages afin d'enrichir le milieu.

Les animaux seront prémédicamentés par un traitement antalgique Buprénorphine en IP (buprécare multidoses 0,05 mg/mL) à dose de 0,05 mg/kg puis anesthésiés par voie gazeuse (Vetflurane, 1000mg/g, Virbac). Une fois la profondeur de l'anesthésie vérifiée par le réflexe palpébral (niveau 3), nous procéderons au prélèvements des 2 muscles rapides (extensor digitorum longus dit EDL) et 2 muscles lents soléaire (SOL). Pendant la procédure une attention particulière sera portée sur la profondeur de l'anesthésie. Au besoin, nous renforcerons celle-ci en augmentant le taux d'isoflurane. En cas de défaillance de l'appareil ou à la fin de la procédure, l'animal sera euthanasié par une dose létale de pentobarbital sodique en IP (Exagon 1mL/Kg).

Les muscles seront alors soumis à des essais mécaniques afin de caractériser à l'échelle macroscopique les comportements viscoélastique (étirement – relaxation), contractile (tests à différentes fréquences) et en fatigue (tests répétés à une fréquence) de ces muscles. L'ensemble des tests mécaniques ne pouvant pas être réalisés sur le même muscle, il sera nécessaire de répéter le test expérimental sur différents tissus musculaires ce qui justifie le nombre important de muscles à extraire.

L'ensemble de cette procédure s'inscrit dans la règle de 3 Rs

En effet, bien que notre unité travaille sur un modèle alternatif tissulaire de muscle in vitro, il ne peut reproduire les phénomènes que nous souhaitons étudier. L'utilisation d'un animal est donc une nécessité.

Le nombre d'animaux a été calculé en tenant compte des besoins expérimentaux et statistiques tout en minimisant le nombre d'animaux au minimum. A l'heure actuelle, les animaux sont euthanasiés puis un muscle est extrait. Cette procédure permettra de réduire considérablement le nombre d'animaux nécessaires.

Concernant les souris TIEG1 le phénotype ne présente aucune douleur/souffrance aux animaux. Toutes les souris seront acclimatées à l'animalerie 2 à 6 j avant le début des expérimentations. Ils seront soumis à un cycle jour-nuit de 2x12h et auront un accès libre à de la nourriture standard et de l'eau. Leurs cages ventilées seront enrichies par l'ajout de papier cardé. Toute la procédure sera effectuée avec l'objectif de maximiser le bien-être des animaux et de limiter la souffrance et la détresse. Nous avons mis en place un suivi des animaux et des traitements de la douleur.

19705 La fente labio-alvéolo-palatine est la malformation congénitale de la face la plus fréquente au monde (1/700 naissances en France). Le traitement de ce défaut morphologique est la chirurgie : les phases d'intervention sont multiples et suivent une chronologie qui est propre à chaque équipe médicale. Nous souhaitons proposer une alternative à la greffe osseuse alvéolaire classiquement menée par l'utilisation d'un substitut osseux composé d'un biomatériau et de cellules de l'enfant, pour favoriser la reconstruction osseuse du maxillaire. Cette malformation étant diagnostiquée en anténatal, il est possible de récupérer, à la naissance, le sang et le cordon ombilical, sources de cellules souches qui sont un atout majeur pour la reconstruction osseuse. Pour valider ce substitut osseux, nous mettrons au point un modèle de fente alvéolaire chez le rat. Ce modèle se compose en 2 temps opératoires : d'abord, un défaut alvéolaire sera créé chez le rat avec apposition d'une plaque de silicone pour éviter une cicatrisation spontanée ; puis, une fois les berges du défaut consolidées, une seconde chirurgie aura lieu pour retirer la plaque de silicone et implanter dans la fente alvéolaire le substitut créé en laboratoire. Afin d'identifier le moment où les berges du défaut sont suffisamment consolidées pour permettre la seconde opération, nous réaliserons une étude préliminaire dans laquelle le défaut alvéolaire sera créé chez des rats avec apposition de plaque en silicone et nous effectuerons un suivi de la consolidation osseuse par microtomographie à rayons X une fois par semaine pendant 2 mois, ce qui équivaut à une exposition à une dose de radiations de 75 mGy par scan, soit 600 mGy au total pour les 8 scans. La DL50 de dose de radiations chez le rat est d'environ 4 Gy. Le substitut implanté utilisable sous forme de feuillet sera composé de granules de phosphate de calcium bi-phasique (maxresorb®) et de cellules souches mésenchymateuses issues du cordon ombilical. Ce substitut sera cultivé dans une cassette (CliniCell25, Laboratoire MABIO), ce qui lui donnera sa forme de feuillet et permettra son transport tout en conservant une stérilité stricte. Le substitut osseux sera cultivé 14 jours avant d'être implanté dans une fente alvéolaire chez le rat. Les capacités de ce substitut à recréer de l'os seront évaluées

par une analyse au cours du temps par microtomographie à rayons X des maxillaires des rats. Des contrôles sans substitut ou sans cellules seront également réalisés en comparatif. Les rats seront scannés toutes les 2 semaines pendant les 2 premiers mois, puis tous les mois jusqu'à la fin du protocole. En fonction du niveau de régénération osseuse observé au scanner, à 3 ou à 6 mois post-implantation, les animaux seront sacrifiés et les maxillaires seront récupérées et inclus en paraffine pour permettre les analyses histologiques et immunohistochimiques. La dose de radiations reçue par les rat sera de 375mGy si l'étude dure 3 mois et de 600mGy pour 6 mois. Ce projet a pour objectif de valider un substitut osseux dans un modèle de fente alvéolaire chez le rat. Si le substitut est validé, il pourra être testé chez l'enfant à court/moyen terme.

L'étude préliminaire sera réalisée sur un groupe de 10 rats puis l'étude avec implantation du substitut nécessitera l'utilisation de 48 rats répartis en 3 groupes (contrôle, matériau seul, matériau + cellules), avec n=16 rats par groupe. L'effectif total du projet est composé de 58 rats âgés de 8 semaines au début de l'étude.

L'éthique et le bien-être animal seront pris en considération tout au long de l'étude :

Le nombre d'animaux nécessaire a été réduit au minimum nécessaire pour l'obtention de résultats pertinents statistiquement. L'utilisation d'imagerie sous anesthésie gazeuse (Isoflurane) nous permet de réduire considérablement le nombre d'animaux utilisés. L'expérimentation sur modèle animal est nécessaire pour reproduire les conditions cliniques humaines. Les résultats obtenus dans ce projet sont un pré-requis pour une éventuelle évaluation clinique chez l'Homme. Aucune méthode alternative ne nous permettrait d'obtenir les résultats escomptés. Les animaux seront hébergés en milieu enrichi (litière foisonnante, cache, eau et boisson ad libitum) et en groupe (tant que la compatibilité le permet). Les bonnes pratiques de chirurgie seront respectées : anesthésie avec un mélange de kétamine (Imalgene ou équivalent 100 mg/kg) et xylazine (Rompun 2% ou équivalent, 10 mg/kg) associée à une analgésie par lidocaïne (Lidocaïne HCL 2%, 0,5mL) sera injecté en sous-périoste le long de la crête alvéolaire, gestion de l'hypothermie grâce à des tapis chauffants, suivi post-opératoire accru avec traitement antalgique par buprénorphine (buprécare ou équivalent, à une dose de 0,1 mg /kg en sous-cutanée). Après 3 ou 6 mois d'implantation, suivant la vitesse de reconstruction, les animaux seront sacrifiés par inhalation de CO2 avec gradient de concentration pour limiter souffrance et stress, afin de prélever la zone d'intérêt pour des études histologiques.

19706 Les populations de vertébrés sauvages vivant dans les zones polaires de l'hémisphère sud sont de plus en plus sujettes à des menaces dues à des maladies infectieuses, en plus d'autres menaces environnementales. Dans certains cas, des interventions pour protéger les populations sauvages menacées par des agents infectieux peuvent être envisagées et nous nous proposons dans ce projet de continuer d'évaluer l'utilisation d'une approche vaccinale pour protéger des espèces d'oiseaux marins contre de fortes mortalités récurrentes dues à un agent infectieux ayant lieu sur une île isolée, l'île d'Amsterdam, dans le sud l'Océan Indien. Sur cette île, plusieurs espèces sont menacées par des épizooties de choléra aviaire, une maladie dont la bactérie responsable, *Pasteurella multocida*, a pu être amenée par l'homme du temps où il y avait un poulailler sur l'île. Dans la suite d'un projet débuté il y a quelques années et ayant donné des résultats prometteurs mais pas encore concluants, nous proposons de continuer d'explorer la possible utilisation d'un vaccin en le testant chez une des espèces, l'albatros à bec jaune de l'Océan Indien (*Thalassarche carteri*), localement abondante mais menacée par des mortalités récurrentes et massives des poussins. Les mortalités sont dues au choléra aviaire, mais aussi à la prédation par une espèce introduite, le rat surmulot, qui doit faire l'objet d'un plan d'éradication ces prochaines années. Dans ce contexte, le projet consistera à vacciner des poussins et des adultes contre le choléra aviaire pour évaluer la capacité de protéger de façon récurrente les individus. Le protocole impliquera l'utilisation de lots d'individus témoins et d'individus vaccinés et un suivi de la survie des poussins et des dynamique éco-épidémiologiques sur plusieurs années. Le travail impliquera sur cinq ans 800 jeunes individus (poussins) et 200 adultes reproducteurs, dont une part de témoins non-vaccinés, pour un total de 1000 individus. Il s'agit d'optimiser le protocole de vaccination en évaluant

le bénéfice attendu en terme de protection associée à la vaccination en présence de rats et suite à leur éradication.

Prise en compte des 3 R:

-Remplacer: L'étude porte spécifiquement sur des populations naturelles d'oiseaux sauvages donc les animaux étudiés ne peuvent être remplacés par ceux d'autres espèces.

- Réduire: Les tailles d'échantillons ont été déterminées en considérant les critères de réduction pour permettre des comparaisons pertinentes des taux d'exposition aux agents infectieux et des taux de survies entre groupes vaccinés et non-vaccinés, en considérant la variabilité du système entre années et l'importance de ne pas changer le protocole pour permettre les comparaisons.

- Raffiner: Les protocoles expérimentaux ont été élaborés afin de minimiser la douleur et l'inconfort en faisant intervenir un personnel expérimenté pour les manipulations et en effectuant les prélèvements rapidement (moins de 5 min) et sans anesthésie. Un effet positif de la vaccination (meilleure survie) est attendu pour les individus qui ne sont pas dans les groupes contrôles. Plus précisément, la vaccination se fait par voie sous-cutanée (injection de 0.5 ml) et les prises de sang sont réalisées à l'aile ou à la patte selon la taille de l'individu manipulé. Les oiseaux sont relâchés rapidement sur le site de leur capture et la population fait l'objet d'un suivi démographique.

19707 Nous sommes constamment bombardés d'informations sensorielles provenant de notre environnement. Ces informations sensorielles proviennent de sources multiples (visuelles, auditives, olfactives, tactiles, etc.) et doivent être traitées et intégrées correctement par le cerveau. Ce traitement d'information sensorielle est crucial pour l'interaction avec notre environnement, et pour la cognition et apprentissage. Les altérations de la perception sensorielle peuvent être extrêmement débilatantes et affecter de nombreux aspects de la vie quotidienne. Ces altérations sont caractéristiques d'un certain nombre des maladies neurodéveloppementales. Une meilleure compréhension de la base neurologique des troubles sensorielles est donc essentielle pour la prise en charge de ces pathologies et pour la conception de nouveaux traitements thérapeutique ciblant les mécanismes sous-jacents.

L'objectif de c'étude est de valider de nouveaux biomarqueurs comportementaux et neuronaux liés aux déficits du traitement des informations sensorielles chez des animaux modèles de troubles neurodéveloppementaux, en vue de proposer éventuellement, de manière raisonnée, un traitement pour améliorer les symptômes sous-jacents à ces altérations. Pour mener notre étude, nous proposons l'utilisation d'une nouvelle technique d'imagerie de l'activité neuronaux lors de l'exécution des tests comportementaux qui explorent la prise de décision basée sur la perception sensorielle, en combinaison, postérieurement, avec l'administration d'une molécule potentiellement thérapeutique. L'utilisation des modèles animaux est essentielle pour fort impact clinique de ce projet.

En accord avec le principe des 3Rs (réduction, raffinement, remplacement), nous avons réfléchi à notre projet de recherche de façon à réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés ainsi que la souffrance imposée par les procédures détaillées dans ce document. Nous avons estimé le nombre total d'animaux nécessaires à l'exploitation statistique des résultats de ce projet à 1616 souris. Réduction : La conception expérimentale soigneuse de notre projet permettra une stratégie de réduction globale de nombre animaux utilisés pour les études futures. De plus, nous avons intégré une stratégie permettant une évaluation précoce de nos résultats et si nécessaire, une réduction de nombre d'effectifs nécessaire à la réalisation de nos objectifs scientifiques. Raffinement : Les animaux seront hébergés dans une manière adaptée à leurs besoins et recevront une surveillance quotidienne et les soins adaptés. Tous les animaux seront hébergés en groupe avec du matériel de nidification et auront accès à de la nourriture et de l'eau sous forme liquide ou solide (gel). Tous les animaux seront habitués à la manipulation et aux procédures comportementales (pièce d'expérimentation). Plusieurs raffinements spécifiques aux procédures seront également prévus (définition des points limites précoces, mesures conservatoires et soins adaptés, utilisation de produits anesthésiants, analgésiques et anti-inflammatoires, manipulation quotidienne des animaux afin de diminuer le stress). Remplacement : Le projet porte sur l'étude des altérations

comportementaux et neurobiologiques chez des modèles des maladies neurodéveloppementales. Les expériences proposées nécessitent l'utilisation d'un modèle animal vivant et ne peut pas être remplacé par les études in vitro ou in silico. Les études cliniques ne sont pas adaptées à notre objectif expérimental car il s'agit d'une population clinique fragile et car les approches invasives sont nécessaires pour répondre à nos questions scientifiques futures. Les circuits neuronaux sont bien conservés chez les différentes espèces de mammifères et sont donc susceptibles d'être fonctionnellement similaires chez les rongeurs et les humaines. L'utilisation des modèles de plus faible sensibilité neuronale (tels que la mouche à vinaigre) n'est pas adaptée à notre projet, car cet organisme manque la structure cérébrale ciblée par notre étude.

19708 La réalisation d'études de toxicologie est une obligation réglementaire lors du développement d'un médicament humain afin d'en évaluer la sécurité avant les essais cliniques. L'objectif de ce projet est d'encadrer les études d'évaluation de la toxicité d'un nouveau composé lors d'administrations répétées chez le primate non humain. Ces études consisteront en l'administration répétées (quotidienne, hebdomadaire ou mensuelle) pendant une à plusieurs semaines avec une observation quotidienne des animaux, pesée corporelle, évaluation des effets sur les paramètres sanguins et urinaires, sur la densité osseuse via l'imagerie, évaluation cardiovasculaire et analyse histopathologique.

Le choix du primate non humain est basé sur la réglementation en vigueur qui demande la réalisation d'études précliniques sur 2 espèces dont une espèce non rongeur et sur le fait que le chien et le miniporc ne sont pas des espèces pertinentes pour l'évaluation de composé.

Le nombre d'animaux utilisé est défini par la réglementation (guidelines ICH (M3-R2, S3A, S4 et S7B), CHMP, European Medicines Agency Guideline on repeated dose toxicity : CPMP/SWP/1042/99, 18 Mars 2010 par exemple) et est adapté au design de chaque étude.

Pour leur bien-être, les animaux sont hébergés en groupes sociaux à l'exception de certaines phases limitées dans le temps et en nombre. Les animaux sont hébergés dans des volières avec à disposition des perchoirs, barrières visuelles, balançoires et divers jouets. Des mélanges de fruits secs, graines, cacahuètes ou autres friandises sont distribués tous les jours dans de la litière permettant aux animaux de fourrager. Un programme d'habituation des animaux est mis en place à l'arrivée afin d'acclimater les animaux à leur nouvel environnement, aux conditions d'hébergement et aux procédures. Les animaux sont suivis quotidiennement sous la supervision d'un vétérinaire. Des points limites précoces sont appliqués de telle sorte qu'en cas de signes cliniques ayant des répercussions significatives sur l'animal, des mesures sont rapidement prises pour limiter la souffrance (mise en place d'un traitement analgésique, diminution de la dose testée, suspension de la procédure ou euthanasie).

Une partie de ce projet consiste à collecter des données morphologiques précises et à mesurer la densité osseuse. C'est pourquoi, des scanners à rayons X seront réalisés. Ce type d'imagerie qui est non invasif permet de suivre les memes animaux au cours du temps et donc de diminuer le nombre d'animaux utiles au projet (R de Réduire). Pour l'ensemble de l'étude, 400 individus seront utilisés.

Pour cela, les animaux seront transportés entre leur lieu d'hébergement (EU1) et l'imageur scanner (EU2) le matin des jours de scanner, titulaire d'un certificat de capacité pour les PNH.

En cas de besoin (animaux excités par le transport par exemple), une période d'acclimatation d'environ 1h sera réalisée.

Tous les actes réalisés sur les animaux seront assurés par du personnel formés titulaire d'un certificat d'aptitude (travailler avec les PNH). Après les acquisitions scanners sous anesthésie réduite au maximum, une période de réveil sera respectée. Le trajet retour vers l'EU1 ne se fera qu'une fois les animaux réveillés et considérés comme aptes au transport par le vétérinaire.

19709 CONTEXTE DU PROJET :

Le cancer du côlon présente l'un des taux de mortalité par cancer les plus élevés au monde, la progression métastatique de la maladie et la résistance aux traitements étant souvent désignées

comme la raison principale de ces taux de mortalité élevés. Il est intéressant de noter que la progression métastatique et la résistance aux chimiothérapies partagent non seulement un type cellulaire commun, les cellules souches cancéreuses (CSC), mais aussi une voie de signalisation commune. Les cellules souches (CS) résident à la base des cryptes du côlon (invaginations qui ponctuent la lumière du côlon) et l'activation des CS est étroitement liée au milieu environnant. Il est important de noter qu'au cours de la croissance d'une tumeur primaire, la nature hyperproliférative de la masse tumorale provoque l'écrasement et la compression du milieu environnant, ce qui entraîne une augmentation localisée de la pression intracellulaire (pression de croissance tumorale ; stimulus mécanique). Ce changement de pression intracellulaire déclenche finalement l'activation des CSC et d'un capteur sensible aux contraintes mécaniques, mettant en évidence un rôle mécanique dans la progression métastatique et la résistance aux chimiothérapies. Ainsi, nous proposons d'inhiber pharmacologiquement le récepteur Ret activé mécaniquement pour stopper la progression du cancer du côlon et également la résistance aux chimiothérapies.

Le vandétanib (Vande) est une chimiothérapie orale fréquemment utilisée pour traiter les cancers de la thyroïde en ciblant des capteurs spécifiques qui résident à la surface des cellules, dont le récepteur Ret, capteur sensible aux contraintes mécaniques. Le Vande a déjà été testé dans plusieurs essais cliniques de phase I sur le cancer colorectal métastatique en association avec les chimiothérapies colorectales de référence, le leucovorin (acide folinique), le fluorouracil (5-FU) et l'oxaliplatine (Ox) (FOLFOX). Dans chacune de ces études, Vande a été administré en même temps que FOLFOX et n'a révélé aucune interaction médicamenteuse, aucune diminution de la croissance tumorale et aucune augmentation significative de la survie des patients. Pourtant, il a été démontré que le Vande seul diminuait significativement la charge tumorale dans des modèles *in vivo* et *in vitro* ; cependant, afin d'aller de l'avant avec un modèle préclinique, le Vande doit être testé seul et en association avec les protocoles de chimiothérapie de référence actuels. Ainsi, au vu des résultats décevants des précédents essais cliniques de phase I sur le Vande, nous émettons l'hypothèse que le moment de l'administration des deux régimes chimiothérapeutiques doit être évalué, car on sait que le moment de l'administration de chaque médicament détermine l'efficacité thérapeutique, la toxicité et les synergies. Ce projet permettra d'administrer Vande pendant 14 jours avant le premier cycle de FOLFOX, afin de supprimer l'activation de Ret, de diminuer l'activation des CSC et donc de réduire non seulement la progression métastatique mais aussi la résistance aux chimiothérapies.

OBJECTIFS ET AVANTAGES DU PROJET :

Cette étude préclinique utilisera des modèles de PDOX, xénogreffes de cancer du côlon humain (ie des tumeurs humaines greffées dans le côlon de souris). En utilisant un modèle PDOX, nous sommes en mesure de récapituler entièrement le microenvironnement tumoral et l'environnement mécanique endogène présent dans les tumeurs humaines, ce qui nous permet d'évaluer avec précision l'efficacité thérapeutique du prétraitement des tumeurs avec Vande pour supprimer le signal mécanique qui, selon nous, est à l'origine des métastases et de la résistance à FOLFOX dans les tumeurs humaines. Ainsi, cette étude est l'une des premières du genre au niveau mondial, à considérer l'importance des forces mécaniques dans la promotion et la régulation de la progression métastatique et de la résistance aux chimiothérapies en adoptant une approche mécanopharmacologique de la chimiothérapie.

3R (REMPACER, RÉDUIRE, RAFFINER):

Remplacement : Malheureusement, ce projet préclinique ne peut plus être abordé ni étudié à l'aide de modèles cellulaires *in vitro*. Cette étude vise à se rapprocher le plus possible de la situation humaine et utilise donc des tumeurs humaines biopsies cultivées sous forme de xénogreffes qui sont ensuite transplantées dans le côlon (orthotopique) de souris immunodéprimées. La conception de cette étude et l'utilisation de modèles PDOX permettront de tester notre hypothèse sur un modèle qui reflète directement le métabolisme compliqué des médicaments qui se produit chez les patients humains.

Les questions soulevées dans le projet préclinique ne peuvent être étudiées à l'aide de modèles cellulaires *in vitro* et nécessitent une complexité tissulaire et multisystémique (hépatique, vasculaire, etc.) qui ne peut être trouvée que dans des modèles *in vivo*.

Réduction : Ce projet utilisera un nombre maximum de 1490 souris immunodéprimées. Le nombre de souris peut être réduit en fonction des résultats et des analyses obtenus à chaque étape.

Raffinement : Toutes les souris seront surveillées quotidiennement et les expériences seront menées de manière à minimiser et à prévenir la douleur. Des soins seront prodigués aux souris pendant et après toutes les opérations chirurgicales afin de surveiller le processus de guérison. En outre, le bien-être des souris sera contrôlé quotidiennement tout au long de l'expansion de la tumeur, de l'implantation de la xénogreffe colique et de la croissance de la tumeur, ainsi que tout au long de la phase de traitement, afin de s'assurer du bon état clinique des animaux et, le cas échéant, de mettre en place des soins support adaptés à la situation.

19710 L'objectif du projet est d'acquérir des références sur les performances d'une race bovine à faible effectif sur laquelle il existe peu de données : la race Maraîchine. Cette dernière est une race fortement liée aux marais atlantiques. C'est à l'origine une race mixte mais depuis les années 1990, la race a été sélectionnée par les éleveurs pour la production de viande. Elle est reconnue pour sa rusticité : bonne résistance aux maladies et aux parasites gastro-intestinaux, facilité de vêlage, adaptation aux prairies humides, bonnes aptitudes maternelles et capacité à ingérer des fourrages grossiers. Dans les années 80, les fondateurs du programme de conservation de la race se sont basés sur des caractères phénotypiques et sur les aptitudes des animaux, que ce soit pour le format, la couleur de la robe, la facilité d'élevage, la valorisation des prairies, et la résistance aux maladies. Aujourd'hui les vaches Maraichines présentent toujours une forte hétérogénéité des caractéristiques physiques et des performances.

Il s'agit dans ce projet de quantifier la production laitière des vaches et la croissance des veaux en condition d'élevage en ferme expérimentale pour produire des données à destination (i) de la ferme elle-même pour mieux gérer le troupeau (sélection des vaches de réforme et choix des génisses de renouvellement), et (ii) des éleveurs de vaches Maraîchines. Le troupeau expérimental est considéré comme représentatif des troupeaux de race Maraîchine rencontrés dans les élevages. Il est le seul élevage ayant les capacités de mettre en place cette procédure et donc d'acquérir des données de production laitière pour caractériser cette race rustique.

Pour cela, nous avons retenu une méthode dite de double pesée ou encore contrôle laitier. Celle-ci est considérée comme la méthode de référence et est appliquée dans les fermes expérimentales. Elle consiste à peser le veau avant et après la tétée pour évaluer grâce à la différence de poids constatée, le lait bu par le veau et donc le lait produit par la mère.

Dans notre projet, les vaches de notre troupeau ayant vêlé à l'automne du début septembre à la mi-octobre qui sont remises à la reproduction en hiver, seront intégrées dans la procédure avec leur veaux. Il y aura un seul lot expérimental par an de 18 vaches et 18 veaux. Aucun traitement différenciant les animaux ne sera appliqué. Les veaux seront âgés de 15 jours à 1 mois au démarrage de la procédure. La procédure annuelle durera au total 5 à 6 mois, jusqu'à la sortie des vaches au pâturage avec leur veau fin mars. La composition du lot expérimental en termes d'individus sera légèrement différente entre les années car chaque année deux à trois vaches sont réformées et deux à trois génisses sont introduites dans le troupeau pour le renouvellement. Nous ferons un suivi longitudinal des performances durant 5 années de suite, ce qui nous fera utiliser un total de 180 animaux (18 vaches et 18 veaux par an sur 5 ans).

Nous suivrons la "règle des 3R".

Remplacer : l'utilisation des animaux est indispensable dans ce projet pour évaluer la performance laitière des vaches de race Maraîchine.

Réduire : nous réaliserons un suivi longitudinal pour acquérir des données sur les performances des animaux de race Maraîchine en termes de production laitière mais aussi pour sélectionner les veaux femelles qui sont issus de mère bonne productrice laitière. Nous utiliserons pour cela les vaches de notre troupeau vêlant à l'automne qui seront mises à la reproduction, soit 18 vaches avec leurs 18 veaux par année. Une approche statistique n'est pas nécessaire dans ce type de suivi longitudinal qui vise à obtenir des références sur le long terme.

Raffiner : nous avons choisi d'utiliser une méthode indirecte d'évaluation de la production laitière qui est moins traumatisante que la traite manuelle ou mécanique pour les vaches allaitantes, tout en étant plus fiable scientifiquement. Pour diminuer le stress des veaux occasionné par la séparation les jours de contrôle, nous avons accolé leurs cabanes et leurs plateformes d'exercice aux cases des mères, de façon à ce que les veaux soient très proches et en contact visuel permanent avec les mères.

19711 La demande de lait et de viande issus des ruminants augmente dû à la croissance de la population mondiale et l'amélioration des conditions socio-économiques dans des pays émergents. Pourtant, la durabilité des systèmes de production de ruminants est une préoccupation mondiale due à la raréfaction des ressources (terres, aliments, ...) et la production de gaz à effet de serre (GES), particulièrement de méthane entérique. Les ruminants sont la principale source agricole de ce GES puissant qui a un potentiel de réchauffement global 28 fois supérieur à celui du CO₂. La production de méthane représente aussi une perte d'énergie pour l'animal de 6% à 8% de l'apport alimentaire. De nombreuses stratégies ont été développées pour limiter la production de méthane chez les ruminants. Par exemple, certains additifs alimentaires (comme les algues et le 3-nitrooxypropanol) permettent de réduire le méthane d'environ 30 %. Mais l'énergie alimentaire économisée par la réduction de la production de méthane n'est pas toujours utilisée par l'animal pour améliorer la performance. L'objectif de cette étude est d'utiliser un capteur d'hydrogène naturel pour améliorer la production des vaches lorsque la production de méthane est inhibée par des algues (autorisées par le règlement (UE) N° 575/2011 de la commission du 16 Juin 2011 relatif au catalogue des matières premières pour aliments des animaux). Basés sur nos résultats in vitro, nous utiliserons l'acide gallique (autorisé par le règlement (UE) N°2017/63 de la commission du 14 décembre 2016) comme capteur d'hydrogène. Cette molécule est une sous-unité du tanin hydrolysable présent naturellement dans certaines plantes. Le microbiote utilise l'acide gallique pour produire des acides gras volatils qui sont une source d'énergie pour l'animal hôte. L'étude sera menée avec 28 vaches Holstein affectées de manière aléatoire à l'un des 4 traitements : CON (contrôle, régime de base), SEA (0,5 % d'algues dans la ration), GA (1,5 % d'acide gallique dans la ration) et MIX (algues + acide gallique). Ce type d'expérimentation ne peut pas être remplacé par des modèles in vitro mais le nombre d'animaux et la méthodologie choisie tient compte des critères de réduction et raffinement (règle des 3R). Les techniques des prélèvements qui seront utilisées sont des pratiques couramment appliquées en élevage. Le régime de base est un régime standard typique des zones de montagne européennes. Les vaches seront nourries conformément à leurs besoins (fourrages et concentrés). La part de fourrage dans le régime total représentera environ 70 %. Les vaches seront nourries ad libitum une fois par jour vers 8 h 30 et seront traitées deux fois par jour à 6 h 30 et 16 h 30. Les performances des vaches (rendement laitier, poids corporel, indice d'état corporel, consommation de matière sèche, production de méthane) seront contrôlées. La santé et le bon fonctionnement de la digestion seront également étudiées. Cette expérience devrait permettre d'améliorer la production animale et de réduire davantage la production de méthane en utilisant des inhibiteurs de méthane.

19712 La manipulation de certains métaux par les travailleurs de l'industrie électronucléaire comme les actinides (plutonium ou américium), le cobalt ou le strontium, engendre un risque de contamination. Des contaminations de la peau ou d'une plaie sont régulièrement observées depuis la généralisation de l'utilisation de ces composés à travers le monde, certaines engendrant des contaminations internes. Les actinides ne traversent pas ou faiblement la première barrière de la cornée stratifiée d'une peau saine. Toutefois, une perte d'intégrité de cette barrière par blessure mécanique, chimique ou thermique, permet l'entrée de ces composés. Le type et la localisation de la blessure ainsi que les propriétés physico-chimiques du contaminant conditionnent leur comportement dans l'organisme.

La décorporation est le terme utilisé pour définir l'ensemble des traitements visant à éliminer de l'organisme des éléments radioactifs ou toxiques qui ont été incorporés, au moyen d'une substance chimique. Le DTPA (acide diéthylène triamine penta acétique) est le seul traitement des actinides

recommandé et disposant d'une autorisation de mise sur le marché à ce jour. L'efficacité de décontamination par le DTPA dans le cas des actinides dépend du protocole du traitement et repose sur deux points essentiels : le délai entre la contamination par blessure et le traitement d'une part, et le type d'administration du traitement (local externe ou interne à la plaie et/ou en systémique) d'autre part. En concertation avec les médecins impliqués dans le traitement des travailleurs contaminés par des actinides, nous allons tester chez les rongeurs différents protocoles de traitement (notamment le DTPA) après contamination d'une plaie par différents actinides, seuls ou en combinaison. A terme, le présent projet permettra une amélioration de la prise en charge des personnes après contamination par blessure par des actinides, ou autres composés rencontrés au poste de travail dans l'industrie nucléaire.

Des études précédentes ayant montré que le DTPA avait une efficacité limitée au niveau du site de contamination, nos objectifs sont de proposer de nouvelles approches locales de décontamination avec de nouveaux produits. Leur efficacité sera évaluée à court terme, en comparaison avec un traitement plus classique (injection de DTPA). Les critères d'efficacité des traitements seront la diminution de la contamination au niveau local (peau/plaie), l'augmentation de l'excrétion urinaire ainsi que de la rétention dans les organes cibles (os, foie). Les mesures de l'activité locale ou systémique seront réalisées deux heures après la décontamination, par spectrométrie gamma ou en scintillation liquide.

En accord avec la réglementation, la règle des 3R (remplacement – réduction – raffinement) sera appliquée.

Ce projet ne peut pas être réalisé à l'aide des modèles in vitro car, selon la nature des contaminants ceux-ci sont retenus par différents organes cibles au sein de l'organisme via un passage par la circulation sanguine dans le cas de contamination interne. Toutefois, des expérimentations ex vivo nous ont permis de sélectionner les candidats décontaminants les plus prometteurs. Par ailleurs, les nombreux résultats obtenus au laboratoire depuis plus de 10 ans sur un modèle de plaie contaminée, nous ont permis de cibler les conditions expérimentales permettant une bonne reproductibilité des résultats, permettant l'utilisation d'un nombre d'animaux aussi bas que possible. La totalité de l'expérimentation sera réalisée après traitement analgésique et sous anesthésie profonde. Durant le temps de l'expérimentation, un support thermique sera apporté aux animaux pour éviter leur refroidissement. Enfin, précédant leur entrée en expérimentation, les animaux seront hébergés en groupes sociaux dans des conditions de bien-être contrôlées, dans un milieu enrichi avec libre accès à la boisson et la nourriture.

Ce projet, d'une durée de 5 ans, fait appel à 192 rats, espèce utilisée au laboratoire depuis plusieurs décennies pour l'étude de la biocinétique et de la décontamination des actinides et pour laquelle le laboratoire possède déjà de nombreuses données. Le nombre d'animaux par groupe (8) a été réduit au minimum nécessaire permettant une interprétation statistique fiable des résultats. Il a été déterminé en fonction des différents protocoles de traitement à tester pour les différents contaminants.

Tous les animaux proviennent d'élevages agréés et sont nés et élevés en captivité. La création d'une plaie pouvant engendrer des souffrances, les animaux sont maintenus sous anesthésie tout au long de l'expérimentation (au maximum de 3h). Cette procédure est donc sans réveil, des temps courts d'observation, dans ce cas, étant représentatifs d'une efficacité des traitements à plus long terme. Un traitement antalgique (anti-inflammatoire non stéroïdien) est administré systématiquement. Les protocoles ont été définis et validés par l'équipe vétérinaire.

19713 Les cancers sont un problème majeur de santé publique. Certains sont peut-être évitables par la modification des comportements alimentaires. Le régime céto-gène, un régime riche en graisses et pauvre en glucides avec des quantités adéquates de protéines, a prouvé son intérêt dans des maladies du système nerveux central. Il semble également qu'il sensibilise la plupart des cancers au traitement standard en exploitant le métabolisme reprogrammé (utilisation préférentielle de la glycolyse anaérobie) des cellules cancéreuses, faisant de ce régime un candidat prometteur comme traitement adjuvant du cancer. Comme le développement tumoral consomme beaucoup d'énergie, il est probable que le régime céto-gène en limitant les ressources énergétiques de l'organisme

affaiblisse la machinerie énergétique de la cellule cancéreuse et réduise la croissance tumorale. En conséquence nous proposons un projet de recherche translationnel permettant de tester cette hypothèse. La réalisation du projet s'attache à respecter la règle des 3R. **REMPACEMENT**, le projet sera réalisé sur l'animal parce que la croissance des tumeurs et l'alimentation cétogène ne peuvent s'étudier que sur un modèle animal et nous utiliserons la souris car les données de la littérature montrent que les souris répondent positivement à ce régime. **RAFFINEMENT**, l'ensemble des tests sélectionnés pour cette étude n'entraîne pas de stress ou souffrance sévère pour l'animal. Les points limites seront liés à la présence de tumeur de taille trop importante ou mal placée. Les souris seront toutes placées deux ou trois par cage, avec des enrichissements (cotons, batonnets en bois). De plus, les animaux feront l'objet d'un suivi permettant de s'assurer de leur bien-être et de leur santé. Enfin, une étude précédente a permis d'établir la formulation d'une alimentation cétogène adaptée à la souris. **REDUCTION**, pour limiter le nombre d'animaux étudiés, nous avons sélectionné des souris qui développent spontanément un cancer de la glande mammaire avec une pénétrance complète selon une cinétique très bien documentée. Les cohortes expérimentales seront constituées de souris femelles. Le protocole consiste à comparer le développement tumoral de deux cohortes de souris alimentées selon deux régimes différents après le sevrage. La cohorte témoin sera nourrie avec une alimentation conventionnelle et la cohorte « cétogène » sera nourrie avec l'alimentation cétogène. Les animaux sont suivis et observés tous les jours. La présence de tumeurs sera contrôlée deux fois par semaine dès l'âge de 5 semaines par un examen clinique. Lors de l'examen clinique, la taille des tumeurs sera mesurée, ce sera l'occasion de vérifier que la maladie n'entrave pas le bien-être de l'animal. Les principaux paramètres mesurés seront l'incidence et la cinétique de la croissance tumorale. La comparaison entre les deux cohortes indiquera si le régime cétogène confère une protection contre le cancer dans le modèle étudié. L'ensemble de l'étude comportera 40 souris.

19714 D'après l'OMS 2 milliards de personnes dans le monde sont en surpoids, 650 millions sont obèses et 1 adulte sur 3 est atteint d'hypertension artérielle (HTA).

Dans l'hypertension, les vaisseaux sanguins subissent en permanence une pression élevée (pression diastolique ≥ 90 mmHg et pression systolique ≥ 140 mmHg), ce qui peut les endommager. Plus l'hypertension est élevée, plus les risques associés sont importants et peuvent entraîner des complications graves (AVC, insuffisance cardiaque, insuffisance rénale, infarctus de myocarde...).

En plus des risques vasculaires encourus, les personnes souffrant d'hypertension peuvent faire face à une diminution de leur qualité de vie (fatigue, essoufflement, palpitations, maux de tête...). Les facteurs de risques sont principalement liés à l'âge, au mode de vie et à des prédispositions génétiques. Dans les facteurs de risques liés au mode de vie, des mesures hygiéno-diététiques comme une prise en charge nutritionnelle adaptée, la pratique d'une activité physique modérée, un arrêt du tabagisme et une diminution de la consommation d'alcool sont des mesures efficaces de prévention de l'hypertension. Lorsque l'hypertension est à un stade plus avancé, les personnes sont traitées par des médicaments de type diurétiques, inhibiteur adrénergique, bêta-bloquants...

L'utilisation d'extraits végétaux en complément des mesures hygiéno-diététiques est également une piste sérieuse pour prévenir l'évolution de l'HTA.

Certains extraits végétaux issus de la pharmacopée européenne ont déjà montré des effets bénéfiques et protecteurs. L'objectif de ce projet est d'étudier les bénéfices apportés par différentes formulations innovantes d'extraits végétaux sur la prévention du développement de l'HTA dans différents modèles murins et de mieux comprendre les mécanismes d'action mis en jeu dans cette prévention.

Chez les rongeurs (rats, souris), il est possible d'induire un état d'hypertension en nourrissant les animaux avec un régime riche en gras et en sel (HF -HS) (mimant les mauvaises habitudes alimentaires impliquées en partie dans le développement de l'hypertension chez l'homme) durant plusieurs semaines. Une hypertension peut également être obtenue en ayant recours à des animaux naturellement hypertendus comme le rat SHR ou en ayant recours à l'administration de composés pharmacologiques.

Ce projet global de type nutritionnel nécessitera l'utilisation maximale de 48 souris et 144 rats sur une durée de 5 ans. Ce nombre est choisi de manière à obtenir les réponses attendues en ayant recours à des effectifs les plus petits possible (réduction du nombre d'animaux utilisés). Pour cela le projet se base sur la littérature scientifique existante, utilise des outils de calcul statistique (a priori et a posteriori) et privilégie les méthodes non terminales permettant les suivis longitudinaux des animaux. Les modèles ex vivo, in vitro et in silico, bien que très utiles sur certains aspects et indispensables au principe de remplacement, ne permettent pas encore d'obtenir une approche globale aussi complexe que celle de l'hypertension chez un mammifère, pour approcher au plus près de la réalité retrouvée chez l'Homme. Pour ce projet, l'utilisation de modèles murins de petite taille est privilégiée aux plus grandes espèces plus susceptibles de ressentir de la douleur sur une plus longue période (remplacement).

Au cours de ce projet, les animaux seront placés dans un environnement adapté à leurs besoins physiologiques et observés quotidiennement sur la base de critères comportementaux (posture, appétit, interaction avec l'environnement...) et morphologiques (croissance, prise de poids, état général des dents, du poil...) pour prévenir au plus vite de la diminution de leur état de bien-être (raffinement). Les différents tissus obtenus au cours de ce projet seront stockés pour permettre des analyses ultérieures et éviter de devoir recourir à un projet similaire dans le temps. L'ensemble de ces dispositions répond aux principes fondamentaux des 3Rs (réduction, raffinement, remplacement) dans le cadre de l'utilisation d'animaux à des fins scientifiques.

19715 La prévalence mondiale du diabète ne cesse d'augmenter touchant 463 millions de personnes dans le monde. Chaque année, plus de 4 millions de patients meurent à cause du diabète. Dans cette pathologie, la forte concentration de glucose plasmatique a des effets délétères au niveau périphérique et central, induisant notamment une neuroinflammation et un stress oxydant cérébral. Le diabète favorise aussi la formation de plaque d'athérome augmentant alors les risques d'accidents vasculaires cérébraux (AVC). De surcroît, plusieurs études ont montré qu'une condition diabétique était un facteur d'aggravation des conséquences de l'AVC par rapport à un individu non diabétique.

À la suite d'un AVC, plusieurs mécanismes cellulaires se mettent en place. Immédiatement après lésion, les astrocytes et les microglies sont activés et migrent en direction de la lésion cérébrale participant à la mise en place d'une structure appelée cicatrice gliale. Cette dernière est principalement constituée d'astrocytes et de matrice extracellulaire. Diverses études ont mis en évidence le double rôle de cette cicatrice gliale. Ainsi, au cours des premiers jours post-lésion, la cicatrice gliale est bénéfique et permet de limiter la mort des neurones et la propagation de l'inflammation. Dans un second temps, autour de la lésion, les astrocytes vont produire une matrice extracellulaire empêchant les processus de régénération.

L'objectif de cette étude est de caractériser l'effet du diabète sur la mise en place de cette cicatrice gliale en étudiant la mort cellulaire, la réactivité microgliale et astrocytaire ainsi que les premières étapes de réparation cérébrale.

L'ensemble du projet se déroulera sur des modèles de souris contrôle (Db/+) et Db/Db (diabétique) (80 animaux maximum).

Dans le but d'étudier l'effet du diabète sur la mise en place de la cicatrice gliale, nous réaliserons une occlusion cérébrale de l'artère moyenne (MCAO) pendant 30 minutes, pour mimer une ischémie cérébrale (AVC) chez les souris contrôle (Db/+) et Db/Db.

Ainsi :

- 40 souris maximum (20 Db/+ et 20 Db/Db) seront utilisées pour tester l'effet du diabète sur le recrutement des cellules impliquées dans la mise en place de la cicatrice gliale et de la mort cellulaire 3 jours après une MCAO (microglie + astrocytes)

- 40 souris maximum (20 Db/+ et 20 Db/Db) seront utilisées pour tester l'effet du diabète sur l'établissement de la cicatrice gliale et sur le processus de réparation cérébrale 7 jours après une MCAO (prolifération des cellules souches + hypertrophie astrocytaire + récupération motrice)

Cette étude pourra amener au développement de thérapies visant à moduler la cicatrice gliale chez l'Homme et à favoriser la récupération fonctionnelle.

Cette étude répond à la règle des 3R :

Remplacement : Il existe des modèles in vitro de déprivation en glucose et en dioxygène mimant l'AVC dans la littérature. Mais ces modèles ne miment pas les conditions complexes d'une ischémie cérébrale in vivo puisqu'ils ne prennent pas en compte la complexité physiologique du tissu cérébral. Des tests in vivo ont déjà été réalisés afin de trouver le temps d'occlusion optimale, induisant un moindre taux de mortalité chez les souris. Seul le modèle animal permet donc de reproduire des conditions mimant au mieux une ischémie cérébrale chez l'homme tout en prenant en compte la complexité des types cellulaires recrutés et activés lors d'un AVC. Il apparaît alors indispensable d'avoir recours au modèle animal pour tester nos différentes hypothèses.

Réduction : l'ensemble des expériences ont été conçues afin d'utiliser le moins d'animaux possible, permettant également de réaliser des études statistiques (student t-test et ANOVA). Les études précédentes au laboratoire, nous permettent d'estimer la variabilité de ces expérimentations et de proposer le nombre optimal d'animaux nous permettant d'avoir une puissance statistique suffisante pour pouvoir valider ou non les hypothèses testées. La répartition des différentes études nous permet d'arrêter l'expérimentation animale en cas de souffrance ou de force statistique suffisante.

Raffinement : les animaux seront placés dans des conditions optimales (les souris seront au nombre maximum de 5 par cage). L'atmosphère sera contrôlée en température et humidité. Ils auront à disposition nourriture et boisson. Une anesthésie générale est prévue avant toute manipulation invasive. Dans un souci de réduction de la douleur, toutes les mesures seront prises pendant les expérimentations (anesthésie, analgésie). Un enrichissement adapté à ce type d'expérimentations sera mis en place. Des points limites adaptés et des critères d'arrêt sont prévus.

Un nombre maximum de 80 animaux sera utilisé dans ce projet (à savoir que ce nombre ne sera pas atteint si les points critiques établis par les réglementations éthiques étaient atteints ou si les tests statistiques sont suffisamment forts pour garantir nos résultats). La lignée de souris utilisée est la C57BL6 Db/+ et Db/Db est couramment utilisé pour ces études.

19716 Les épisodes diarrhéiques ou de selles molles sont fréquents chez les chiots entre le sevrage et les premiers jours suivants son adoption et sont multi-factoriels (race, agents pathogènes, alimentation, stress, vermifugation, vaccination...).

Ces désagréments gastro-intestinaux peuvent avoir un impact direct sur le bien-être de l'animal dans une étape de la vie déjà difficile et stressante pour le jeune chiot (sevrage, transition alimentaire, séparation de la mère et des compagnons de portée, adoption par le nouveau propriétaire, adaptation à un nouvel environnement, multiplication des interactions sociales. . .).

Notre hypothèse est qu'une supplémentation avec un probiotique pourrait avoir un impact positif sur ces problèmes gastro-intestinaux. Ainsi, dans cette étude, nous souhaiterions évaluer l'effet bénéfique d'un probiotique sur le nombre et/ou la gravité et/ou la durée des épisodes de diarrhée et sur la santé intestinale du chiot (immunité, microbiote).

Cette étude impliquera un maximum de 60 chiots entre 4 et 10 semaines d'âge sur l'ensemble du projet.

Ce projet d'étude a été conçu de manière à respecter la législation française et européenne en vigueur pour l'expérimentation animale et répond aux impératifs des 3R. La partie substitution (Remplacement) n'est pas envisageable sur ce projet puisque les échantillons doivent être réalisées sur l'espèce cible (chien). La partie réduction (Réduction) a été prise en compte par des analyses de puissance statistique fixant les minimums d'animaux requis pour détecter les écarts ayant un sens biologique. Enfin, la partie raffinement (Refinement) est prise en compte par la réalisation du protocole dans un élevage de pointe et de grande technicité.

19717 La grippe saisonnière est un problème de santé publique mondial, avec 250-500 000 décès/an, dont 90% sont âgés de ≥ 65 ans. Ce plus fort de mortalité chez les sujets les plus âgés est expliqué par une sensibilité accrue aux infections et une réduction d'efficacité de la vaccination antigrippale

(entre 29,2-51% de séroconversion contre $\geq 60\%$ en population générale). Au-delà de 65 ans, un élément causal central est l'immunosénescence, associant inflammation chronique et baisse de l'immunité innée et adaptative.

Contre l'immunosénescence, les trois grands types d'interventions connues sont : la restauration du système immunitaire qui consiste généralement en l'administration de substances diverses (cytokine, facteur de croissance, hormones, vitamines, nutriments) dans l'espoir d'induire un environnement favorable à la production immunitaire ; le remplacement du système immunitaire dont le principe est de remplacer les cellules déficientes par des cellules immunocompétentes ; et la reprogrammation du système immunitaire qui a pour objectif de reprogrammer les capacités fonctionnelles du système immunitaire. Ces différentes approches ont pour objectif final de reconstituer un pool de lymphocytes naïfs périphériques immunocompétents.

Dans notre projet, nous souhaiterions développer un nouvel axe de recherche dans la lutte contre l'immunosénescence se basant sur l'utilisation de stratégies thérapeutiques modifiant le système immunitaire (thérapeutiques dites immunomodulatrices) dont l'objectif serait de favoriser la restauration et/ou le renouvellement du système immunitaire en luttant contre l'inflammation délétère et la suractivation des cellules immunitaires, qui sont des composantes clés de l'immunosénescence.

Dans un deuxième temps, nous étudierons l'impact de cette réadaptation du système immunitaire sur la réponse au vaccin contre la grippe et à son efficacité.

Parmi les stratégies thérapeutiques immunomodulatrices que nous souhaitons élaborer, l'utilisation du jeûne thérapeutique pourrait présenter des résultats intéressants en termes de renouvellement du système immunitaire. Le jeûne thérapeutique correspond aux procédures visant à limiter les ingesta caloriques pendant une période déterminée à des fins thérapeutiques. Les effets bénéfiques de ces régimes (dont les modalités sont variables, avec à minima une restriction calorique plus ou moins importante) ne se limitent pas au domaine de l'immunologie, puisqu'il existe des données suggérant, qu'en plus d'un effet sur la longévité, la restriction calorique diminue le risque de survenue de cancer, de maladie métabolique ou encore d'évènement cardio-vasculaire. Parmi ces stratégies diététiques, le « régime mimant le jeûne » (RMJ ou FMD pour "Fasting-Mimicking Diet"), consiste en une réduction significative des apports alimentaires, sans toutefois les supprimer, en privilégiant des aliments capables de mimer les effets métaboliques du jeûne. La période de jeûne se fait sur plusieurs jours consécutifs (3 à 7 jours) entrecoupés de période d'alimentation normale. Le RMJ semble être le meilleur compromis actuel entre efficacité et tolérance, par rapport à un jeûne complet.

D'autres approches utilisant des thérapeutiques immunomodulatrices et/ou immunosuppressives connues et utilisées en pratique courante, dans d'autres indications, seront évaluées dans notre projet afin de permettre une comparaison avec le RMJ.

Avant d'envisager une approche humaine, il convient de tester cette approche originale en utilisant un modèle in vivo. La complexité du système immunitaire et des autres systèmes impliqués, leurs étroites connexions et relations ne nous permettent pas d'utiliser des modèles cellulaires ou équivalents. Nous ne pouvons pas remplacer cette étape sur animaux : cette validation de concept est indispensable avant le passage à un essai clinique chez l'humain.

Le design de l'étude a été élaboré par les différents professionnels impliqués dans le projet afin de réduire au maximum le nombre de groupes et le nombre d'animaux par groupe tout en garantissant une qualité d'analyse pertinente. Le modèle animal murin est le plus adéquat à notre étude. Le nombre de souris nécessaire sera de 710.

Chaque animal bénéficiera d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. La douleur sera rigoureusement contrôlée grâce à des points limites évalués en amont, et gérée grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (myorelaxant / anesthésie/analgésie). Par ailleurs, les animaux seront hébergés en groupes harmonieux ; dans un environnement enrichi (copeaux, matériel de nidification, bâtonnets à ronger). Enfin, en période non interventionnelle l'eau et la nourriture seront mises à disposition "ad libitum" et de la musique est diffusée en salle

d'hébergement pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux. En période interventionnelle de RMJ, les apports caloriques seront contrôlés et les apports en eau seront "ad libitum".

19718 Objectif du projet :

La Sclérose Tubéreuse de Bourneville (STB) est une maladie génétique rare qui se caractérise par des crises épileptiques précoces et souvent réfractaires aux approches pharmacologiques disponibles. La présence de ces crises pendant les phases précoces de la vie est un facteur de risque important au développement d'une multitude de symptômes neurologiques retrouvés dans la STB. Il est donc essentiel de trouver de nouvelles approches pharmacologiques afin de traiter plus efficacement et le plus tôt possible les crises épileptiques infantiles et ainsi limiter la survenue d'un syndrome neurologique complexe.

Malgré le besoin considérable, les laboratoires pharmaceutiques se sont plutôt attachés à développer des médicaments antiépileptiques actifs vis-à-vis des épilepsies de l'adulte et ne s'investissent pas dans ce marché de niche qui implique des études cliniques contraignantes sur le plan éthique.

Cependant, la découverte des mécanismes physiopathologiques sous-tendant cette maladie rare pourrait contribuer à identifier des cibles thérapeutiques originales et prometteuses. Une équipe composée de médecins épileptologues et pédiatres confrontés quotidiennement à la réalité du terrain hospitalier, de neurobiologistes et de pharmaco-chimistes a décidé de relever ce défi : après une sélection et une synthèse de 120 molécules, des tests in vitro et ex vivo ont permis de sélectionner et « hiérarchiser » les molécules selon les critères suivants : (i) biologiques (efficacité in vitro et ex vivo), (ii) pharmacocinétiques (dont le passage de la barrière hémato-encéphalique(BHE)) mais aussi, (iii) physico-chimiques (hydrosolubilité, stabilité, formulation). Ces recherches ont donné lieu au dépôt de deux brevets à l'international. Un criblage très sélectif par des tests ex vivo sur coupes cérébrales de jeunes souriceaux transgéniques a permis de ne retenir que quatre molécules particulièrement prometteuses et de réduire ainsi au maximum le nombre d'animaux transgéniques utilisés pour ce projet.

L'objectif de ce projet est de tester l'efficacité et la toxicité de ces molécules présentant un potentiel thérapeutique élevé sur les crises épileptiques par des enregistrements d'électroencéphalogramme (EEG) in vivo sur des souris transgéniques, modèles de la STB. Le nombre total de souris, durant les 5 ans du projet, est établi à 435 animaux : 35 souris seront utilisées pour l'étude de faisabilité et 400 souriceaux pour les enregistrements électrophysiologiques sur notre modèle.

Avantages/Dommages escomptés :

Ce projet aura des bénéfices pour l'Homme à plusieurs niveaux. Actuellement, il n'existe pas de traitement efficace pour soigner les épilepsies infantiles. De plus, la STB étant une maladie rare et peu caractérisée, ce projet nous permettra de mieux comprendre sa physiopathologie grâce au modèle de souris transgéniques qui développent des crises épileptiques spontanées de 13 à 18 jours post naissance (P13 à P18). Cette phase épileptogène transitoire cesse spontanément au-delà de 20 jours, assurant à l'animal une durée de vie semblable à celle des souris sauvages.

Les souris transgéniques utilisées sont des souris modèles de la STB et constituent un modèle fiable d'épilepsie génétique humaine. Leur bien-être sera attentivement suivi durant toute la durée du projet grâce à des fiches d'observation adaptées. Des procédures de prise en charge seront également mises en place. Des points limites préalablement définis permettront d'assurer un suivi de l'état général des animaux et de mettre en place des interventions précoces et adaptées en cas de souffrance animale.

Méthodes alternatives (principe de remplacement) :

Les enregistrements EEG intracrâniens sont indispensables à l'établissement de la preuve de concept des molécules en développement. En effet, l'épilepsie humaine est une pathologie complexe des réseaux neuronaux qui concerne le cortex cérébral mais également les connexions sous-corticales. Il n'est donc pas possible de mimer cette pathologie sur des modèles ex vivo. Seul un modèle murin est capable de reproduire les circuits corticaux et sous-corticaux impliqués dans

la STB. Aucune technique autre que celle de l'enregistrement EEG éveillé, n'est connue pour identifier l'effet d'une molécule sur les crises épileptiques. Il s'agit d'une technique communément utilisée en clinique humaine (« neurochirurgie éveillée ») afin de guérir le jeune patient épileptique. Il n'existe donc aucun modèle in vitro permettant de se soustraire à cette étude in vivo. La preuve de concept de l'efficacité de la molécule dans un modèle animal (reproduisant la symptomatologie observée en clinique) est incontournable pour engager par la suite les phases cliniques. Cette phase préclinique précoce sera exigée par les Autorités réglementaires dans le cadre de cette recherche pharmaceutique.

Réduction :

Notre stratégie est totalement gouvernée par la recherche d'une économie maximale des animaux : des études préalables in vitro réalisées sur culture cellulaire et sur tranches de cortex d'animaux transgéniques ont permis de sélectionner les meilleures molécules destinées à l'essai in vivo. Le nombre de souris utilisé a été réduit autant que possible, tout en étant suffisant pour l'obtention de résultats exploitables. L'évaluation du nombre d'animaux nécessaire ainsi que l'analyse des résultats seront effectuées à l'aide de logiciels spécialisés. Nous adapterons les tests statistiques en fonction de la distribution des observables, qu'elle soit normale ou non

Raffinement :

Les animaux seront hébergés dans des cages collectives avec un environnement enrichi (jouets, copeaux de bois à grignoter, contact visuel et olfactif entre les animaux, musique, commutation progressive de la lumière et interactions fréquentes avec les humains...). Nous réduirons le stress procuré à l'animal en limitant au maximum le bruit dans l'animalerie et en les manipulant avec calme et soin. Boisson et nourriture seront disponibles ad libitum. Des points limites seront préalablement définis et permettront d'assurer un suivi de l'état général des animaux et de leur bien-être (souffrance, stress, angoisse), en particulier au cours des enregistrements EEG sur animal éveillé. En cas d'altération de l'état de l'animal, la surveillance sera rapprochée et les animaux seront soignés en fonction de la sévérité de la douleur observée. L'administration d'anesthésiques sera de rigueur pour toute procédure algogène.

19719 Les lymphomes sont des tumeurs malignes qui se développent à partir des lymphocytes, cellules sanguines qui constituent un sous-groupe de globules blancs. Les lymphomes primitifs du système nerveux central ou lymphomes oculo-cérébraux (LOC) sont des lymphomes qui se développent dans le cerveau. Ils peuvent être associés à une atteinte de l'œil, des méninges (enveloppes entourant le cerveau et la moelle épinière) et du liquide céphalo-rachidien (liquide présent entre les méninges), et plus rarement de la moelle épinière. C'est une forme rare de lymphome et de mauvais pronostic avec les traitements actuels. Compte tenu de la rareté de la maladie et de sa gravité, il n'est pas possible de « tester » de nouvelles associations directement chez l'homme.

De plus la particularité des LOC réside en partie dans leur localisation au niveau du système nerveux central (SNC). Le SNC présente une barrière anatomique et fonctionnelle au niveau de la barrière hémato-encéphalique qui limite le passage des traitements dirigés contre le lymphome. La biodisponibilité (= passage du médicament) au niveau cérébral de la plupart des médicaments contre le lymphome n'est, le plus souvent, pas connue de l'industrie pharmaceutique. Il est essentiel de s'assurer que des molécules potentiellement efficaces contre les lymphomes, soient efficaces dans le cas particulier des atteintes cérébrales, et ceci ne peut se faire que sur des modèles animaux.

Remplacement : Les études précliniques chez l'animal sont donc nécessaires pour mieux sélectionner les médicaments et les associations de médicaments qu'il serait utile d'évaluer chez l'Homme.

Notre molécule d'intérêt est une petite molécule dont le mécanisme d'action laisse présager de son efficacité dans les LOC. Son efficacité a déjà été démontrée dans des modèles cellulaires in vitro.

L'objectif du projet est d'évaluer l'efficacité de cette molécule seule mais aussi en association avec d'autres médicaments habituellement utilisés dans les LOC, sur un modèle murin. Les résultats de notre étude nous aideront d'une part, à valider l'efficacité de cette molécule dans cette localisation

particulière de lymphome et d'autre part à choisir la meilleure association de chimiothérapies qui pourra être proposée dans le cadre d'étude clinique chez l'Homme. Nous utiliserons un modèle de lymphome cérébral établi chez la souris adulte.

Réduction : Cette étude nécessitera l'intégration au maximum de 750 souris.

L'effectif a été statistiquement défini pour permettre l'obtention de résultats fiables avec le moins d'animaux possible.

Raffinement :

En accord avec les recommandations internationales dans le domaine de la cancérologie, les animaux seront suivis quotidiennement afin d'assurer leur bien-être. Une grille de score va nous permettre d'évaluer de façon objective l'état de l'animal et de prendre les mesures adéquates pour arrêter immédiatement sa souffrance. Par ailleurs, l'ensemble des gestes techniques seront réalisés sous anesthésie générale avec analgésie associée.

19720 Les cancers font partie des maladies les plus complexes à traiter. Parmi les différents types de cancer, ceux dits solides comme les cancers pancréatiques et pulmonaires sont très agressifs, ils répondent peu aux traitements actuels et de nombreuses rechutes sont observées. Il est donc nécessaire aujourd'hui de tester de nouvelles thérapies anti-tumorales dans des systèmes in vivo, qui contrairement au système in vitro, reflètent de façon plus précise les réponses attendues chez les malades.

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

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

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

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

anti-tumoraux efficaces aux patients atteints de tumeurs solides, de type pancréatiques et pulmonaires.

19721 Le cancer colorectal (CRC) représente un problème majeur de santé publique en France avec 36.000 nouveaux cas recensés chaque année. Le traitement a longtemps reposé principalement sur la chimiothérapie cytotoxique mais ces dernières années de profonds changements ont été opérés grâce au développement de thérapies ciblées ou biothérapies. Toutefois, ces traitements restent encore non efficaces dans un grand nombre de cas. Il est donc important de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires qui participent au développement tumoral afin d'envisager des pistes thérapeutiques qui soient pertinentes. Il est maintenant bien établi que le développement du cancer colorectal résulte d'un dialogue complexe entre la cellule épithéliale intestinale, cible de la transformation tumorale et le système immunitaire ainsi que le microbiote. Notre projet a pour objectif d'étudier les fonctions de ces différents acteurs dans ce dialogue et seule une approche intégrée par l'expérimentation animale qui mime le développement du cancer colorectal est envisageable en raison de la diversité des types cellulaires présents dans la tumeur et de la complexité de leur interaction avec le micro-environnement.

Nous utiliserons deux modèles murins bien établis d'induction du cancer colorectal qui miment le développement de cette pathologie chez l'homme. Il s'agit (1) du modèle d'induction du CRC par injection répétée du carcinogène chimique, l'Azoxymethane (AOM) et (2) du modèle de développement du CRC associé à l'inflammation qui consiste en une injection d'AOM suivie par trois cures de Dextran Sulfate Sodium (DSS) dans l'eau de boisson qui permet d'induire une colite inflammatoire. Le suivi du développement tumoral induit sera effectué par échographie.

Nous utiliserons trois modèles murins génétiquement modifiés afin d'étudier l'impact des gènes d'intérêt sur le développement du cancer du côlon induit par le traitement AOM/DSS. Pour ce projet nous utiliserons au total 240 souris sur 5 ans.

Pour respecter le principe des 3R et afin de limiter au maximum la souffrance des animaux, une surveillance quotidienne sera effectuée et intensifiée pendant les phases potentiellement délétères. La souffrance éventuelle des animaux sera estimée selon des critères précis. En cas d'atteinte des points limites définis, les animaux seront mis à mort de manière anticipée. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation, les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum. Le milieu est enrichi à l'aide de maisonnettes en carton et des cotons de nidification. Les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux. L'échographie, sous anesthésie générale, permet un suivi de la croissance tumorale au cours du temps limitant ainsi très fortement le nombre d'animaux nécessaires. Un nombre minimum d'animaux sera inclus dans chaque groupe mais toutefois suffisant pour assurer la reproductibilité de l'expérience et appliquer des tests statistiques entre les différentes conditions.

Ainsi les résultats de ce projet permettront de mieux comprendre les mécanismes moléculaires du développement du cancer colorectal et de définir de nouvelles cibles thérapeutiques pertinentes.

19722 La rhabdomyolyse (RM) se définit par une rupture de l'intégrité des cellules musculaires striées squelettiques, responsable de la fuite du contenu intracellulaire dans la circulation générale. L'insuffisance rénale aiguë (IRA) est une complication sévère et fréquente de la rhabdomyolyse. La survenue d'une insuffisance rénale aiguë au cours d'une hospitalisation est un facteur de risque indépendant de mortalité hospitalière et expose au risque d'insuffisance rénale chronique. Les mécanismes physiopathologiques conduisant au développement de cette IRA sont complexes et font intervenir de nombreux médiateurs, parmi lesquelles la myoglobine (métalloprotéine de stockage de l'oxygène dans la cellule musculaire striée squelettique) semble jouer un rôle clé.

Dans notre pratique clinique en traumatologie sévère, la rhabdomyolyse est fréquemment associée à une hémorragie. Au cours d'une hémorragie, l'hypovolémie (diminution de la masse sanguine) est à l'origine d'une hypoperfusion tissulaire et participe donc à l'aggravation de l'insuffisance rénale aiguë. Dans une étude récente évaluant l'impact de l'association du choc hémorragique (CH) et de la RM, nous avons observé dans un modèle porcin qu'il existe un effet synergique délétère précoce sur l'altération de la perfusion régionale, l'oxygénation et la fonction rénale lorsque ces deux

traumatismes sont associés. Plus largement, l'association d'un choc hémorragique et de rhabdomyolyse entraînerait une défaillance multi-viscérale précoce responsable d'une forte augmentation de mortalité. Or les mécanismes responsables de cette synergie délétère restent pour le moment méconnus.

L'objectif de ce projet est de caractériser le rôle de la myoglobine, de l'hème et du complément dans cette synergie conduisant au développement de l'insuffisance rénale aiguë post-traumatique, et d'évaluer l'efficacité de différentes stratégies thérapeutiques ciblant des voies de signalisation dont le rôle majeur est fortement suspecté. Ainsi, notre travail se décomposera en plusieurs étapes :

1. Évaluation chez le rat du rôle de la myoglobine dans le développement de l'IRA post-traumatique par injection intraveineuse de myoglobine équine associée ou non à un CH dans le développement de l'IRA.
2. Évaluation chez le rat du rôle de l'hème dans le développement de l'IRA post-traumatique par injection intraveineuse d'hème associée ou non à un CH dans le développement de l'IRA.
3. Évaluation chez le rat du rôle du complément dans le développement de l'IRA induite par rhabdomyolyse et choc hémorragique en injectant dans un modèle murin une protéine agissant comme inactivatrice du complément : le Cobra Venom Factor (CVF)
4. Évaluation chez le rat de l'efficacité de différentes stratégies thérapeutiques visant plusieurs voies de signalisation sur la prévention du développement de défaillance d'organe dans un modèle associant rhabdomyolyse et choc hémorragique. Les stratégies thérapeutiques explorées seront :
 - La chélation de l'hème par injection d'hémopexine ou d'albumine
 - Une immunomodulation par injection de corticostéroïde
 - L'inhibition du système du complément par injection d'inhibiteur spécifique du complément
 - L'inhibition du stress oxydant par injection d'un traitement antioxydant
 - L'inhibition de la production de médiateurs toxiques issus des neutrophiles et des macrophages par injection de DNase.

Pour répondre à nos problématiques et mener à bien ces quatre étapes, 372 rats répartis dans 31 groupes de 12 animaux et deux procédures seront nécessaires. Actuellement il n'existe aucune méthode *in vitro* permettant de répondre à nos objectifs. Cependant d'après la littérature, 8 animaux par groupe sont suffisants pour valider une différence de l'atteinte rénale entre un groupe sain et un groupe ayant subi une rhabdomyolyse ou un choc hémorragique. C'est pourquoi, dans un souci de réduction du nombre d'animaux, nous arrêterons l'expérience dès l'inclusion de 8 rats par groupe. Cette mesure pourrait épargner l'utilisation de 124 rats. En ce qui concerne le raffinement, le confort et le respect du bien-être des animaux, un soin constant sera porté pour assurer l'analgésie par injection de Buprénorphine, et l'anesthésie par inhalation d'un gaz anesthésiant. Les animaux seront placés dans les conditions standards d'animalerie, soit par 4 dans une cage avant procédure : eau et nourriture *ad libitum*, température entre 20 et 22°C, cycle jour/nuit de 12h/12h.

19723 Une douleur qui dure plus de trois mois est définie comme chronique et en tant que telle représente un des problèmes de santé publique les plus importants dans les pays développés. Les douleurs chroniques affectent environ 20% de la population adulte, et sont pour la plupart résistantes aux traitements thérapeutiques actuels. En effet, plus des 2/3 des patients souffrant de douleurs chroniques sont mal contrôlés par les médicaments actuels. Cela est essentiellement dû à notre méconnaissance des mécanismes liés à la douleur chronique, ce qui empêche le développement de nouveaux traitements plus efficaces. De plus, il existe un lien étroit entre douleur chronique, et l'apparition de dépression chez de nombreux patients. Notre projet s'intéresse donc à la caractérisation des mécanismes responsables de la mise en place d'une douleur chronique et des changements au niveau émotionnel (anxiodépression).

Des modèles d'étude des différents types de douleurs chroniques existent déjà et seront utilisés dans ce projet. De façon plus précise, l'implication d'une nouvelle cible innovante dans la douleur, le récepteur FLT3, et son interaction avec le récepteur aux opioïdes DOR, seront étudiées dans ces modèles. Pour cela, différentes lignées de souris génétiquement modifiées seront utilisées. Le

comportement douloureux des animaux sera effectué en utilisant des tests classiques de sensibilité tactile, et un suivi de l'état émotionnel sera effectué en utilisant des tests classiques d'anxiodépression.

De plus, ce projet sera réalisé en répondant à la règle des 3Rs.

Remplacer : A ce jour, il n'y a pas de modèles non animaux permettant d'étudier les mécanismes du système nerveux impliqués dans la chronicisation douloureuse. La souris étant un mammifère dont la physiopathologie est proche de l'Homme, et permettant les techniques de transgénèse nécessaire à l'étude des mécanismes de douleur chronique, cette espèce sera utilisée dans le cadre du projet.

Réduire : Le nombre maximum estimé de souris sera de 6500 sur 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés ici a été déterminé sur la base de nos expériences passées et également sur un calcul de puissance nous permettant d'obtenir des effets significatifs sur les paramètres mesurés au cours de notre projet.

Raffiner: Un suivi journalier sera effectué avant et après mise en place des modèles de douleurs. De plus, une habituation de minimum une semaine est réalisée au cours de laquelle les animaux sont placés dans la pièce expérimentale pendant minimum 1h, puis exposés aux différents tests sans appliquer de stimuli douloureux. Cela permet aux animaux de s'habituer à l'environnement et à l'expérimentateur, ce qui limite l'impact du stress lié à la procédure expérimentale. Cette période d'habituation est fondamentale afin d'assurer une reproductibilité des tests, de limiter l'angoisse et stress des animaux assurant alors une meilleure homogénéité dans les différents lots expérimentaux. Ceci nous permet donc également de réduire le nombre d'animaux utilisés. Afin de limiter la douleur pendant les procédures expérimentales, tout acte opératoire sera réalisé sous anesthésie gazeuse. Par ailleurs, les animaux sont gardés en cage collective (10 souris/cage) dans une animalerie dans laquelle la température et l'hygrométrie sont contrôlées. Les locaux sont en légères sur-pression, les cages possèdent des couvercles filtrants, et les animaux bénéficient d'un enrichissement du milieu (copeaux, igloos en plastique, bâtonnets de cellulose).

19724 Nous étudions le syndrome cardio-rénal de type 3 (SCR-3), soit la survenue d'une atteinte cardiaque aiguë en conséquence d'une atteinte rénale aiguë (ARA) initiale. Nos récents travaux ont permis d'identifier le rôle important de la Galectine-3 (Gal-3) dans le SCR-3 dont la surexpression était associée à une augmentation de l'inflammation puis d'une fibrose myocardique, secondaire à une ARA. Ces conséquences étaient prévenues lorsque Gal-3 était génétiquement (Gal-3 $-/-$) ou pharmacologiquement inhibées. De plus dans ce contexte, nous avons observé une augmentation des marqueurs de l'activation endothéliale (mécanismes d'adhésion cellulaire permettant le recrutement de cellules immunitaires) : CD146 dont l'interaction avec Gal-3 est à l'origine d'une augmentation de la sécrétion cytokinique (molécule permettant le recrutement de cellules immunitaires spécifiques) d'après la littérature scientifique. Notre hypothèse repose sur l'interaction entre CD146 et Gal-3 au cours du SCR-3 que nous souhaitons explorer afin d'évaluer son rôle et les conséquences de son inhibition.

Pour ce faire nous utiliserons un modèle de souris CD146 $-/-$ auquel nous ferons subir une néphrectomie rénale droite puis un clampage de l'artère rénale gauche de 25 minutes sous anesthésie générale afin de créer une insuffisance rénale aiguë transitoire chez la souris (dommages rénaux initiaux précoces, mais récupération de la fonction rénale sous 72 heures). Les souris recevront selon les groupes un traitement inhibiteur de Gal-3 afin d'étudier la synergie d'inhibition de Gal-3 et de CD146 dans l'objectif de prévenir la fibrose rénale et cardiaque dans notre modèle. A noter que ce modèle n'est pas délétère sur le phénotype des souris et n'est pas associé à une mortalité plus importante hors expérimentation et chirurgie. En revanche le modèle chirurgical implique une mortalité indépendante du fond génétique estimée à 3%. Nous étudierons la fonction cardiaque par échocardiographie, et la fonction rénale par la mesure de la créatinine plasmatique et urinaire. Les conséquences physiopathologiques seront évaluées par histologie, par étude de l'expression protéique et génétique des marqueurs de dommages tissulaires et d'inflammation.

Ces phénomènes ne sont observables que in-vivo, car ils impliquent des mécanismes moléculaires, cellulaires, et physiologiques complexes dynamiques non reproductibles in-vitro. Nous choisissons le nombre minimal de souris afin d'obtenir une différence au moins similaire à nos travaux précédents : $n = 10$ souris par groupes permettant d'observer une différence (s'il y a) d'environ 20% soit un nombre total de 240 animaux. Nous optimiserons l'utilisation d'examen non invasif ne nécessitant pas la mise à mort des animaux mais une sédation légère à différents temps avec l'utilisation de mesures échographiques itératives pour la fonction cardiaque et l'étude des urines pour la fonction rénale. La mise à mort des animaux ne sera que pour l'étude du critère de jugement principal de notre travail soit la fibrose rénale et myocardique étudiée à des temps prédéfinis par nos précédents travaux : 24h, 48h, 72h, et 28j. Enfin les moyens utilisés en vue de réduire la douleur et l'angoisse pendant les procédures expérimentales ainsi que l'impact environnemental seront : Injection de buprénorphine (50µg/kg en sous cutané (SC)) en prémédication, 30 min avant le début de la chirurgie, puis réalisation de la procédure sous anesthésie par injection en intrapéritonéale de Kétamine/Xylazine (Kétamine : 100mg/kg et Xylazine : 5mg/kg, en IP) juste avant le début de l'opération. Les souris seront observées et surveillées en vue de ne pas dépasser les points limites et de prévenir la souffrance des souris. Les points limites ne doivent pas être dépassés, auquel cas un traitement antalgique est proposé, et si ce dernier est insuffisant, la souris est mise à mort.

19725 Dans le cadre de la recherche de nouvelles pistes thérapeutiques, l'analyse du rôle joué par chaque gène dans l'organisme est l'une des pistes souvent explorées.

Parmi les différents moyens pour effectuer ce type d'analyse, l'utilisation de modèles animaux constitue souvent l'étape finale permettant d'étudier des mécanismes complexes (métabolisme, immunité, comportement) qui ne peuvent pour l'instant être modélisés in vitro ou in silico.

Pour générer ces modèles animaux, de nombreuses technologies existent visant à modifier le gène dans une partie du génome et dans son ensemble. De plus, il est possible de n'exprimer la modification génétique que lorsque certaines molécules sont injectées. Ainsi, le gène s'exprime normalement pendant le développement de l'animal, mais peut être muté sous contrôle d'un traitement à l'âge adulte.

Ce type de mutation conditionnelle nécessite des étapes de validation moléculaire qui sont indispensables avant de réaliser des protocoles d'analyses plus complets.

Le but de ce projet est justement de réaliser cette étape de validation sur l'ensemble des modèles animaux génétiquement modifiés que nous obtenons.

Pour cela, nous injecterons une molécule, le tamoxifène, qui déclenche l'expression de la mutation génétique qui a été mise en place. Les animaux seront ensuite étudiés au niveau des tissus pour valider que les modifications génétiques ont lieu tel qu'attendu.

REMPLACEMENT : Ce projet visant à valider un modèle génétiquement modifié qui sera employé dans des études liées à des mécanismes physiologiques complexes, l'utilisation d'un mammifère est indispensable car aucune méthode in vitro ou par modélisation informatique ne peut actuellement se substituer à l'étude du gène cible dans son environnement et ses interactions au sein de l'organisme.

REDUCTION : Pour réaliser ce type d'analyse, un faible nombre d'animaux requis par groupe. Ainsi, nous utiliserons 5 animaux par condition. Afin de disposer des contrôles adéquats, nous pourrions utiliser jusqu'à 6 groupes expérimentaux selon la mutation utilisée. Ainsi pour une mutation étudiée, nous pourrions employer 30 animaux par lignée analysée. Cet effectif constitue un minimum pour obtenir des résultats qui soient analysables et pouvant permettre de conclure sur la bonne réalisation de l'étude. Ce projet pourra s'appliquer à 10 lignées différentes par an, pour un nombre total d'animaux de 300 souris par an ou 1500 souris sur 5 ans de durée du protocole

RAFFINEMENT : Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi journalier de la boisson, la nourriture et de l'état des animaux, ainsi qu'une pesée hebdomadaire. Les injections seront réalisées par voie intra-péritonéale et le site d'injection sera nettoyé et désinfecté si besoin.

Des points limites adaptés et des critères d'arrêts sont prévus.

19726 Objectifs

Ce projet a pour objectif d'évaluer chez l'espèce de destination (chat ou chien) la tolérance de produits pharmaceutiques vétérinaires en développement, destinés aux traitements préventifs ou curatifs de diverses pathologies chez ces deux espèces. Il concerne les futurs médicaments vétérinaires présentant un bénéfice pour la santé et le bien-être des chiens et des chats comme par exemple dans le cadre de la lutte contre les infections parasitaires ou bactériennes, les pathologies inflammatoires, la douleur, le diabète, l'insuffisance cardiaque ou rénale, certains cancers, ou encore les maladies dermatologiques, respiratoires, nerveuses ou oculaires.

Lors du développement, il convient d'évaluer l'innocuité des substances actives et la tolérance locale et systémique du produit formulé chez l'animal de destination (effets éventuels d'un surdosage, administration accidentelle, ainsi que la mise en évidence d'altérations physiologiques et/ou pathologiques à la suite de l'administration répétée) afin de caractériser les signes d'intolérance et d'établir une marge de sécurité adéquate en utilisant la voie d'administration préconisée. Cette évaluation se fait notamment en augmentant la dose administrée et/ou la durée du traitement.

Ces informations sont nécessaires dans le cadre d'une demande d'autorisation de mise sur le marché du futur médicament vétérinaire et définissent les éventuels effets indésirables pour l'animal et les précautions à prendre lors de son futur emploi, par exemple au moment de l'administration ou à la suite de l'administration du médicament par l'utilisateur (exposition humaine au produit).

Avantages/dommages

Les dommages induits par les procédures peuvent être de l'inconfort, du stress, une gêne liée aux administrations de produits et aux interventions répétées (exemple : prélèvements sanguins) et éventuellement des signes cliniques de nature légère à modérée.

Les dommages potentiellement observés sur un nombre restreint d'animaux lors de ces études sont justifiés au regard des futurs bénéfices chez un grand nombre d'animaux de compagnie (efficacité des nouvelles thérapeutiques) et éventuellement chez l'homme en cas de zoonose.

Informations sur les espèces utilisées

Les études de ce projet sont réalisées sur les espèces de destination du médicament (chien ou chat) au plus proche des conditions d'utilisation du futur produit vétérinaire. Un total d'environ 330 chats et 590 chiens est prévu pour la durée du projet (5 ans).

Mise en œuvre des 3R's

Remplacement : Il est nécessaire d'avoir recours à l'espèce de destination pour discriminer et caractériser de façon certaine les produits candidats. Ainsi, seules les études in vivo permettent d'évaluer la tolérance des futurs médicaments.

Réduction : Dans la perspective des 3Rs, les effectifs sont évalués au plus juste et déterminés (bibliographie, lignes directrices, historique, définition des objectifs...) de façon à limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés pour ces études préliminaires, tout en garantissant une approche rigoureuse et ceci afin d'éviter les études non conclusives. Pour les études réglementaires, le nombre minimum d'animaux requis est déterminé par les textes.

Raffinement : Pour chaque étude, une période d'acclimatation systématique des animaux est prévue dans le but de limiter leur stress. Des points limites et un suivi adapté, effectué par un personnel compétent, sont mis en place afin de prendre en charge les animaux le plus rapidement et efficacement possible en cas de signes cliniques d'intolérances. Les conditions d'hébergement sont adaptées à l'espèce et à l'âge des animaux pour garantir leur confort et leur bien-être. Les animaux ont accès à des dispositifs d'enrichissement afin de stimuler l'exercice physique et leur activité cognitive. Le renforcement positif et l'habituation des animaux aux procédures d'administrations et/ou de prélèvements seront effectués en amont. Une anesthésie et/ou analgésie peuvent être mis en place si nécessaire.

La Structure en charge du Bien-Etre Animal (SBEA) garantit l'amélioration des techniques de soins et des conditions de vie pour le bien-être des animaux.

19727 Afin de respecter au mieux la réglementation concernant l'usage des médicaments en recherche et de raffiner nos pratiques, nous cherchons à valider des protocoles anesthésiques et d'euthanasie avec des médicaments disponibles sur le marché vétérinaire.

Ainsi, nous souhaitons valider ici l'efficacité de 2 médicaments concernant des anesthésies légères utilisées afin de réaliser des biopsies de nageoire caudale chez le poisson zèbre, procédure indispensable pour valider les mutations génétiques dans le cadre des études menées à notre institut. Ici nous cherchons juste à nous assurer que l'anesthésie sera efficace (immobilité de l'animal notamment) sans réaliser la biopsie.

L'usage de ces 2 médicaments, en overdose, sera également validé pour la mise à mort des poissons en fin d'étude.

Remplacement :

S'agissant de raffiner des pratiques pour d'autres projets utilisant le poisson zèbre, nous ne pouvons pas remplacer cette étude par des méthodes alternatives.

Réduction :

Au cours de ce projet, nous planifions d'utiliser un maximum de 360 poissons. Ils seront répartis en plusieurs groupes selon le médicament à tester et son dosage. Les groupes seront constitués de 10 poissons afin d'avoir des résultats statistiquement interprétables. Ceci étant, nous commenceront toujours par les dosages les plus bas afin de valider les doses minimales efficaces. Ainsi, les groupes aux doses élevées pourraient ne pas être utilisés, ce qui réduirait l'effectif total utilisé.

Raffinement :

Le projet lui-même sert un objectif de raffinement. Les procédures ayant pour objectif une perte de connaissance des animaux, on ne s'attend pas à observer des signes de souffrances. Des points limites éthiques seront tout de même définis pour la récupération post-anesthésique. Enfin, en dehors de procédures expérimentales, les animaux feront l'objet du suivi quotidien habituel et des groupes sociaux seront maintenus afin de respecter le bien-être des poissons.

19728 L'inflammation chronique, caractérisée par sa persistance dans le temps, joue un rôle important dans l'initiation et le développement des cancers. La protéine d'intérêt de ce projet, PRKDC, a été très récemment décrite comme pouvant être responsable d'inflammation chronique. Cependant il existe peu d'informations à ce jour concernant le rôle joué par l'inflammation associée à PRKDC dans l'apparition et la croissance tumorale. Ce projet propose d'étudier le rôle de la protéine PRKDC dans l'inflammation chronique associée au cancer et dans la réponse à un traitement anti-cancéreux : la chimiothérapie.

Nous utiliserons en particulier des cellules issues de tumeurs humaines où le rôle de PRKDC dans l'inflammation a déjà été évalué.

Dans ce projet 576 animaux au total seront nécessaires. 4 approches complémentaires (procédures) seront utilisées pour évaluer :

1. Rôle de PRKDC dans l'inflammation chronique associée à la tumeur : cellules cancéreuses injectées en sous-cutané
2. Rôle de PRKDC dans l'inflammation chronique associée à la tumeur : implantation de tumeurs en sous cutané
3. Inhibition de PRKDC et impact sur la progression tumorale
4. Impact de l'inflammation associée à PRKDC sur la chimiothérapie.

Ces procédures permettront de déterminer si l'inflammation dépendante de PRKDC impacte la croissance tumorale.

Cela nous permettra également de tester l'effet de l'activation ou l'inhibition de cette voie sur l'efficacité d'une chimiothérapie classique.

Ce projet permettra d'étudier l'effet du déclenchement de l'inflammation dans des cellules humaines sur le développement tumoral et la réponse à la chimiothérapie.

Il n'existe pas de méthode alternative à ces expériences in vivo. Durant ce projet nous suivrons le principe des 3R qui consiste à remplacer, réduire et raffiner. Une étude statistique

préalable et un nombre adapté de souris par groupe expérimental nous permettent de réduire le nombre d'animaux utilisé. Et enfin un suivi hebdomadaire des animaux, une prise en compte des points limites (volume tumoral et poids des animaux), une évaluation de la douleur (grille d'évaluation de la douleur) lors des expériences (anesthésie, analgésie, établissement de points limites spécifiques) et des besoins biologiques et sociaux des animaux nous permettent de raffiner notre projet.

19729 La radiothérapie est un outil thérapeutique incontournable de la lutte contre le cancer. Son efficacité est néanmoins limitée par les dommages qu'elle provoque sur les tissus sains situés dans le champ d'irradiation. L'irradiation d'organes sensibles (e. g. poumon, intestin) ne pourra alors pas dépasser une certaine dose sans risquer de voir apparaître de graves complications comme la fibrose pulmonaire. Or, grâce à l'expérimentation animale, le laboratoire a récemment développé une nouvelle technique d'irradiation qui permet de réduire les effets secondaires (e. g. fibrose pulmonaire, fibrose radique) sans affecter l'efficacité anti-tumorale.

La compréhension des mécanismes physiopathologiques des effets secondaires de la radiothérapie, et en particulier une meilleure connaissance des effets protecteurs sur le tissu sain de la nouvelle méthode de radiothérapie développée dans l'équipe, sont requis pour améliorer les traitements des patients par radiothérapie. Nous espérons que les résultats faciliteront la mise en place d'essais cliniques pour diminuer la toxicité de la radiothérapie et, à terme, permettront de proposer aux patients des traitements anticancéreux plus efficaces et mieux tolérés.

Dans le cadre de ce projet, nous sommes contraints d'avoir recours à l'utilisation de souris afin de pouvoir étudier les conséquences des différentes modalités d'irradiation sur le tissu sain. Les caractéristiques génétiques de la souris, les différentes lignées génétiquement modifiées disponibles ainsi que la facilité d'élevage en font le modèle de choix pour notre étude. Les souris recevront une irradiation thoracique ou abdominale (+/- présence de tumeurs) afin d'étudier d'une part la survenue de complications induits par la radiothérapie et d'autre part l'efficacité anti-tumorale des différents traitements. Les complications se manifestent sous la forme de pneumonie pouvant aller jusqu'à la fibrose dans le cas d'une irradiation thoracique et, sous la forme d'un syndrome gastro-intestinale après une radiothérapie abdominale.

Remplacement : Pour l'instant, les études préliminaires réalisées in vitro ne permettent pas de modéliser le rôle de l'état d'oxygénation dans la tumeur ni celui de la réponse immune. Cependant, nous développons en parallèle des modèles in vitro visant à remplacer les études in vivo à chaque fois que cela sera possible. De plus, compte tenu de la nouveauté de cette méthode d'irradiation, aucune donnée clinique sur des patients irradiés avec cette nouvelle méthode n'est actuellement disponible.

Réduction : Pour l'ensemble de ce projet, nous prévoyons d'utiliser 2380 souris, nombre d'animaux requis pour pouvoir explorer les effets de différents protocoles de radiothérapie sur le poumon et l'intestin de souris. Les souris seront placées dans des cages enrichies leur assurant des conditions d'élevage et de bien-être optimum.

Raffinement : Lors des procédures d'irradiation, les souris seront anesthésiées puis suivies toutes les semaines afin de surveiller leur état général et leur tolérance à l'irradiation. Dans le cas d'une altération de l'état général (perte de poids, prostration, plaies), la souris sera isolée, soignée si possible et euthanasiée si l'un des points limites est atteint. Une grille de score sera mise en place pour un meilleur suivi des animaux.

19730 La radiothérapie est un outil thérapeutique incontournable de la lutte contre le cancer. Son efficacité est néanmoins limitée par les dommages qu'elle provoque sur les tissus sains situés dans le champ d'irradiation. L'irradiation d'organes sensibles (e. g. poumon, intestin) ne pourra alors pas dépasser une certaine dose sans risquer de voir apparaître de graves complications comme la fibrose pulmonaire. Or, grâce à l'expérimentation animale, le laboratoire a récemment développé une nouvelle technique d'irradiation qui permet de réduire les effets secondaires (e. g. fibrose pulmonaire, fibrose radique) sans affecter l'efficacité anti-tumorale.

La compréhension des mécanismes physiopathologiques des effets secondaires de la radiothérapie, et en particulier une meilleure connaissance des effets protecteurs sur le tissu sain de la nouvelle méthode de radiothérapie développée dans l'équipe, sont requis pour améliorer les traitements des patients par radiothérapie. Nous espérons que les résultats faciliteront la mise en place d'essais cliniques pour diminuer la toxicité de la radiothérapie et, à terme, permettront de proposer aux patients des traitements anticancéreux plus efficaces et mieux tolérés.

Dans le cadre de ce projet, nous sommes contraints d'avoir recours à l'utilisation de souris afin de pouvoir étudier les conséquences des différentes modalités d'irradiation sur le tissu sain. Les caractéristiques génétiques de la souris, les différentes lignées génétiquement modifiées disponibles ainsi que la facilité d'élevage en font le modèle de choix pour notre étude. Les souris recevront une irradiation thoracique ou abdominale (+/- présence de tumeurs) afin d'étudier d'une part la survenue de complications induits par la radiothérapie et d'autre part l'efficacité anti-tumorale des différents traitements. Les complications se manifestent sous la forme de pneumonie pouvant aller jusqu'à la fibrose dans le cas d'une irradiation thoracique et, sous la forme d'un syndrome gastro-intestinale après une radiothérapie abdominale.

Remplacement : Pour l'instant, les études préliminaires réalisées in vitro ne permettent pas de modéliser le rôle de l'état d'oxygénation dans la tumeur ni celui de la réponse immune. Cependant, nous développons en parallèle des modèles in vitro visant à remplacer les études in vivo à chaque fois que cela sera possible. De plus, compte tenu de la nouveauté de cette méthode d'irradiation, aucune donnée clinique sur des patients irradiés avec cette nouvelle méthode n'est actuellement disponible.

Réduction : Pour l'ensemble de ce projet, nous prévoyons d'utiliser 2380 souris, nombre d'animaux requis pour pouvoir explorer les effets de différents protocoles de radiothérapie sur le poumon et l'intestin de souris. Les souris seront placées dans des cages enrichies leur assurant des conditions d'élevage et de bien-être optimum.

Raffinement : Lors des procédures d'irradiation, les souris seront anesthésiées puis suivies toutes les semaines afin de surveiller leur état général et leur tolérance à l'irradiation. Dans le cas d'une altération de l'état général (perte de poids, prostration, plaies), la souris sera isolée, soignée si possible et euthanasiée si l'un des points limites est atteint. Une grille de score sera mise en place pour un meilleur suivi des animaux.

19731 Ce projet de recherche vise à identifier les circuits neuronaux participant au développement de troubles cérébraux, en mettant l'accent sur les états émotionnels positifs et négatifs.

Le récepteur GPR151 est un récepteur orphelin pour lequel il n'existe à ce jour toujours pas de ligand endogène connu. Ce récepteur est exprimé majoritairement dans l'habénula médiale, une toute petite structure située au centre du cerveau.

Les fonctions du récepteur GPR151 sont encore à ce jour mal connues mais sa localisation presque exclusive dans l'habénula suggère un rôle de ce récepteur dans des comportements clés associés à l'addiction aux drogues d'abus, la dépression, les troubles anxieux ou encore la balance entre états émotionnels positifs et négatifs.

L'objectif de ce projet vise donc à mieux comprendre I) les fonctions des neurones exprimant les récepteurs GPR151 (neurones GPR151+) pour ensuite en moduler l'activité, II) le rôle des récepteurs GPR151 dans des comportements anxio-dépressifs à un état dit basal et pour finir III) le rôle de ces récepteurs dans ces mêmes comportements mais dans un état représentant un phénotype dépressif qui a été modélisé à l'aide d'un stress chronique (social et non social).

Un nombre maximum de 1010 souris sera utilisé pour l'ensemble du projet.

Il sera conduit en respectant la règle des 3R (remplacer –réduire –raffiner) visant à remplacer ou réduire chaque fois que possible le nombre d'animaux, ainsi qu'à optimiser les procédures pour minimiser au maximum l'inconfort des animaux tout en permettant néanmoins d'étudier l'impact de la stimulation/inhibition des neurones GPR151+ ainsi que la délétion des récepteurs GPR151 sur l'expression de comportements anxio-dépressifs.

"Remplacement" : les effets comportementaux suite à la stimulation ou l'inhibition des neurones GPR151+ ou la délétion des récepteurs ne peuvent pas être étudiés en utilisant des modèles cellulaires, qui par nature ne récapitulent pas la complexité de l'organisation cérébrale en réseaux neuronaux complexes. L'étude de ces effets nécessite donc l'analyse d'organismes vivants et entiers. De plus nous utiliserons des souris génétiquement modifiées (GPR151-Cre+ et GPR151KO) permettant de cibler spécifiquement les neurones et les récepteurs d'intérêt dans le cadre de ce projet, ces modèles n'existent que chez la souris.

"Réduction" : les animaux utilisés étant consanguins, la variabilité phénotypique est limitée, ce qui permet de réduire le nombre d'animaux tout en mettant potentiellement en évidence un effet statistiquement significatif. De plus, ces études se feront de manière longitudinale, afin de tester plusieurs paramètres (Interaction sociale, anxiété, dépression en aigu) chez le même animal afin de réduire au maximum le nombre de souris utilisées. Le développement de la sensibilisation psychomotrice induite par la morphine sera étudié de manière indépendante chez deux autres cohortes de souris.

- Ainsi, au regard des données de la littérature et de la variabilité interindividuelle attendue, les groupes expérimentaux seront constitués de 15 souris chacun.

- Les procédures de stress chronique sont connues pour induire de la variabilité au sein des groupes (phénotype susceptible/résistant). Un minimum de 20 souris/groupe devra être considéré (15/groupe pour la procédure contrôle en parallèle).

"Raffinement":

Les conditions d'hébergement sont optimisées en fonction des comportements naturels des rongeurs : les souris sont hébergées en groupe sociaux de 3 à 5 animaux par cage, et chaque cage est enrichie avec un barreau à ronger et des papiers absorbants pour faire un nid. Enfin, les procédures invasives seront réalisées sous anesthésie (anesthésique profond et un anesthésique local autour du site de chirurgie) et les animaux recevront un traitement antidouleur (traitement par un anti-inflammatoire). La température corporelle de l'animal sera maintenue grâce à un tapis chauffant thermostaté jusqu'au complet réveil de l'animal. Les animaux seront ensuite suivis et la souffrance sera évaluée.

Aussi, nous avons choisi d'utiliser des protocoles expérimentaux qui permettent le développement d'un phénotype dépressif chez la souris via l'utilisation de différents protocoles de stress. Ces protocoles sont utilisés de manière répétée en recherche préclinique sur la dépression et il existe des critères stricts à respecter pour minimiser au maximum l'inconfort des animaux.

En plus des points limites spécifiques à chaque procédure, nous utiliserons une grille d'évaluation jusqu'à la mise à mort des animaux. Ces signes seront adaptés en fonction de l'apparition des symptômes pro-dépressifs pouvant générer des comportements moins ou plus actifs chez la souris.

19732 Le projet porte sur les leucémies (cancer des cellules de la moelle osseuse et du sang) présentant la mutation d'un gène retrouvée très fréquemment dans les cellules leucémiques. Des études récentes ont montré qu'elle pouvait conférer une sensibilité à différents agents thérapeutiques. Nous nous attacherons à comprendre comment ces traitements agissent sur ces leucémies en particulier et quels sont leurs effets sur la protéine mutante. Les études préalablement menées in vitro nous ont fourni des résultats prometteurs pour mieux comprendre ces mécanismes. La poursuite d'études in vivo afin de mieux comprendre les voies d'actions de ces médicaments, d'optimiser leur posologie et de tester leur combinaison demeurent indispensables pour tenter d'améliorer les conditions thérapeutiques, tout en se rapprochant des situations retrouvées chez les patients. Les animaux utilisés seront des souris qui, après irradiation sublétales par rayons X dans

un autre établissement utilisateur, pour faciliter et homogénéiser la prise de greffe entre individus, seront greffées par injection intraveineuse de cellules leucémiques afin de reproduire la leucémie humaine. Certains groupes d'animaux seront alors nourris avec des granulés contenant un antibiotique, de façon à éteindre l'expression d'une protéine particulière dans les cellules leucémiques spécifiquement. De cette façon, nous pourrions étudier le rôle de cette protéine dans la réponse aux traitements donnés.

Les souris seront ensuite traitées ou non par différents agents thérapeutiques administrés quotidiennement sur toute la durée de la procédure soit par voie orale, soit par injections intraveineuses ou intra-péritonéales sur animaux vigiles. Les injections seront réalisées sans anesthésie. Les agents thérapeutiques administrés ont déjà fait l'objet d'études antérieures démontrant l'absence de douleurs associées aux doses utilisées. Ils sont tous déjà utilisés chez les patients en clinique.

Ce projet et la constitution des groupes d'animaux seront réalisés en accord avec la règle des 3R :

Remplacement: nous avons au préalable testé nos molécules d'intérêts ex vivo sur un maximum de modèles cellulaires cultivables en laboratoire (cellules isolées à partir de patients, cellules souches embryonnaires);

Réduction: les groupes d'animaux seront réduits au minimum après estimation des effectifs, basée sur les données antérieures du laboratoire, et une simulation statistique afin de garantir l'obtention de résultats statistiquement recevables. Nous utiliserons au maximum 1518 souris sur les 5 ans que durera le projet.

Raffinement: les animaux seront hébergés en groupes pour respecter leur comportement grégaire. Nous aurons recours à l'anesthésie pour toute intervention le nécessitant. Une grille d'évaluation de leur comportement sera tenue et différents critères seront scorés de façon à définir des points limites de douleur/souffrance suffisamment précoces pour déclencher le recours à l'euthanasie si ces points limites étaient atteints et qu'aucun traitement n'interférant pas avec l'expérimentation menée ne pouvait y remédier.

Les procédures n'excéderont pas 5 mois dans la grande majorité des cas et pourront aller jusqu'à 2 ans lors des quelques expériences de survie après traitement. Les souris seront systématiquement euthanasiées en fin de procédure.

19733 L'hibernation est une adaptation physiologique et comportementale qui permet la survie de l'espèce pendant les périodes saisonnières défavorables (température extérieure basse et pénurie des ressources alimentaires). Tout au long de l'hibernation, afin d'économiser de l'énergie, l'animal va alterner entre des phases d'hypothermie corporelle profonde, appelées torpeurs (faible besoin énergétique) et des phases de réveil avec un retour à la normothermie (régulation de la température corporelle autour de 37°C très consommatrice d'énergie). Des travaux suggèrent que cette adaptation physiologique de l'animal dépend de la production saisonnière de mélatonine qui, via une hormone, thyrostimuline (TSH), régulerait l'activité enzymatique des tanocytes, cellules tapissant la paroi du 3ème ventricule du cerveau. Les tanocytes sont connus pour réguler la physiologie saisonnière en modifiant le statut thyroïdien local de l'hypothalamus. L'objectif de ce projet est de déterminer si la régulation saisonnière de l'hibernation implique une modification des concentrations locales d'hormones thyroïdiennes dans l'hypothalamus. Cette étude sera réalisée chez un modèle de rongeur hibernant, le hamster syrien.

Des hamsters syriens mâles seront élevés en conditions expérimentales mimant l'été (jour longue et température ambiante à 22°C, que l'on nommera PL22) puis seront transférés en conditions d'hiver (jour courte et température ambiante de 8°C, que l'on nommera PC8) avec un système de mini-pompe délivrant en continu de la TSH, de la T3 ou une solution saline (contrôle). Les hamsters seront équipés de dispositifs permettant de suivre leur température corporelle tout au long de l'expérience et ainsi d'identifier si l'infusion de TSH et/ou de T3 altère l'occurrence des phases de torpeur et de réveil durant l'hibernation. Des prélèvements seront réalisés post-mortem à la fin de l'expérience (après 2 mois en PC8).

Pour réaliser ce projet, nous avons besoin de 108 hamsters syriens mâles distribués en 12 groupes de 9 animaux pour une durée maximale du projet de 5 ans et 15 animaux pour la mise au point des gestes chirurgicaux.

Remplacement : L'expérience doit être réalisée sur l'animal entier. Aucun moyen de substitution ne permet de modéliser les différentes étapes de l'hibernation et les processus liés à chaque étape (intégrant des modifications métaboliques périphériques et des modifications de structures cérébrales, notamment l'hypothalamus). Six hamsters supplémentaires seront utilisés

Réduction : Sur la base des connaissances acquises sur le modèle animal et sur les techniques utilisées, le nombre d'animaux nécessaire à l'étude a été établi au minimum requis ($n = 9/\text{groupe}$) pour obtenir des résultats statistiquement significatifs en utilisant des tests statistiques paramétriques et/ou non paramétriques.

Raffinement : le hamster syrien est un animal agressif en PC8, les animaux seront placés en cages individuelles, mais en restant en contact olfactif et visuel avec leurs congénères. La cage est enrichie avec un bâtonnet de bois à ronger et de la frisure (meilleur matériel de nidation à 8°C). Le maximum sera fait pour réduire la douleur et le stress des animaux tout au long de l'expérience. Les procédures invasives envisagées seront réalisées sous anesthésie générale, analgésie et anti-inflammatoire, pendant laquelle la température corporelle est maintenue grâce à un tapis chauffant. Les animaux seront suivis pendant la semaine suivant la chirurgie. Afin de limiter la souffrance induite à l'animal, des points limites ont été définis permettant à tout moment d'exclure l'animal de l'étude.

De manière générale, ce projet apportera un approfondissement des connaissances sur la régulation de l'hibernation : une des fonctions physiologiques saisonnières indispensables à la survie de espèces en hibernation.

19734 Le but de cette étude est d'évaluer les conséquences d'une mutation au niveau du gène de la Dynamine 2, responsable chez l'homme de la maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT). La CMT est une maladie rare d'origine génétique qui affecte les nerfs périphériques et qui touche 30000 à 50000 personnes en France.

Par cette étude nous envisageons d'évaluer les conséquences fonctionnelles de cette mutation sur la maladie, dans des nouveaux modèles de souris myopathes dont les mutations génétiques reproduisent fidèlement les symptômes musculaires de patients atteints de myopathies centronucléaires. Dans un premier temps, une série de tests comportementaux seront réalisés, afin d'évaluer différents paramètres tels que : la force musculaire, la position des pattes pendant le déplacement, la sensibilité à un stimulus mécanique et une électromyographie. Dans un deuxième temps, une analyse biomoléculaire et histologique sera réalisée dans le but de mieux caractériser la pathologie afin d'apporter une thérapie mieux adaptée.

Seul le modèle animal permet d'étudier d'une part la physiopathologie et d'autre part l'efficacité d'une thérapie (REMPACEMENT).

Des études cellulaires sont prévues afin de réduire au maximum le nombre d'animaux. Plusieurs procédures expérimentales, max. une PE/jour, seront réalisées chez les mêmes souris et les deux pattes (muscles) seront analysés, de plus, le nombre d'animaux sera réduit au maximum pour obtenir une puissance statistique suffisante. Ainsi nous pouvons avancer que 10 souris au maximum par groupe seront nécessaires pour conclure sur le projet (REDUCTION). Pour cette étude, 50 souris seront nécessaires dont 40 souris pour les expériences et 10 souris pour la reproduction.

Cette maladie peut entraîner des difficultés pour se déplacer, de la nourriture sera placée dans la cage. Afin de s'assurer que les animaux ne souffrent pas, un contrôle quotidien sera effectué. Tout signe de douleur sera pris en charge en prenant les mesures appropriées en fonction du niveau de douleur observé. Pour le nouveau-né, l'évaluation de la douleur sera évaluée visuellement: capacité à se retourner, couleur de la peau, capacité à se mouvoir. A partir du sevrage, une perte de poids de 20% en une semaine conduira à la mise à mort. Le suivi du poids se fera 3 fois par semaine soit

un analgésique sera administré, soit les animaux seront euthanasiés prématurément si nécessaire (RAFFINEMENT).

19735 En 2014 l'OMS déclare que la pollution atmosphérique représente un risque environnemental important pour la santé. L'air pollué est formé par la coexistence d'éléments chimiques divers interagissant entre eux pour former des éléments polluants dit secondaires qu'il est impossible, avec les techniques déjà connues, d'étudier. Il a été mis en place récemment une chambre de simulation atmosphérique unique permettant de soumettre des animaux à des atmosphères polluées complexes incluant les réactions secondaires non incluses dans les méthodes standards d'étude de la pollution. Dans notre étude, nous nous intéressons particulièrement aux effets de la pollution atmosphérique sur la régénération alvéolaire et l'impact sur le microenvironnement dans un modèle murin notamment via le modèle de pneumonectomie. Le modèle de pneumonectomie chez la souris est un modèle qui permet d'évaluer les capacités du poumon à croître et à produire rapidement de nouvelles alvéoles.

La chambre de simulation atmosphérique permet de travailler sur 3 atmosphères représentatives de la pollution atmosphérique dans une zone urbaine européenne moyennement polluée (Paris), une zone très polluée (Pékin) et enfin une zone européenne du futur (Méditerranée). Nous utiliserons comme modèle animal la souris, en raison de la ressemblance physiologique et de la réponse aux lésions du poumon murin et humain. Ce modèle étant le plus couramment utilisé dans ce type d'études. Des souris jeunes (10 jours) ou adulte (2 mois) seront exposées aux différentes atmosphères durant 7 jours continus grâce au couplage de la chambre de simulation atmosphérique avec une armoire de stabulation permettant l'hébergement des souris dans leur cage ventilée, sans modification de leur environnement proche. Une partie de l'armoire a été isolée de façon à y faire entrer de l'air non pollué (filtré à l'entrée) pour les souris contrôles.

Tout au long de ces études, nous respecterons la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner).

Nous limiterons ainsi le projet aux seules expériences indispensables, tout en tenant compte des contraintes liées à l'utilisation de l'enceinte d'exposition, Le projet prévoit le recours à un nombre d'animaux aussi limité que possible : 400 souris. Toutes les souris seront suivies afin d'évaluer leur comportement et par conséquent leur bien-être. Un suivi clinique des animaux sera réalisé tout au long des expériences, avec mise en place de points limites précis (perte d'activité, difficultés locomotrices, difficultés à respirer. . .) qui permettront d'éviter toute souffrance. Pour enrichir le milieu, les cages auront de la sciure de bois, du coton, et des bouts de bois. La méthodologie utilisée a été raffinée au mieux pour permettre d'étudier sur de nombreux critères la régénération pulmonaire. A la fin de la procédure, les poumons des souris exposées ou non sont prélevés, étudiés et utilisés pour des cultures de cellules.

Remplacer les modèles animaux n'est pas possible ici car nous cherchons à expliquer le phénomène complexe de régénération pulmonaire où interagissent plusieurs types cellulaires.

19736 L'échographie est une méthode d'imagerie non invasive, non ionisante, qui permet l'étude des tissus mous. Beaucoup des applications de l'échographie concernent l'exploration de la cavité abdominale, pour l'examen de l'aspect morphologique des organes, l'étude des flux sanguins et la détection de masses suspectes. Il existe des appareils spécifiques offrant une résolution qui permet d'avoir un niveau de détail anatomique suffisant pour transférer des méthodes d'examen, validées chez l'homme ou le gros animal, vers le petit animal.

Cette modalité d'imagerie est de plus en plus utilisée en recherche chez le petit animal pour réduire le nombre d'animaux suivis dans une étude (suivi de taille de tumeur par imagerie au lieu de sacrifice séquentiel des animaux) mais également pour obtenir plus d'informations sur le développement de la pathologie (mesures de paramètres de flux sanguin in vivo par exemple), le tout sans souffrance de l'animal, sous anesthésie générale.

Toutefois, il n'existe à notre connaissance aucune formation pratique à l'échographie abdominale du rongeur à destination des chercheurs, et il existe une forte demande pour une formation initiale. Le public utilisant ces appareils pour le petit animal est assez varié et va du chercheur en

méthodologie d'imagerie au technicien animalier, en passant par les médecins en thèse de science ou les chercheurs en biologie.

Nous organisons donc une formation à l'échographie abdominale du petit animal permettant d'aborder beaucoup de problématiques rencontrées en laboratoire : suivi de gestation, mesures anatomiques abdominales, mesures de dimensions de vaisseaux et flux associés. Nous aborderons enfin l'injection guidée dans l'embryon qui est une méthode très puissante pour intervenir dans le développement de l'embryon pour tenter par exemple de réintroduire des cellules souches pour rattraper une mutation létale.

Nous avons prévu de réutiliser au maximum les souris au cours de cette session de formation pour limiter le nombre d'animaux utilisés. Tous les animaux sont anesthésiés (et analgésiés si besoin) pour les expériences, et leur durée d'anesthésie est limitée à 60 minutes au maximum. Les points limites ont également été définis, entraînant la mise à mort anticipée si nécessaire. Concernant l'hébergement: l'eau et la nourriture sont fournies à volonté et le milieu est enrichi par des cotons compactés.

Nous prévoyons de faire 3 formations par an, sur 5 ans en utilisant au total 360 souris, 540 embryons de souris, 90 rats et 270 embryons de rats.

19737 Dans le cadre de la thérapie génique, nous cherchons à optimiser la vectorisation d'acides nucléiques d'acides nucléiques codant des gènes d'intérêt thérapeutique à l'aide de vecteurs synthétiques.

L'objectif est d'inventer et d'optimiser de nouvelles classes de vecteurs synthétiques pour la vectorisation intracellulaire d'acides nucléiques. En effet, la possibilité d'utiliser des acides nucléiques pour faire exprimer par l'individu une protéine d'intérêt vaccinale ou thérapeutique représente un espoir immense pour traiter ou prévenir des maladies héréditaires ou acquises. Une démonstration récente vient d'être apportée par les vaccins à ARN contre le COVID19. Le travail que nous réalisons depuis 25 ans sur les vecteurs synthétiques ont contribué à l'émergence de cette nouvelle approche dans laquelle l'antigène va être produit par le tissu musculaire. Des travaux récents que nous avons menés sur un de nos vecteurs synthétiques, publié dans Nature Biomedical Engineering, ont démontré la validité de notre approche qui consiste à comprendre les relations qui existent entre les propriétés physico chimiques des vecteurs que nous développons et leur efficacité à transfecter différents organes in vivo chez l'animal. Cette approche permet d'identifier une nouvelle classe de vecteur pour la vaccination à ARN et une pour la vaccination et thérapie à ADN. Tout ceci est rendu possible uniquement par l'évaluation chez l'animal de la réponse biologique comme par exemple les réponses humorales et cellulaire en réponse l'expression d'un antigène par transfert de gène. En effet, il n'est pas possible d'évaluer l'efficacité de la vaccination in vitro, de même aussi par exemple l'expression d'EPO et ses conséquences fonctionnelles sur le taux d'hématocrite. Les principaux résultats attendus sont de pouvoir cartographier et comprendre l'efficacité des vecteurs synthétiques administrés dans différents organes de manière à optimiser leur fonctionnement pour être utilisé dans des protocoles de vaccination ou de thérapie avec un changement de paradigme où l'individu lui-même faire produire son propre biomédicament. C'est dans ce contexte général que se situe notre activité de recherche en expérimentation animale.

Pour cela nous allons donc injecter nos vecteurs synthétiques par différentes voies d'administration, par injection, intramusculaire, intraveineuse, intradermique, sous-cutanée et pulmonaire. Le type d'injection dépend non pas de l'acides nucléiques (plasmid, mRNA) mais du vecteur synthétique et de l'application visée. Par exemple dans des protocoles de vaccination, les injections musculaires, intradermiques ou sous-cutanées vont être privilégiées. Les injections intraveineuses ou intrapulmonaires vont être d'avantages utilisées dans des protocoles de thérapie.

Pour analyser les résultats, les prélèvements des sites d'injections, les rates ainsi que les ganglions poplités seront nécessaires mais également les prélèvements sanguins.

Les animaux utilisés seront des souris de souches SWISS ou C57bl6 de 8 semaines. Le sexe sera choisi en fonction des études réalisées précédemment pour pouvoir comparer les résultats. Les animaux auront au minimum 7 jours d'acclimatation.

La règle des 3R sera approchée de cette manière :

- Nous remplacerons dans la mesure du possible l'expérience sur les animaux. Mais en ce qui concerne les expériences de vaccination, il n'existe pas de système immunitaire "dans un tube à essais", nous devons donc valider l'efficacité de la vaccination de nos vecteurs synthétiques in vivo.
- Nous réduirons le nombre d'animaux utilisés en effectuant un premier screening in vitro. Après cette première sélection, l'usage d'un modèle in vivo à ce niveau de notre recherche est néanmoins indispensable afin d'évaluer le comportement de nos vecteurs synthétiques lors d'une injection dans le sang ou différents tissus (musculaire, cutané, pulmonaire, hépatique). En effet, l'influence de l'environnement (organe, sang) in vivo tant par sa mécanique que par sa composition peut entraîner des modifications de comportement que l'on ne peut évaluer in vitro. Par ailleurs, l'évaluation des vecteurs sera effectuée dans la même souche de souris, au même âge et même sexe afin de pouvoir les comparer entre eux et de ne pas renouveler les contrôles déjà effectués.
- En ce qui concerne le raffinement, l'efficacité du transfert de gène in vivo, nous utilisons des vecteurs de transfert d'acides nucléiques qui ne fonctionnent pas in vitro sur des cellules en culture. Nous sommes donc obligés de réaliser des expériences sur animaux afin de valider l'efficacité de cette nouvelle classe de vecteur. Ainsi, au cours de chaque procédure expérimentale, les animaux seront pris en charge via des mesures visant à réduire la douleur. Une anesthésie (isoflurane) sera toujours réalisée, ainsi qu'une analgésie (tétracaïne) dans les cas nécessaires. Entre 1h et 3h après les injections ou les prélèvements, les animaux seront examinés afin de vérifier leur bien-être, puis une visite quotidienne aura ensuite lieu pour vérification de leur état de santé. Ce dernier sera vérifié en observant des paramètres qui seront détaillés dans les paragraphes liés aux procédures. Si un seul des signes est positif, l'animal est évalué pour les différents paramètres, une première fois à cet instant et une seconde fois 24h après. Ces observations permettent d'effectuer une estimation de la douleur générée et, le cas échéant, de mettre en place des moyens adaptés pour la soulager de façon appropriée, efficacement et sans interférence avec le protocole. Les animaux sont hébergés sur de la litière en cellulose et ils ont au minimum deux enrichissements, un tunnel rouge et un carré de cellulose. Une observation quotidienne est réalisée y compris le week end.

La mise en place de ce projet répondra à de nombreuses questions avant de pouvoir envisager l'usage de ces systèmes chez l'homme. Selon les données antérieures de l'équipe (nombres de vecteurs validés in vitro, conditions testées), on peut estimer à 500 le nombre de souris utilisées sur les 5 ans pour mener à bien les caractérisations. Ce projet est divisé en 5 procédures, selon les voies d'administrations ou d'injections.

- 1- Injection intramusculaire de vecteurs synthétiques.
- 2- Injection intraveineuse de vecteurs synthétiques.
- 3- Injection intradermique de vecteurs synthétiques.
- 4- Injection sous-cutanée de vecteurs synthétiques.
- 5- Injection intrapulmonaire de vecteurs synthétiques.

19738 L'hypercalcémie idiopathique infantile (IIH) de type 1 est une maladie rare induite par des mutations perte de fonction de la protéine responsable de la dégradation de la vitamine D. Les patients présentent des niveaux circulants de vitamine D élevés qui conduisent à une hypercalcémie puis des dysfonctions rénales. A ce jour, il n'existe pas de traitement efficace, et ces derniers limitent la croissance de l'enfant et/ou les effets secondaires impactent la qualité de vie.

Nous avons identifié dans des systèmes cellulaires, une molécule diminuant les effets d'un excès de vitamine D, et nous souhaitons à présent valider son potentiel thérapeutique dans des modèles précliniques d'IIH.

REMPACEMENT : les systèmes cellulaires ne sont pas appropriés pour modéliser la complexité de la régulation des niveaux de calcium sérique, cette dernière impliquant de nombreux organes aux fonctions différentes (e. g. intestin pour l'absorption, reins pour l'excrétion, les os pour la résorption). Ces expériences seront réalisées sur des souris mâles et femelles, certaines ayant un phénotype dommageable.

RAFFINEMENT : Certaines souris utilisées dans cette étude étant hypercalcémiques, des modalités de suivi de l'état de santé, des critères d'arrêts ainsi que des points limites seront mis en place (i. e. absence de gain de poids à la puberté, incapacité à s'alimenter, perte de poids de plus de 15 %, poils hérissés). Si nécessaire, des analgésiques seront administrés en fonction de la douleur. L'expertise du laboratoire sur l'étude des voies de signalisation de la vitamine D chez la souris permettra la mise en place d'expérimentations de qualité et raffinées (i. e. points critiques étroitement surveillés). A noter que le traitement devrait améliorer les conditions des souris.

REDUCTION : Les différents protocoles expérimentaux ont été consciencieusement réfléchis et le nombre d'animaux utilisés sera réduit au strict minimum, tout en s'assurant que les cohortes utilisées permettent de conclure de manière significative.

Ce projet utilisera au maximum 1440 animaux sur 4 ans.

19739 Le cancer du foie constitue la deuxième cause mondiale de morts liées au cancer. Le carcinome hépatocellulaire (CHC) en constitue la forme primitive la plus fréquente avec environ 500 000 nouveaux cas/an. Il survient sur des foies malades, touchés par des hépatites virales ou toxiques (alcool) ou des foies gras à cause de maladies métaboliques (obésité en particulier). Le pronostic du CHC reste très sombre avec un taux de survie à cinq ans n'excédant pas 20%. La chirurgie est le principal traitement curatif mais seule une minorité de patients peut en bénéficier et le traitement palliatif du CHC non opérable n'a qu'une efficacité très modérée avec seulement quelques mois de survie supplémentaire.

Il paraît donc essentiel de décrypter les mécanismes moléculaires impliqués afin de trouver de nouvelles pistes thérapeutiques. Nous travaillons sur la mutation génétique la plus fréquente dans le CHC humain qui conduit à l'activation d'un oncogène, mutation que nous avons reproduite par un modèle murin transgénique. Des études antérieures ont pu identifier 6 gènes impliqués dans le processus tumoral. Pour estimer leur implication dans la survenue et la progression des CHC, notre stratégie sera de les invalider.

Pour respecter la règle des 3R, les procédures expérimentales ont été réfléchies afin de minimiser le nombre d'animaux utilisés tout en permettant une analyse statistique valable. Nous prévoyons l'utilisation de 1045 animaux sur 5 ans pour mener à bien ce projet.

Notre projet s'appuie sur des résultats *in vitro*, il n'existe pas de technique permettant de remplacer l'expérimentation animale pour étudier le développement tumoral qui est le résultat d'interactions complexes entre la tumeur, son tissu d'origine et son environnement.

Pour les invalidations géniques, nous utiliserons une technique innovante et validée qui évite la création de lignées et les nombreux croisements permettant leur maintien, permettant de réduire le nombre d'animaux utilisés aux seuls animaux nécessaires à l'expérimentation.

Les protocoles d'induction de tumeur hépatique que nous utilisons sont soit génétiques, soit chimiques, soit métaboliques, mais n'entraînent pas de souffrance. Ces protocoles ont lieu dans un autre établissement utilisateur situé sur le même site.

Nous suivrons ici le développement des tumeurs par échographie. Cette technique non invasive permet un suivi longitudinal en évitant les souffrances engendrées par un développement tumoral important puisque les études sont réalisées à des stades précoces, sur de petites tumeurs. Afin d'affiner la surveillance des animaux en surveillant les éventuels effets délétères de l'altération générée sur le foie, des biopsies hépatiques sont prévues dès l'apparition des tumeurs. Il s'agit de réaliser une chirurgie légère, sous anesthésie générale et avec administration d'antalgiques, pour réduire au maximum la douleur.

Les injections et les prélèvements sanguins seront également réalisés sous anesthésie générale.

En conclusion, notre hypothèse est que les 6 gènes que nous souhaitons inactiver dans le foie normal ou cancéreux ont une importance majeure dans la cancérisation du foie. Ils pourraient donc être la source de pistes thérapeutiques. La mise en œuvre de notre projet permettra de répondre à cette question, rendue cruciale par le fait que le CHC manque cruellement d'options thérapeutiques à ce jour.

19740 Les motoneurones relient le système nerveux central aux fibres musculaires. Ils sont la voie de sortie des messages nerveux vers les muscles squelettiques pour effectuer les mouvements volontaires. L'amyotrophie spinale (SMA) est la principale cause de mortalité infantile due à une maladie génétique chez l'homme. Cette maladie est caractérisée par la mort des motoneurones et une atrophie des muscles squelettiques ce qui conduit progressivement à une paralysie et au décès prématuré (avant l'âge de 2 ans) pour la forme la plus sévère de la maladie.

Dans la plupart des cas, la SMA est due à une mutation du gène SMN1 (Survival of Motor Neuron 1). Les travaux de recherche ont récemment permis l'initiation des premiers essais cliniques pour le traitement de la SMA par thérapie génique. Ce traitement consiste à injecter des vecteurs viraux appelés sc-AAV9 (Adeno-Associated Virus de sérotype 9). Les vecteurs viraux sont des outils couramment utilisés en biologie moléculaire pour délivrer un gène fonctionnel (« gène médicament ») aux cellules. Cependant, bien que particulièrement prometteuses, ces stratégies de thérapie génique doivent encore être améliorées afin d'assurer le bon fonctionnement du système neuromusculaire des patients sur le long terme. Dans cet objectif, nous voulons initier une étude approfondie pour une meilleure compréhension des mécanismes de la maladie et plus particulièrement du rôle que jouent les tissus périphériques dans le développement de la maladie. Dans ce projet, nous nous intéresserons plus particulièrement au rôle du muscle squelettique et des cellules souches musculaires dans le développement de la SMA.

Aujourd'hui, des modèles murins d'inactivation du gène *Smn* existent, cependant, ces modèles ne permettent pas de déterminer si les atteintes musculaires observées sont la conséquence de la mort des motoneurones, ou une réponse propre au muscle suite au déficit en SMN. Pour répondre à cette problématique, nous proposons de générer un nouveau modèle de souris mutées pour le gène *Smn* uniquement dans les cellules souches musculaires. Cette mutation sera activée par l'administration d'une molécule communément utilisée pour ce type de modèles : le tamoxifène. Ce nouveau modèle nous permettra : (1) d'étudier le rôle du gène *Smn* dans la fonction des cellules souches musculaires lors de la myogenèse post natale et de la régénération musculaire, (2) d'établir clairement le rôle de ces cellules dans le développement de la maladie, (3) à plus long terme, d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques qui permettront d'améliorer les stratégies thérapeutiques actuelles et ainsi d'assurer l'intégrité du système neuromusculaire tout au long de la vie des patients atteints de SMA.

Compte tenu des interactions complexes qui existent entre les cellules souches musculaires et leur environnement (fibres musculaires, motoneurones, vaisseaux sanguins...), une étude basée uniquement sur des expériences *in vitro* ne permettrait pas répondre de manière pertinente à notre problématique. Cependant, afin de respecter la règle des 3R, une approche de Remplacement par des cultures cellulaires sera employée dès que possible. De plus, dans un souci de Réduction, la production des animaux sera contrôlée par du personnel expérimenté et réalisée de façon à obtenir uniquement les animaux d'intérêt. De même, les plans expérimentaux ont été pensés de façon à réduire au maximum le nombre de souris impliquées tout en garantissant des résultats statistiquement exploitables pour arriver à une conclusion scientifique fiable. Chaque animal sera utilisé pour le plus d'analyses possibles. Par exemple, l'analyse du phénotype musculaire et des motoneurones de la moelle épinière sera réalisée sur le même animal. Afin de limiter le stress des animaux, les procédures expérimentales seront réalisées par du personnel formé et compétant, l'isolement sera évité (6 animaux par cage maximum), et les meilleures conditions d'hébergements seront garanties (portoirs ventilés avec un système d'abreuvement automatique et un accès illimité à la nourriture, conditions de température, d'hygrométrie et cycle d'éclairage contrôlés et monitorés, enrichissement du milieu, salles d'expérimentation isolées des salles d'élevage). Les actes chirurgicaux seront systématiquement accompagnés de traitements anesthésiques et analgésiques appropriés et une attention particulière sera portée à la phase de réveil. Une surveillance des animaux impliqués dans les procédures expérimentales sera réalisée quotidiennement pour détecter et traiter au plus tôt d'éventuels signes de douleur. Toutes les procédures expérimentales utilisées dans ce projet ont déjà fait l'objet de nombreuses publications dans le domaine du muscle squelettique. Toutefois, en cas d'atteinte d'un point limite préalablement fixé (perte de poids de 20% sur une période d'une semaine, état léthargique, pelage hérissé), les animaux seront

immédiatement mis à mort, et les tissus prélevés pour analyse. Au total 989 souris seront utilisées pour ce projet réparties sur 4 procédures expérimentales.

19741 La cécité est un problème de santé publique qui handicape gravement les personnes atteintes et qui concerne un français sur 1000. La thérapie génique, consiste à apporter des gènes thérapeutiques aux cellules « malades » dans le cadre d'une maladie causée par la déficience ou le mal fonctionnement d'une protéine essentielle ou les médicaments conventionnels ne sont que de peu d'utilité. Le seul traitement envisageable est alors de pallier cette déficience via l'administration exogène d'une protéine thérapeutique en transférant son gène. L'utilisation d'un gène comme médicament permettra d'obtenir une expression continue de la protéine thérapeutique au sein des cellules cibles, de qui représente un atout très important. Ces traitements peuvent être testés uniquement « in vivo » (système oculaire de mammifère) car les propriétés pharmacologiques des traitements ne peuvent qu'être évaluées dans un compartiment oculaire intact et fermé.

Dans ce projet, nous testerons de nouveaux traitements applicables à une grande variété de maladies oculaires, plus particulièrement aux dégénérescences rétinienne héréditaires. Nos traitements consistent en une unique injection intraoculaire ou systémique d'un vecteur transporteur d'un (de) gène(s) thérapeutique(s). Cette étude sera réalisée chez la souris (*mus musculus*), nous utiliserons des souris normales et 3 modèles murins de dégénérescence rétinienne. Suite aux injections, l'état de la rétine sera visualisé par des techniques d'imagerie non invasives de l'œil, l'acuité visuelle sera évaluée par des tests comportementaux et enfin la fonction rétinienne sera étudiée par des électrorétinogrammes.

En incluant les contrôles nécessaires, nous aurons besoin de 552 animaux au maximum pour cette étude sur 5 ans.

Conformément à la « règle des 3R » décrite au 2° de l'article R214-105 :

Remplacer : Ces traitements ne peuvent être testés qu'in vivo car les propriétés pharmacologiques des traitements ne peuvent être évaluées que dans des conditions physiologiques. De plus l'acuité visuelle ne peut être estimée que sur le vivant.

Réduction : Le nombre d'animaux a été limité au minimum nécessaire pour atteindre l'objectif scientifique de ce projet avec des résultats statistiquement interprétables. Le nombre a été évalué en fonction de nos précédentes études.

Raffiner : Les animaux seront examinés quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié de l'animalerie et seront hébergés dans les conditions conformes à la réglementation (cages de stabulation avec enrichissement, nourriture et boisson à volonté, cycle jour/nuit de 12h/12h). Les animaux bénéficieront, si besoin, d'une anesthésie générale fixe ou gazeuse. Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée. Elle permettra une surveillance adaptée des animaux en fonction des points limites définis à chaque procédure afin de s'assurer de leur bien-être. Les animaux entrant dans les procédures expérimentales de notre projet naîtront sur site.

19742 Les maladies rétinienne d'origine génétique (inherited retinal dystrophies, IRDs) représentent une cause majeure de cécité ou de handicap visuel chez l'adulte. Elles touchent environ 1 personne sur 2000 dans le monde. Au cours de la dernière décennie, des progrès significatifs ont été réalisés dans notre compréhension des mécanismes moléculaires et génétiques des dégénérescences rétinienne héréditaires. L'hétérogénéité des IRDs est le reflet du nombre important de défauts génétiques rapportés, ces défauts pouvant être transmis selon tous les modes de transmission décrits. Plus de 180 gènes sont actuellement impliqués dans les différentes formes de pathologies rétinienne, expliquant 60% des cas.

La thérapie génique est l'utilisation de matériel génétique pour traiter, guérir ou prévenir une maladie ou un état pathologique causé par une protéine déficiente ou dysfonctionnelle. Elle implique l'introduction de matériel génétique dans une cellule cible. Le principe de la thérapie génique repose sur le transfert d'un gène thérapeutique à l'aide de vecteurs viraux (adénovirus, virus adéno-associés, lentivirus, virus de l'herpès) ou non viraux (liposomes et polymères cationiques), grâce

auxquels les cellules du patient vont commencer à produire des protéines qui corrigeront un trouble génétique ou une maladie acquise. Forts de ces connaissances, il est maintenant possible de développer des thérapies géniques pour un grand nombre de maladies rétinienne. La plupart des techniques de thérapie actuelles font appel à des vecteur viraux, mais il a été montré que l'injection directe d'ARN messagers pouvait suffire à induire l'expression de protéines d'intérêt dans les cellules sans capsides virales. La période de vaccination actuelle contre la COVID-19 est une démonstration de l'efficacité et du potentiel des traitements basés sur les injections d'ARNs. Le but de ce projet est de tester la capacité d'ARN injectés dans l'œil de souris à produire une protéine dans la rétine. Dans cette étape de validation, des ARNs codants pour des protéines fluorescentes seront injectées dans l'œil de souris. Les yeux seront prélevés à différents temps après injections et la présence de protéines fluorescentes sera analysée par microscopie. Une validation de cette approche ouvrirait des perspectives considérables dans le domaine du traitement des maladies rétinienne.

Au maximum, 96 souris seront utilisées dans ce projet. Nous avons pris soin dans cette étude du principe de Remplacement, de Réduction et de Raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ».

- (Remplacer) Du fait de la complexité de la composition cellulaire de l'oeil, l'utilisation de l'animal nous est indispensable. Il n'y a pas d'alternative par des modèles in vitro.
- (Réduire) Le nombre d'animaux a été réduit au minimum requis pour pouvoir atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus. Un test de puissance a été réalisé pour déterminer le nombre d'animaux requis pour ce projet.
- (Raffiner) Les animaux seront examinés quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Les animaux sont hébergés dans les conditions conformes à la réglementation (présence de carrés de cellulose, de bâton à ronger, de tunnel ou d'une maisonnette, avec nourriture et abreuvement à volonté. Nous observerons également une période d'acclimation entre l'arrivée des animaux et le début des procédures expérimentales. Les procédures expérimentales seront réalisées sous anesthésie générale gazeuse et complétée par une anesthésie et analgésie locale. Des points limites précoces ont été fixés pour limiter la gêne et éviter la souffrance des animaux.

19743 Les maladies à expansion du trinuéotide, affections neurodégénératives héréditaires, comportent la maladie de Huntington, l'atrophie musculaire spinobulbaire, les ataxies spinocérébelleuses SCA 1, 2, 3, 6, 7 et 17 et l'atrophie dentato-rubro-pallido-luysienne (DRPLA). Ces maladies sont génétiquement et cliniquement hétérogènes.

L'atrophie DRPLA, primitivement décrite dans les populations japonaises, a été aussi observée dans les populations caucasiennes ou africaines. Le début de la maladie peut être précoce ou tardif (de 1 à 60 ans). Il s'agit d'une forme rare d'ataxie cérébelleuse autosomique dominante caractérisée par des mouvement involontaires, une ataxie, une épilepsie, un déficit cognitif. Le gène en cause (ATN-1) code pour l'atrophin-1, une protéine exprimée dans le système nerveux, particulièrement dans le noyau et le cytoplasme des neurones. Son rôle n'est pas très bien déterminé, mais elle jouerait un rôle de co-supresseur dans le processus de transcription des gènes. Les maladies à expansion de triplet sont d'expression clinique sévère et de pronostic fatal. L'évolution de la maladie varie de quelques mois à quelques années.

Ces maladies font partie des maladies rares et n'avaient pas bénéficié d'avancée thérapeutique majeure. Récemment des travaux sur la maladie de Huntington, d'abord chez la souris, et actuellement en essai clinique chez l'homme, ont opté pour la stratégie oligonucléotide anti-sens et ciblant le gène défaillant. Suite aux approches anti-sens développées dans la maladie de Huntington chez l'homme et dans SCA7 chez la souris, un intérêt particulier est porté maintenant sur la DRPLA. Nous projetons utiliser la stratégie anti-sens dans un modèle murin de DPRLA (ATN1-FI-65Q) pour évaluer son innocuité et aussi son efficacité dans ce modèle avant un éventuel essai clinique chez l'homme.

Pour constituer des lots expérimentaux, nous devons maintenir puis amplifier cette lignée murine à phénotype dommageable. Pour réaliser notre étude sur l'efficacité de la stratégie antisens dans la DRPLA, nous avons besoin d'un total d'au moins 90 souris mutées hétérozygotes. Nous allons en générer 96 pour les expérimentations car nous ne pouvons pas écarter un taux de mortalité de 5 à 10 % suite à la chirurgie ou à une aggravation inexplicée de la maladie. Pour le maintien de la lignée à l'état respirant, nous avons besoin de 56 souris mutées hétérozygotes. Ce projet comprend un total de 152 animaux à phénotype dommageable sur 3 ans.

Tout au long de ce projet, la règle des 3R sera appliquée :

1) Remplacement : les études permettant de répondre aux questions posées ne peuvent être réalisées que sur des souris transgéniques mimant les signes cliniques et les lésions neuropathologiques humaines de la DRPLA.

2) Réduction : nous utiliserons un nombre d'animaux minimal nous permettant d'obtenir un résultat statistiquement significatif afin de pouvoir aboutir des conclusions scientifiquement solides pour l'ensemble des travaux.

3) Raffinement : Toutes les précautions seront prises afin de n'imposer aucune souffrance ou une contrainte minimale aux souris utilisées. Nous avons défini un ensemble de points limites pour la procédure d'élevage. De plus, un programme d'enrichissement sera appliqué en ajoutant dans la cage, une petite maison en carton et de matériel pour la nidification (coton compacté).

19744 Les rhabdomyosarcomes (RMS) sont les sarcomes des tissus mous les plus fréquents chez l'enfant et sont issus des muscles. Les thérapies actuelles sont lourdes et associent une élimination chirurgicale de la tumeur, un traitement de chimiothérapie et des séances de radiothérapie. Ces traitements intensifs ne sont pas sans conséquence en termes de séquelles à long terme pour les enfants. Le taux de survie des enfants et adolescents atteints de RMS est de 75%, et chute à 20% si des métastases sont présentes. Le développement de modèles innovants, tels que des modèles in vivo (représentatifs du type de tumeur et de son microenvironnement) mais aussi l'établissement de nouvelles lignées cellulaires de rhabdomyosarcomes murins, deviennent indispensables pour la caractérisation de ces tumeurs. L'objectif de ce projet est d'établir une nouvelle lignée de souris via des croisements génétiques. La double altération génétique de gènes impliqués dans le développement de cancer permet d'obtenir une lignée de souris développant spontanément des rhabdomyosarcomes dans 80-90% des cas entre 2 et 5 mois. Ce sont des sarcomes des tissus mous, que l'on va retrouver la plupart du temps au niveau des muscles squelettiques.

Les lignées de rhabdomyosarcomes murins sont établies à partir de croisement de souris génétiquement modifiées (Procédure 1 et 2). Les animaux doublement mutés vont développer des tumeurs spontanées au niveau des tissus mous. Dans un second temps, les tumeurs des souris issues de la procédure 2 sont récupérées afin d'isoler les cellules pour créer de nouvelles lignées de rhabdomyosarcomes murins. Ces nouveaux modèles cellulaires, une fois caractérisés, pourront également servir de base pour des tests de thérapies en cours de développement (Remplacement).

Ces lignées cellulaires créées seront ensuite greffées chez des souris de 2 âges différents au niveau du muscle de la patte (procédure 3). L'injection de cellules dans le lieu de prédilection des tumeurs (dans le muscle de la patte, en intra-tibialis dans notre cas) est la méthode internationalement reconnue, cela va nous permet d'analyser l'environnement immunitaire des tumeurs en fonction de l'âge des souris. Comme l'étude a pour but de mieux caractériser les rhabdomyosarcomes pédiatriques, l'âge (contexte immunitaire et développemental différent) est un facteur important, des souris de 4 et 6 semaines seront utilisées pour la greffe.

Réduction :

Le nombre d'animaux a été réduit au maximum pour permettre le maintien des populations parents nécessaires aux croisements génétiques (Procédure 1), l'établissement du modèle possédant la double altération génétique qui permettra de générer les tumeurs (Procédures 2). Nous avons aussi réduit au maximum le nombre d'animaux pour permettre une analyse statistique et ainsi tirer des conclusions pour comparer la prise tumorale des lignées cellulaires en fonction du contexte

développemental de l'animal mais aussi en procédant de façon séquentielle quand cela est possible.

Remplacement :

Lorsque cela est possible, l'utilisation des animaux est remplacée par d'autres modèles in vitro comme par exemple la culture cellulaire pour la sélection des milieux de cultures. Les nouveaux modèles cellulaires de rhabdomyosarcomes murins, une fois caractérisés, pourront également servir de base pour des tests de thérapies en cours de développement et ainsi remplacer l'utilisation d'animaux.

Raffinement :

Pour les animaux développant spontanément des rhabdomyosarcomes et les animaux greffés, un suivi des animaux 2 fois par semaine sera réalisé afin de détecter tout signe pouvant évoquer des signes de souffrance (pesée, palpation, mesure du volume tumoral, imagerie : scanner et/ou échographie). La définition précise des points limites précoces et prédictifs d'un mal être, permettront de limiter au maximum la souffrance animale.

A l'issue de ce projet de recherche, nous escomptons pouvoir valider des nouveaux modèles in-vivo et in-vitro de rhabdomyosarcomes murins, plus représentatifs des réponses cellulaires et immunitaires.

Dans ce projet de recherche fondamentale et clinique, 540 souris seront utilisées.

19745 L'objectif du projet est d'élucider les mécanismes impliqués dans l'apparition de l'obésité, et des comorbidités dans le Syndrome de Down (SD) ou la trisomie 21. Avec une incidence de 1 naissance sur 1000, le SD offre une grande opportunité pour étudier les mécanismes communs et nouveaux associés au risque accru de développement de l'obésité, et la déficience intellectuelle. Notre étude, dans le cadre d'un consortium européen, aura les objectifs suivants :

- Déterminer les schémas de comorbidité liés à l'âge observés au début de la vie (avant 45 ans) chez les personnes atteintes du Syndrome de Down et les facteurs physiologiques spécifiques.

- Étudier les effets du surdosage des gènes candidats impliqués dans le SD pour expliquer les comorbidités dans les modèles de souris.

- Intégrer des données provenant des patients, des modèles souris et cellulaires à différentes échelles de complexité biologique en utilisant les outils bio-informatiques disponibles publiquement ou développés par le consortium, ainsi que des logiciels d'apprentissage automatique statistique.

Au-delà de l'impact sur les patients atteints de SD, nous espérons que les résultats de ce projet seront également bénéfiques pour les patients de la population générale.

Dans ce contexte, entant que partenaire du consortium, nous utiliserons les modèles de souris portant 6 mutations impliqués dans le Syndrome de Down pour étudier la déficience intellectuelle et l'obésité grâce à un régime alimentaire enrichi en graisse et sucre (obesogène).

Remplacement : les analyses liées à la physiologie étudiant l'obésité et la déficience intellectuelle et des comorbidités liées au syndrome de down, ne peuvent être réalisées que sur l'organisme entier car elles intègrent les interactions entre les différents organes et l'environnement (nourriture, interaction sociale. . etc). L'étude est complétée par les analyses cellulaires et bio-informatiques. Dans ce projet (établi pour une période de 5 ans), pour chaque lignée de souris, nous utiliserons 160 souris pour les études métaboliques et comportementales soit un total de 960 souris pour les 6 lignées à étudier.

Raffinement : toutes les expérimentations de ce projet seront réalisées par un personnel compétent effectuant couramment les différentes procédures et respectant l'ensemble des règles relatives au bien-être animal, limitant ainsi au maximum le stress de l'animal. Par ailleurs, les souris seront maintenues le plus souvent dans leur environnement habituel, excepté lors des analyses de la dépense énergétique qui nécessitent leur isolement. Ils sont regroupés dès la fin des mesures pour réduire le temps d'isolement. Les procédures mises en œuvre impliquent un suivi régulier, notamment une pesée hebdomadaire; et en cas de souffrance d'un animal, l'avis du vétérinaire sera demandé.

De plus, comme un lot de souris sera sous régime enrichie, l'obésité est surveillée de très près, en effet si un animal a des difficultés à se déplacer et/ou à accéder à la nourriture en vue de son poids, le régime enrichi est interrompu et l'animal est replacé sous régime standard. Une anesthésie gazeuse sera appliquée lors de la procédure d'identification des souris par puce électronique.

Réduction : Le nombre de souris utilisées dans cette étude a été calculé en tenant compte notamment de la variabilité inter-individus (élevée dans le cas de tests métaboliques) mais également pour l'application de tests statistiques adéquats (tels que t-test ou test non paramétrique).

19746 Au cours du vieillissement, la masse musculaire diminue progressivement et dans certains cas cela peut conduire à une pathologie : la sarcopénie. La sarcopénie est une pathologie du vieillissement complexe et multifactorielle. Elle se caractérise par une perte progressive et généralisée de la masse musculaire squelettique et de la force qui est associée à un risque de diminution des performances physiques, de la qualité de vie et également avec un risque de mortalité relativement important. Le vieillissement entraîne des altérations structurales et fonctionnelles du système neuromusculaire qui sont aujourd'hui reconnus comme favorisant le développement de la sarcopénie.

Notre précédente étude nous a permis de montrer que la surexpression locale de la protéine GDF5 dans un muscle de souris jeune ou âgée augmente la masse et la fonction musculaire. Ce nouveau projet consiste à évaluer une approche thérapeutique basée sur l'augmentation de l'expression de la protéine GDF5 par voie systémique chez la souris jeune et âgée. L'objectif de cette étude est d'étudier l'expression du GDF5 dans le muscle et le nerf au cours du vieillissement, et d'évaluer le potentiel thérapeutique de cette protéine dans la lutte contre la perte musculaire liée à l'âge.

Remplacement: Afin de limiter au maximum le recours à l'utilisation de souris pour l'obtention de réponses à nos questions, les expériences seront, dans la mesure du possible réalisées in vitro avec des lignées cellulaires. Ce n'est qu'en dernier recours que nous utiliserons le système murin.

Réduction : De même, les processus expérimentaux seront conçus de façon à utiliser un nombre de souris limité permettant une analyse statistique. Néanmoins, les souris âgées présentent une grande hétérogénéité de phénotype dû au vieillissement et développent parfois des tumeurs qui nécessite un sacrifice prématuré. Pour cela, nous réaliserons des groupes de 10 souris âgées et 8 pour les souris jeunes.

Raffinement : Les conditions d'hébergement et l'enrichissement du milieu sont gérés par l'animalerie. Elles consistent en un contrôle quotidien des cages, un changement régulier, une gestion pour un nombre réduit d'animaux par cage (5 maximum). Le changement des cages se fait sous hotte aspirante et les cages possèdent des filtres. L'enrichissement du milieu consiste en l'ajout de laine de bois afin que les souris puissent faire un nid ainsi que de lanières de papier Kraft et des tunnels en carton. Enfin, si nécessaire, la nourriture pourra être mise à disposition sur le plancher de la cage. Pour limiter la souffrance et l'angoisse, les procédures telles que les injections en rétro orbital chez l'adulte seront réalisées sous anesthésie gazeuse (l'isoflurane 3% en induction et 1.5% en maintien). Les animaux seront suivis quotidiennement afin de relever le moindre signe de souffrance. Au cours des différentes procédures, la température des souris est maintenue constante à l'aide d'une plate-forme chauffante.

Pour réaliser ce projet nous utiliserons 96 souris C57BL/6JRj.

19747 L'amylose systémique est caractérisée par la transformation de certaines protéines en fibrilles rigides et insolubles (amyloïdes), et par leur déposition dans plusieurs tissus et organes, ce qui entraîne leur dysfonctionnement.

Actuellement le taux de mortalité de cette maladie est très élevé (50% 3 ans après diagnostic), dû principalement à l'atteinte cardiaque (insuffisance cardiaque).

Le traitement conventionnel de l'amylose cardiaque est une chimiothérapie associant des médicaments dont l'objectif est de réduire la production des protéines amyloïdes pathogènes. Malheureusement, une surmortalité parmi les plus gravement atteints par la maladie est observée

dans les premiers jours qui suivent la mise en place de ce traitement incontournable, à cause d'une amplification de l'insuffisance cardiaque. Les observations cliniques ont désigné le glucocorticoïde dexaméthasone comme responsable principal. L'objectif de ce projet est donc de comprendre les effets délétères de ce traitement sur le fonctionnement cardiaque afin de développer une stratégie de protection lors du traitement de cette pathologie.

Nous envisageons la mise en place d'un système expérimental ex vivo, selon lequel le coeur des rats adultes sera isolé, suite à l'endormissement profond de l'animal, suivi par sa mort sans réveil ; ensuite seront administrés par perfusion les médicaments d'intérêt, en l'occurrence dexaméthasone. Ce processus sera précédé par un traitement potentiellement protecteur in vivo, qui visera à l'inhibition des effets cardiotoxiques. Les paramètres de contractilité du coeur seront mesurés avant et pendant la perfusion par le médicament.

Nous avons choisi ce protocole pour les raisons suivantes. Dans ce travail nous avons besoin de mesurer les propriétés mécaniques du coeur en tant qu'organe, ce qui nécessite l'utilisation des animaux. Pour cette raison, le Remplacement des animaux par un système cellulaire n'est pas compatible avec les objectifs de l'étude. D'autre part, les effets de dexaméthasone sur le fonctionnement du coeur, dans des conditions physiologiques, ont été étudiés auparavant par injection directe dans l'animal suivie par des heures / jours d'attente avant sacrifice. Notre objectif étant d'étudier l'action aiguë du médicament (ce qui correspond mieux aux conséquences pathologiques du traitement de l'amylose cardiaque), nous avons la possibilité de développer un protocole expérimental principalement ex vivo. Dans le cas d'un prétraitement, les animaux seront injectés in vivo avec un agent potentiellement protecteur sur les 7 jours précédant le sacrifice et l'isolement du coeur (dose journalière). Le coeur isolé sera ensuite perfusé ex vivo avec le médicament. Cette approche nous permettra d'améliorer le Raffinement de nos procédures, puisque dans le cadre d'un protocole expérimental principalement ex vivo, seul le prétraitement protecteur aura lieu in vivo, ce qui aura pour conséquence positive de limiter l'exposition des animaux à une souffrance éventuelle. Avant récupération du coeur, les rats seront profondément anesthésiés de manière gazeuse (isoflurane) suite à l'administration d'un antalgique par injection sous cutanée. Toujours dans le cadre du Raffinement de nos procédures, les animaux seront hébergés pendant une semaine avant les expériences, avec un cycle jour/nuit adapté et avec la boisson et la nourriture ad libitum. Les cages seront enrichies par du nid végétal. Les rats feront l'objet d'un contrôle au moins quotidiennement par une personne compétente selon une grille de points limites qui sera mise en place (détaillée dans le projet). L'administration d'analgésique ou encore l'euthanasie seront envisagée en cas de besoin.

Nous allons utiliser des rats Wistar adultes (250-300 gr et 20 mois), afin de considérer le facteur important pour l'évolution de l'amylose cardiaque, qui est le vieillissement. Dans un souci de Réduction du nombre de rats utilisés, ce nombre a été défini à $n=15$ par groupe, ce qui, suivant nos expériences préliminaires et des études du même type précédemment publiées, représente un nombre minimal d'animaux permettant l'obtention de résultats statistiquement significatifs. Au total, 210 rats seront utilisés, repartis en 7 groupes pour chaque âge (7×15 jeunes + 7×15 âgés = 210). Les 7 groupes incluent 1 contrôle et 6 substances potentiellement protectrices à tester, qui seront administrées en amont du traitement par la dexaméthasone.

En conclusion, les objectifs du projet sont : i) d'étudier les raisons pour lesquelles les médicaments utilisés au traitement de l'amylose cardiaque par chimiothérapie accélèrent la mort des patients les plus atteints due à l'aggravation de l'insuffisance cardiaque ; ii) de chercher des traitements protecteurs afin d'annuler l'effet cardiotoxique. Il est donc indispensable de mesurer les paramètres du fonctionnement cardiaque au niveau de l'organe. Cependant, notre modèle ex vivo, sur coeur isolé, a l'avantage de minimiser la souffrance d'un traitement in vivo.

19748 Les syndromes myéloprolifératifs (SMP) sont des maladies caractérisées par une production excessive de cellules sanguines due à une série de mutations génétiques.

Depuis 2012, ces pathologies peuvent être traitées par une petite molécule ciblant spécifiquement l'une des mutations génétiques responsables de la maladie. Ce traitement ciblé dénommé ruxolitinib, améliore la symptomatologie des patients, mais ses effets à long terme restent encore

peu explorés. Quelques cas de cancers de la peau agressifs ont été rapportés dans la littérature et un excès de ces cancers a été observé dans un essai clinique.

Grâce à un recueil de données -clinique et histologique- exhaustif sur une cohorte de 1007 patients, il a été mis en évidence une fréquence accrue de cancers de peau agressifs chez les patients traités par cet inhibiteur, comparativement aux patients non traités.

Le premier objectif de ce projet est d'évaluer in vivo l'effet de cet inhibiteur (le ruxolitinib) ciblant la principale mutation présente dans les SMP, dans un modèle de cancer cutané induit chimiquement. Le second objectif de ce projet est d'identifier un traitement médicamenteux qui permettrait la diminution/régression de ces cancers cutanés induits par le ruxolitinib. Afin d'atteindre cet objectif, nous prévoyons d'évaluer l'effet de différents traitements (quatre traitements permettant soit de réactiver le système immunitaire, soit d'inhiber les signaux cancérigènes).

Nous utiliserons le modèle d'induction de carcinome cutané déjà décrit dans la littérature. Des souris normales seront traitées avec des molécules chimiques (application sur la peau du dos à J0 et J18 pour l'une des molécules et deux fois par semaine de la semaine 4 à la semaine 40) afin d'induire des lésions pré-cancéreuses et des tumeurs cutanées. Les souris seront traitées avec le ruxolitinib à partir de la semaine 22, soit juste après l'apparition des premières lésions cancéreuses et jusqu'à la semaine 28. Le traitement s'effectuera par gavage oral, deux fois par jour, à l'aide de sonde en plastique sur souris éveillées, cette procédure étant indolore. Les différents inhibiteurs médicamenteux seront débutés dès que les tumeurs cutanées auront atteint un certain volume afin de pouvoir observer une potentielle régression sous traitement. Ces traitements s'effectueront par gavage oral comme pour le ruxolitinib ou par injection intrapéritonéale pour les traitements qui nécessitent cette voie d'administration. Les injections intrapéritonéales s'effectueront sur souris éveillées, cette procédure étant indolore. Le nombre et la taille des lésions pré-cancéreuses et des tumeurs cutanées seront évalués visuellement, et des échantillons cutanés seront prélevés après euthanasie des souris pour analyse des lésions tumorales. Ainsi nous pourrons évaluer l'impact des différents inhibiteurs sur le développement des tumeurs cutanées, comparativement à un groupe de souris contrôles non traitées.

Afin d'atteindre cet objectif, nous appliquerons le principe de la «règle des 3R».

Remplacement : L'hypothèse principale pouvant expliquer l'effet inducteur de cancer du ruxolitinib est l'inhibition du système immunitaire induite par cette molécule. De nombreuses publications ont décrits des modèles de culture en trois dimensions permettant d'étudier le développement tumoral cutané. Cependant, ces modèles ne récapitulent pas toute la complexité de l'organe, et ne permettent pas d'explorer l'effet sur le système immunitaire de ces inhibiteurs. Ces modèles ne peuvent donc pas remplacer l'étude in vivo, c'est pourquoi nous aurons recours à des animaux pour valider notre hypothèse.

Réduction : Pour la mise en place du modèle et sa validation, nous utiliserons 2 lots de 12 souris et nous reproduirons 2 fois l'expérience (soit 48 souris). Cela nous permettra d'obtenir une puissance statistique suffisante pour conclure à partir des résultats obtenus. Puis nous testerons 4 molécules pour évaluer leur effet thérapeutique potentiel (4 lots de 48 souris). Nous ferons en sorte de regrouper au maximum les conditions à tester afin de réduire au minimum le nombre d'animaux. L'expérience de notre équipe dans l'utilisation de modèles animaux, la multiplicité des paramètres mesurés, l'utilisation des méthodes statistiques adaptées nous permettront une exploitation maximale des données obtenues par expérience afin de réduire le nombre d'animaux à utiliser (240 souris pour les 2 ans que durera ce projet).

Raffinement : Toutes les expériences et manipulations des animaux seront effectuées dans le respect du bien-être animal. Le change des litières sera hebdomadaire. Chaque cage sera dotée d'un double enrichissement (standard à l'animalerie): papier kraft et buchette de bois.

Le suivi des animaux sera quotidien et effectué dans le respect du bien-être animal. Il sera assuré en utilisant une grille d'évaluation prenant en compte l'apparence physique, le poids et le comportement des animaux. Nous avons ainsi défini des critères d'arrêt qui lorsqu'ils sont atteints conduisent à l'euthanasie de la souris. Les souris seront euthanasiées au plus tard 40 semaines

après l'administration des molécules induisant la tumeur ou plus tôt si un animal présente une souffrance définie par l'atteinte d'un point limite.

Des expériences préliminaires sur le même modèle animal ont montré que la période de gavage de 5 semaines était bien tolérée par les animaux. Pendant cette période, les signes de mauvaise tolérance seront surveillés de manière plus rapprochée. Ce geste sera effectué par du personnel expérimenté, avec des sondes de gavage adaptées afin de diminuer au maximum le stress des animaux. En cas de mauvaise tolérance, une analgésie sera administrée.

19749 Les lymphomes sont des tumeurs malignes qui se développent à partir des lymphocytes (B le plus souvent) c'est-à-dire des cellules sanguines qui constituent un sous-groupe de globules blancs. Les lymphomes cérébraux primitifs (LCP) se développent dans le système nerveux central (cerveau, œil, liquide céphalorachidien et moelle épinière) sans atteinte des autres organes. C'est une maladie rare (environ 300 nouveaux cas par an en France) peu connue et de mauvais pronostic avec les traitements actuels. Le traitement actuel du LCP repose sur des associations de chimiothérapie comportant du Méthotrexate à fortes doses. Les rechutes ne sont pas rares.

Actuellement, l'IRM cérébrale (imagerie par résonance magnétique) avec injection d'un agent de contraste est l'examen radiologique de référence pour orienter le diagnostic de LCP et en suivre l'évolution. Mais cette technique d'imagerie n'est pas optimale. Différentes tumeurs cérébrales peuvent se présenter avec le même type d'images IRM. A ce jour, la biopsie cérébrale reste indispensable pour établir le diagnostic de LCP. Parfois, cette biopsie n'est pas possible. De plus, l'IRM ne peut montrer que les lésions tumorales les plus importantes, sans rendre compte de l'infiltration cérébrale diffuse des LCP. Il est donc nécessaire de mettre au point une technique d'imagerie non invasive et spécifique du LCP, qui permettrait d'établir un diagnostic fiable au stade initial et de suivre la progression tumorale afin de mieux ajuster le traitement à la réponse aux traitements.

Des études récentes ont démontré l'intérêt d'une molécule dérivée du glucose (FDG) dans la détection initiale du LCP, par imagerie TEP (tomographie par émission de positons). Mais le FDG n'est pas spécifique des tissus lymphoïdes et ne différencie pas le lymphome de l'inflammation, ni des autres tumeurs cérébrales. Nous proposons de tester un nouveau traceur, différent du FDG et, plus spécifique des lymphomes, sur des études précliniques de modèles murins de LCP. Ce traceur permettrait ainsi de différencier les lymphomes des autres tumeurs cérébrales, et de mieux évaluer la réponse thérapeutique.

Plus précisément ce projet vise à répondre aux questions suivantes :

- 1) Evaluer la sensibilité et la spécificité du traceur à détecter le LCP, en comparaison avec les imageries par TEP-FDG et IRM.
- 2) Evaluer la réponse thérapeutique par imagerie TEP avec le traceur, afin de l'utiliser comme outil pharmacodynamique.

Remplacement : Les travaux pour répondre à ces questions nécessitent d'effectuer des tests in vivo précliniques et devront utiliser des modèles murins de LCP. Les expériences in vitro ne sont donc pas pertinentes dans le cadre de cette étude. Les modèles seront générés par inoculation intracérébrale de lignée cellulaire de lymphomes humains.

En effet, la spécificité et la sensibilité du traceur seront évaluées par les données d'imagerie TEP sur nos modèles murins, in vivo.

Le suivi de la réponse thérapeutique sera évalué par l'imagerie TEP sur ce modèle, en comparant la croissance tumorale chez un même animal avant et après irradiation par rayon x pour vérifier que notre traceur détecte finement ce changement.

L'objectif de cette étude est de développer une méthode d'imagerie capable de mieux différencier les LCP des autres tumeurs cérébrales, ce qui pourrait éviter la biopsie cérébrale aux patients trop fragiles et de mieux évaluer la réponse thérapeutique en temps réel afin de mieux ajuster les traitements aux besoins des patients.

Réduction : Ce projet nécessitera l'utilisation de 47 souris. Ce nombre a été statistiquement défini pour permettre l'obtention de résultats fiables avec le moins d'animaux possible.

Raffinement : Des signes cliniques liés au développement de la tumeur sont attendus chez l'animal (perte de poids, troubles neuroaux). Une grille de score a été établie pour évaluer de façon objective l'état de l'animal et prendre les mesures adéquates pour arrêter immédiatement sa souffrance.

En accord avec les recommandations internationales dans le domaine de la cancérologie, les conditions d'hébergement des animaux seront optimisées pour limiter leur stress. De plus, ils seront suivis 5 fois par semaine afin d'assurer leur bien-être et les expérimentations seront arrêtées avant la souffrance des animaux.

19750 La recherche sur la réparation osseuse et plus particulièrement sur l'arthrodèse lombaire dans le cadre de ce projet est en constante évolution. Cette dernière s'oriente aujourd'hui vers l'utilisation d'implants dégradables et potentiellement totalement résorbables dans le corps, évitant ainsi une seconde opération pour retirer les implants après la fin de la reconstruction osseuse.

Dans le cadre de ce type d'implantation et comme le souligne la réglementation (ex : directive 2007/47/CE, règlement 2017/745, 21 CFR 820...), il est impératif de démontrer la sécurité, l'efficacité ainsi que la performance des dispositifs médicaux afin de réduire au minimum le risque pour le patient. A l'heure actuelle, seuls les modèles d'études in vivo permettent de couvrir l'ensemble des risques toxiques incombant aux dispositifs médicaux implantables et d'en tester intégralement l'efficacité et la tolérance locale. Sans méthode alternative, l'expérimentation animale est donc nécessaire dans le cadre de cette démonstration. L'expérimentation animal permet de modéliser de manière fiable le comportement d'un dispositif de fusion lombaire. En effet, ce comportement dépend de très nombreux facteurs tels que l'activité de l'animal, la zone de l'implantation, les tissus environnants, etc. Le modèle de fusion lombaire postérolatéral (PLF), réalisé chez le lapin, est un modèle largement décrit dans la littérature. De plus, il s'agit d'un animal couramment employé en expérimentation animale.

Ce projet a donc pour objectif d'évaluer la sécurité et la performance d'un dispositif medical sur un modèle de fusion lombaire postérolatérale chez le lapin (modèle bien décrit dans la littérature).

Dans le cadre de ce projet, le nombre d'animaux utilisé est basé sur les recommandations des textes de référence (ex : norme ISO 10993) et sur les contraintes scientifiques (ex : nombre suffisant d'animaux pour assurer la validation scientifique des études). Pour mener à bien l'évaluation de la performance de chaque dispositif médical pour un seul délai d'implantation, un maximum de 12 sites d'implantation peut être nécessaire. Pour ce projet, l'estimation maximale du nombre d'animaux utilisés sur cinq ans est donc de 390 lapins (à raison de 10 études de performance comprenant au maximum 36 individus répartis sur 3 délais d'implantation et 10 études de screening comprenant 3 individus).

Lors de ce projet, l'imagerie médicale (scanner CT) sera utilisée afin de suivre l'évolution de des sites d'implantation au cours du temps et donc de déterminer in-vivo l'évolution de la reconstruction osseuse. Cette technique présente l'avantage d'être non invasive (requiert seulement une anesthésie) et ne nécessitent pas de sacrifice d'animaux au cours de l'étude (suivi des mêmes animaux au cours du temps). Elle permet donc une diminution importante du nombre d'animaux utilisés et s'inscrit donc dans une démarche éthique de réduction du nombre d'animaux.

Les études couvertes par ce projet, bénéficieront d'une attention et de soins de qualité. Quelles que soient les études, la douleur sera rigoureusement contrôlée et proscrite grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (ex : anesthésie/analgésie). De plus, des critères d'interruption ou « points limites » seront définis avant chaque démarrage d'étude et pourront être ajustés tout au long de ces études. Un suivi clinique quotidien des animaux sera réalisé afin de détecter tout signe anormal et de prévenir de l'apparition de ces points limites permettant ainsi de prendre des mesures appropriées le plus rapidement possible.

De plus, la chirurgie sera réalisée par du personnel habilité, compétent et expérimenté (chirurgien vétérinaire), selon une procédure de chirurgie définie selon la bibliographie et selon l'expérience du

chirurgical. Puis, un suivi post-opératoire sera effectué sur chaque animal en vérifiant son état de bien-être et de santé, et en lui administrant des traitements ou soins locaux adaptés (antibiotiques pour empêcher une infection de la zone opérée, antalgique pour supprimer la douleur liée à la chirurgie, antiseptique ...).

Ce projet a donc pour objectif de caractériser le modèle PLF et d'évaluer l'innocuité /la tolérance et l'efficacité/ la performance de nouveaux traitements au cours du temps suivant les méthodes (non-exhaustives) ci-dessous :

- L'analyse par imagerie médicale
- Le suivi clinique
- Les observations macroscopiques des sites d'implantations
- La palpation manuelle
- L'analyse histopathologique des sites d'implantation.

19751 Les anticorps anti-tumeurs sont utilisés comme traitement contre le cancer pour éliminer spécifiquement les cellules cancéreuses appelées également cellules tumorales. Pour agir, les anticorps se fixent sur les cellules tumorales d'une part et sur certaines cellules sanguines spécialisées : les macrophages. Ce sont des cellules de grande taille capable de détruire les cellules tumorales recouvertes d'anticorps par un mécanisme appelé « cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps » ou ADCC. Les macrophages reconnaissent les anticorps grâce aux récepteurs Fc présents à leur surface. Il existe des récepteurs Fc activateurs, qui favorisent la destruction des cellules tumorales et des récepteurs Fc inhibiteurs, qui vont freiner l'activité des macrophages. Des expériences réalisées chez la souris montrent qu'en l'absence des récepteurs inhibiteurs, l'efficacité des anticorps anti-tumeurs est augmentée. Par ailleurs, nos données préliminaires montrent que les récepteurs Fc inhibiteurs utilisent la voie de l'autophagie pour diminuer l'activité des macrophages. L'autophagie est une voie que l'on retrouve dans toutes les cellules et qui permet de recycler les constituants intracellulaire. Cette voie est une voie très importante pour la survie des cellules, notamment en cas de stress ou d'inflammation. Elle est bénéfique pour lutter contre l'établissement de tumeurs, mais elle devient néfaste lorsque celles-ci sont établies. En effet, l'autophagie peut favoriser la résistance aux chimiothérapies anti- cancéreuses dans les cellules tumorales ou diminuer la réponse anti-tumorale des cellules immunitaires.

Notre projet a pour but de comprendre comment l'autophagie modifie l'activité des macrophages. Nous avons ainsi émis l'hypothèse selon laquelle une augmentation de l'autophagie dans les macrophages diminuerait l'efficacité des traitements anti-tumeurs alors qu'une diminution de l'autophagie dans les macrophages augmenterait l'efficacité des traitements anti-tumeurs. L'autophagie est une voie régulée par de très nombreuses protéines comme la protéine Rubicon qui freine l'autophagie ou la protéine ATG5 qui est indispensable au fonctionnement de l'autophagie.

A plus long terme, le projet pourrait ainsi permettre de proposer une solution innovante pour augmenter l'efficacité des traitements anticancéreux par anticorps.

Pour réaliser nos expériences, nous allons utiliser 3 modèles permettant d'évaluer la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps chez la souris qui ont été mis au point dans différents laboratoires depuis plusieurs années et qui sont donc bien connus. Les deux premiers modèles nécessitent l'utilisation de cellules tumorales. Le dernier est un modèle intrinsèque puisque les macrophages des souris vont se diriger contre d'autres cellules de la souris. Dans chacun des modèles, nous allons utiliser 4 groupes de souris : un groupe de souris « Rubicon-déficiente », un deuxième groupe de souris « Rubicon-contrôle », un troisième groupe de souris « ATG5-déficiente » et un dernier groupe de souris « ATG5-contrôle ». La déficience en Rubicon ou en ATG5 n'affecte pas le bien-être des souris, c'est pourquoi, nous avons décidé de réaliser nos expériences en utilisant ces souris.

Dans le premier modèle, nous allons injecter par voie intraveineuse dans la veine de la queue des cellules tumorales au quatre groupes de souris vigiles. Ensuite, nous allons injecter aux souris un

anticorps qui reconnaît les cellules tumorales. Les injections seront faites en intra-péritonéales, tous les deux jours pendant 11 jours, soit un total de 5 injections. Après l'inoculation de la tumeur, les souris seront surveillées pendant 11 jours et ensuite euthanasiées pour pouvoir analyser les tumeurs qui sont présentes sous formes de taches noires à la surface des poumons, leur infiltration par des cellules du système immunitaire et les caractéristiques de ces cellules.

Dans un second modèle, nous allons injecter dans le péritoine un autre type de cellules tumorales aux quatre mêmes groupes de souris vigiles. Ensuite, nous allons traiter les souris une fois en injectant par voie intra-péritonéale un anticorps qui reconnaît ces cellules tumorales. Les souris seront surveillées quotidiennement et deux jours après l'inoculation de la tumeur, elles seront euthanasiées pour récolter et analyser les tumeurs.

Dans le troisième modèle, nous allons injecter par voie intraveineuse, toujours dans les quatre groupes de souris, un anticorps qui reconnaît un type de cellules immunitaires chez la souris, les lymphocytes B. Le jour suivant, les souris seront anesthésiées afin de prélever 50 microlitres du sang et ensuite elles seront euthanasiées. Certains organes seront prélevés afin de déterminer le nombre de lymphocytes B dans ces différents organes.

Notre projet aura une durée expérimentale maximale de 4 ans et il sera utilisé 360 animaux. De plus, notre approche expérimentale est en adéquation avec la démarche éthique européenne appliquée à l'expérimentation animale (la règle des 3R Remplacer, Réduire, Raffiner) :

Remplacer : il est impossible d'évaluer l'effet thérapeutique d'anticorps sur un modèle in vitro. Aucun modèle cellulaire ne permet de reproduire la complexité d'une tumeur, l'infiltration de la masse tumorale par les macrophages et le traitement avec l'anticorps thérapeutique. Seul le modèle animal permet de conduire ce projet.

Réduire : nous avons besoin d'effectuer trois expériences indépendantes, pour chacun des trois modèles. Chacune des expériences nécessite 10 souris par groupe pour chacun des 4 groupes. Nous allons utiliser des souris mâles et femelles, ce qui impliquera un élevage plus petit pour obtenir le nombre de souris nécessaires. De cette façon nous réduisons le nombre d'animaux utilisés. Les souris seront âgées de 6 à 12 semaines.

Un nombre total de 360 animaux sera donc nécessaire pour le projet et l'effectif proposé ici tient compte du nombre minimal d'animaux nécessaire pour démontrer une différence statistique significative dans chacune des expériences. **Raffiner** : les animaux seront gardés en permanence en groupe, dans leurs cages habituelles, dans un milieu enrichi, avec de l'eau et de la nourriture à volonté. Ils seront surveillés quotidiennement par le personnel de l'animalerie et par les expérimentateurs, du premier au dernier jour de chaque protocole. La gestion de la douleur se fera selon une grille que nous avons établie pour évaluer les points limites à ne pas dépasser au cours de l'expérimentation. Si un des points limites est atteint, les mesures nécessaires seront prises (administration d'antidouleur ou euthanasie de l'animal). A l'issue de ces procédures, les animaux seront euthanasiés selon les protocoles appropriés, les organes récupérés et les analyses effectuées.

19752 L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie multifactorielle et chronique caractérisée par une augmentation progressive de la résistance vasculaire pulmonaire conduisant à une insuffisance du ventricule droit et à la mort. Dans l'HTAP, l'augmentation de la résistance vasculaire pulmonaire est due à une vasoconstriction excessive et un remodelage vasculaire entraînant une obstruction. Les cellules musculaires lisses vasculaires jouent un rôle central dans le développement de l'HTAP. En effet ces cellules sont impliquées dans la vasoconstriction ainsi que dans le remodelage du lit vasculaire des artères pulmonaires. La protéine Rac1 est impliquée dans la régulation de la prolifération, de la contraction et de la migration de ces cellules.

C'est pourquoi cette étude vise à étudier le rôle de la protéine Rac1 dans les cellules musculaires lisses au cours de l'HTAP.

Les modèles animaux d'HTAP permettent l'étude des différents mécanismes physiopathologiques impliqués dans le développement de cette pathologie. Le modèle murin d'HTAP induite par une

hypoxie chronique (exposition 10% d'oxygène pendant 4 semaines) est actuellement le modèle de référence pour reproduire la pathologie humaine.

Afin d'étudier le rôle de Rac1 dans les cellules musculaires lisses au cours du développement de l'HTAP, des souris délétées du gène Rac1 spécifiquement dans les cellules musculaires lisses (SM-Rac1-KO) seront utilisées. Ainsi, les souris SM-Rac1-KO et contrôles seront soumises à deux conditions expérimentales : normoxie et hypoxie chronique pendant 4 semaines. Chaque lot expérimental sera constitué de 4 groupes : 10 souris contrôles normoxiques, 10 souris SM-Rac1-KO normoxiques, 10 souris contrôles hypoxiques et 10 souris SM-Rac1-KO hypoxiques.

Un lot sera utilisé pour identifier l'impact de la délétion de Rac1 sur le remodelage vasculaire pulmonaire et un deuxième lot permettra d'analyser l'effet de Rac1 sur la pression artérielle pulmonaire.

Remplacer : Le développement de l'HTAP est un processus complexe engageant des interactions entre différents tissus de l'organisme. Le remplacement du modèle animal par une autre approche expérimentale est actuellement impossible.

Réduire : Nous utiliserons au maximum 80 souris pour réaliser cette étude avec 10 souris par groupe en raison de la variabilité inter-individuelle et pour pouvoir analyser statistiquement nos données.

Raffinement : Les animaux seront observés quotidiennement par des personnes expérimentées afin d'assurer le bien-être des animaux et détecter toute souffrance. Afin de réduire la douleur des animaux des anesthésiques et analgésiques appropriés seront utilisés en fonction de la procédure réalisée. De plus des points limites adaptés et des critères d'arrêt sont établis pour chaque procédure (cf. 4. 2. 1, 4. 2. 2, 4. 2. 3) afin de réduire au maximum la souffrance des animaux. Les cages des animaux sont enrichies avec des frisottis.

Cette étude répondra aux questions posées par des reviewers suite à la soumission d'un article dans un journal scientifique international.

19753 L'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) est classée en danger critique d'extinction depuis 2008 par l'UICN (Union Internationale pour la Conservation de la Nature). Actuellement, l'origine et la quantité des anguilles argentées qui contribuent au stock reproducteur restent inconnues. Le stade argenté de l'anguille constitue son dernier stade de vie en milieu continental et signale son départ imminent pour sa migration retour vers sa zone de reproduction de l'autre côté de l'océan Atlantique. Depuis 2007, des plans de gestion nationaux de l'anguille sont instaurés conformément au règlement européen (n°1100/2007). Le projet s'inscrit dans le cadre du plan de gestion national de l'anguille (PGA) et du plan de gestion des poissons migrateurs Rhône Méditerranée (PLAGEPOMI) qui fixent des objectifs de suivi de dévalaison de l'anguille, plus particulièrement sur les sites retenus pour suivre l'état de la population de l'anguille européenne. Ces plans y fixent des objectifs de suivis du recrutement et d'échappement. Aujourd'hui, il apparaît indispensable de mieux comprendre le déroulement de la dévalaison des anguilles vers la mer, une étape du cycle de vie qui reste d'ailleurs méconnue sur l'ensemble du bassin Rhône-Méditerranée. La compréhension de cette migration et de l'ensemble des facteurs pouvant l'influencer permettra d'adapter la gestion des usages (modalité de gestion des ouvrages de connexion, quotas et période de pêche).

La présente action s'inscrit dans un projet à but de conservation de l'anguille européenne. Il a pour objectif de suivre une sous-population en capture-marquage-recapture (CMR) et de suivre le déplacement des individus à l'aide d'un système télémétrique RFID (radio-frequency identification) au niveau d'un bassin hydrographique poldérisé (déconnecté de ses effluents naturels) qui fait l'objet d'un projet de restauration de reconnexion avec un système lagunaire. Le suivi en télémétrie RFID consiste à détecter le passage d'individus marqués avec un code alpha-numérique unique par une station d'écoute fixe. Les objectifs de ce projet sont (i) d'évaluer la connexion hydroécologique entre le bassin et ses trois systèmes adjacents, et plus particulièrement d'évaluer si les connexions actuelles permettent le transit uni- ou bi- directionnelles des anguilles argentées, (ii) d'évaluer le succès d'un projet de restauration de connexion hydroécologique, (iii) d'estimer la production d'anguilles argentées en termes d'abondance, de biomasse et de sex-ratio à l'aide de la

mise en place d'un suivi en CMR, et (iv) de caractériser les facteurs influençant la dévalaison en amont d'un système lagunaire. Afin de considérer les déplacements de l'anguille en fonction de son stade de vie (jaune ou argenté) et de la variabilité environnementale (température, salinité, précipitations, etc.), il est nécessaire de mener cette étude sur plusieurs années. En effet, une anguille femelle met en moyenne 4 à 5 ans pour devenir argentée, et parfois beaucoup plus (7-12 ans). Ce projet durera 5 années. La première année, un maximum de 450 individus seront marqués, et un maximum de 350 individus les 4 années suivantes, soit un total de 1850 individus au maximum qui seront utilisés dans le cadre de ce projet. Le marquage des individus sera réalisé en laparotomie avec un transpondeur de 23mm de longueur, il s'agit d'une intervention à impact modéré. Une procédure expérimentale est mise en oeuvre nécessitant la capture des individus à l'aide de verveux, engins de capture passifs, ou de pêche électrique, et le marquage des individus.

REDUCTION : Le milieu étudié présentant des densités d'anguilles très élevées, il sera marqué un nombre conséquent d'individus pour suivre leurs déplacements en télémétrie et obtenir des résultats robustes. En effet, le marquage d'un échantillon trop petit présente un risque élevé d'incapacité à caractériser la dynamique de dévalaison sur l'ensemble de la période (Septembre à mai) et de ne pas considérer un nombre suffisamment représentatif de la population étudiée. C'est pourquoi l'utilisation de 350 à 450 individus maximum par an semble être un bon compromis pour à la fois remplir l'objectif de cette étude tout en s'accordant avec la règle des 3R.

REMPACEMENT : L'étude portant sur le comportement de poissons en milieu naturel, l'expérimentation doit être réalisée avec des individus capturés dans le milieu, et ne peut donc s'affranchir de l'emploi de poissons sauvages.

RAFFINEMENT : Le marquage des individus s'effectue sous anesthésie (benzocaïne) et analgésie (lidocaïne). Une fois un individu marqué, il pourra être détecté en continu à trois points de passage. Le suivi RFID est un moyen de raffiner le suivi en capture-marquage-recapture, puisqu'il permet de suivre à distance le déplacement d'individus marqués (de recapturer leur signalement) sans avoir à les manipuler à nouveau.

19754 Même si l'espérance de vie augmente, la qualité de vie n'augmente pas de façon proportionnelle et le vieillissement est le premier facteur de risque de développer de nombreuses pathologies tel que les cancers, les maladies cardiovasculaires, la neurodégénérescence, les pathologies chroniques. Le vieillissement est caractérisé par une augmentation de la morbidité et un déclin fonctionnel qui peut éventuellement déboucher sur une mort de l'organisme. Il affecte différentes voies biologiques et ses mécanismes sont complexes et diverses. Ainsi comprendre les processus de vieillissement pourrait faciliter le développement de nouveaux traitements de pathologies associées à l'âge.

Les syndromes progéroïdes sont des mutations génétiques relativement rares. Ils sont définis comme une pathologie génétique humaine qui est caractérisée par une espérance de vie réduite et un développement prématuré d'altérations biologiques qui sont normalement associées à un âge avancé.

Le syndrome de Hutchinson-Gilford ou progéria est le plus sévère des syndromes progéroïdes. C'est une maladie sporadique humaine qui est causée par une mutation du gène de la lamine (LMNA). En général, les patients souffrant de progéria sont normaux à la naissance mais ont un développement altéré de la clavicule, de la mandibule et du crâne. Les premiers signes de vieillissement prématurés sont une chute de cheveux, une athérosclérose et une hyperpigmentation de la peau. Les causes fréquentes de décès sont des AVC et des maladies coronariennes. Les patients ont une espérance de vie sévèrement réduite avec une moyenne de 13 ans.

Le syndrome de Werner entraîne une mutation de gène qui vont altérer la protéine Wrn (Werner). Cette protéine est impliquée dans le métabolisme de l'ADN et le maintien de la longueur des télomères. Les signes cliniques apparaissent en général progressivement à partir de 10 ans. Les signes sont une petite taille, des cataractes, des cheveux gris ainsi qu'une perte rapide et une sclérodémie de la peau (durcissement de la peau). Il existe d'autres syndromes progéroïdes comme le syndrome de Cockayne ou la xeroderma pigmentosum.

De plus, étudier des modèles qui possèdent une longévité plus importante que leurs congénères est important afin d'identifier les mécanismes physiopathologiques liés à l'âge ainsi que les facteurs clés qui ralentissent le vieillissement.

Les modèles murins jouent un rôle clé pour comprendre les mécanismes associés au vieillissement. Ces modèles sont pertinents pour être manipulés et pour détecter des indicateurs physiologiques de ces maladies. Les modèles murins ont une espérance de vie relativement courte ce qui permet d'étudier les processus de vieillissement dans une fenêtre d'étude raisonnable. De plus, les modèles murins partagent de nombreux phénotypes liés à l'âge avec l'Homme comme l'augmentation du risque de développer certaines pathologies telles que les cancers.

Pour être valide, un modèle alternatif aux modèles animaux devrait prendre en compte l'ensemble des phénomènes biochimiques et physiologiques qui ont lieu chez l'animal. A ce jour, les tests in vitro ou les modèles informatiques ne permettent pas de rendre compte de l'ensemble de ces phénomènes. Aucune méthode alternative n'est envisageable pour reproduire le plus fidèlement les troubles liés au vieillissement et donc, étudier le potentiel effet bénéfique de nouvelles stratégies thérapeutiques.

L'objectif du présent projet est l'élevage de lignées génétiquement modifiées de rats et de souris reproduisant des pathologies associées au vieillissement. Cela permettra d'approfondir la caractérisation de ces modèles. Ultimement, ces études pourraient permettre d'identifier des substrats moléculaires et biologiques caractéristiques des troubles associés au vieillissement et de développer de nouvelles cibles thérapeutiques. Afin de satisfaire au raffinement, l'hébergement des animaux sera réalisé dans des locaux appropriés avec des conditions optimales de température et d'hygrométrie avec un cycle jour/nuit de 12h/12h. De plus, un enrichissement sera systématiquement placé dans chaque cage et le personnel sera habilité à réaliser les différentes procédures dans le respect des règles d'éthique, de bien-être animal et du principe des 3R. Les surveillances quotidiennes des animaux permettront d'identifier d'éventuels animaux en souffrance et de prendre les mesures appropriées (surveillance accrue, mise à mort dans les cas les plus graves). Le nombre d'animaux est calculé selon les protocoles expérimentaux de manière à obtenir le minimum d'animaux par groupe permettant des résultats significatifs et homogènes. Afin de constituer les différents lots expérimentaux il est estimé que sur les 5 années du projet, un total de 1200 animaux est nécessaire. Les espèces utilisées seront les souris et les rats.

19755 Le recours aux animaux à des fins scientifiques s'explique par la possibilité d'étudier un modèle de maladie semblable à la maladie développée chez l'homme et ainsi permettre de mieux comprendre le mode de fonctionnement/ développement de cette pathologie. Les modèles animaux permettent également d'étudier l'innocuité et l'effet d'une molécule, ou d'une combinaison de molécules dans un organisme entier, comportant différents systèmes (sanguin, immunitaire, nerveux, hormonal...) et appareils (digestif, respiratoire, uro-génital...) qui interagissent ensembles de façon complexe à l'échelle d'un corps. Enfin, l'efficacité de thérapies innovantes peut également être testée dans des modèles expérimentaux mimant la pathologie humaine, avant de pouvoir être transférée chez l'homme.

Les primates non-humaines (PNH) comme les porcs, de par leur proximité phylogénique, leur taille, leurs similitudes morphologique, anatomique, physiologique, métabolique et leur similitude de système immunitaire avec l'homme constituent de très bons modèles pour les études dites précliniques. Ces études arrivent en dernières phases de tout projet scientifique, quand la preuve de concept a été réalisée dans d'autres modèles in vitro, ex vivo et/ou in vivo chez d'autres espèces en répondant à différentes questions, étapes par étapes ; ces études permettent de valider les hypothèses avant de progresser chez l'homme.

Une fois les protocoles autorisés terminés, nous essayons autant que possible soit de placer les animaux, soit d'introduire les animaux dans un nouveau protocole scientifiquement et réglementairement compatible avec le précédent, dans le but de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés (3R). Cependant, la réutilisation des animaux dans de nouveaux protocoles

impose de tenir compte de la récupération de l'animal à recouvrer son état de santé et son bien-être général et de l'effet cumulé des différentes procédures.

Ces solutions n'étant pas toujours possibles pour ces diverses raisons, nous pouvons être amenés en dernier recours à euthanasier les animaux en fin de protocole. L'objectif de ce projet, qui concerne ce dernier groupe d'animaux, est de réaliser des prélèvements multi-organes et d'échantillons biologiques sous procédure complète d'anesthésie, en amont de l'euthanasie, dans des conditions similaires aux prélèvements d'organes chez l'homme.

Ces organes ainsi prélevés selon les protocoles de l'Agence de Biomédecine (ABM) pourront servir à différents test ex vivo :

- à l'apprentissage des techniques et/ou nouvelles techniques de prélèvements par les professionnelles (uniquement sur les porcs)
- à des tests ex vivo de mise sur machine de conservation d'organes
- à des tests ex vivo de perfusion sur machine dans des différentes conditions de pré-conditionnements
- à des tests ex vivo d'isolement de cellules à partir d'organes pour culture in vitro.
- à des tests ex vivo de marquage tissulaire
- à des tests ex vivo de RT-PCR quantitative de différents marqueurs biologiques spécifique d'espèce et d'organes (métaboliques, immunologiques, hormonaux, ...)
- à des partages de tissus avec la communauté scientifique.

Utiliser ces animaux permettra de ne pas racheter d'autres animaux pour les tests décrits ci-dessous et contribuera donc à la réduction du nombre d'animaux utilisé dans notre laboratoire.

Cette demande d'autorisation inclura au maximum 10 primates et 20 porcs par an soit un maximum de 150 animaux pour 5 ans. Les prélèvements seront réalisés sous procédure complète d'anesthésie et un traitement analgésique sera donné aux animaux en amont du prélèvement.

Il n'existe pas de remplacement possible pour l'obtention de ces organes, cependant l'utilisation de ces animaux répond aux exigences de réduction et de raffinement.

Les primates sont hébergés en volière de façon à respecter leur mode de vie en communauté.

Les porcs, selon leur taille et leur comportement, sont hébergés par 1, 2 ou 3 par boxes, au sein d'une même pièce.

19756 Même si l'espérance de vie augmente, la qualité de vie n'augmente pas de façon proportionnelle et le vieillissement est le premier facteur de risque de développer de nombreuses pathologies tel que les cancers, les maladies cardiovasculaires, la neurodégénérescence, les pathologies chroniques.

Le vieillissement est caractérisé par une augmentation de la morbidité et un déclin fonctionnel qui peut éventuellement déboucher sur une mort de l'organisme. Il affecte différentes voies biologiques et ses mécanismes sont complexes et diverses. Ainsi comprendre les processus de vieillissement pourrait faciliter le développement de nouveaux traitements de pathologies associées à l'âge.

Les syndromes progéroïdes sont des mutations génétiques relativement rares. Ils sont définis comme une pathologie génétique humaine qui est caractérisée par une espérance de vie réduite et un développement prématuré d'altérations biologiques qui sont normalement associées à un âge avancé.

Le syndrome de Hutchinson-Gilford ou progéria est le plus sévère des syndromes progéroïdes. C'est une maladie sporadique humaine qui est causée par une mutation du gène de la lamine (LMNA). En général, les patients souffrant de progéria sont normaux à la naissance mais ont un développement altéré de la clavicule, de la mandibule et du crâne. Les premiers signes de vieillissement prématurés sont une chute de cheveux, une athérosclérose et une hyperpigmentation de la peau. Les causes fréquentes de décès sont des AVC et des maladies coronariennes. Les patients ont une espérance de vie sévèrement réduite avec une moyenne de 13 ans.

Le syndrome de Werner entraîne une mutation de gène qui vont altérer la protéine Wrn (Werner). Cette protéine est impliquée dans le métabolisme de l'ADN et le maintien de la longueur des

télomères. Les signes cliniques apparaissent en général progressivement à partir de 10 ans. Les signes sont une petite taille, des cataractes, des cheveux gris ainsi qu'une perte rapide et une sclérodémie de la peau (durcissement de la peau). Il existe d'autres syndromes progéroïdes comme le syndrome de Cockayne ou la xeroderma pigmentosum.

De plus, étudier des modèles qui possèdent une longévité plus importante que leurs congénères est important afin d'identifier les mécanismes physiopathologiques liés à l'âge ainsi que les facteurs clés qui ralentissent le vieillissement.

Les modèles murins jouent un rôle clé pour comprendre les mécanismes associés au vieillissement. Ces modèles sont pertinents pour être manipulés et pour détecter des indicateurs physiologiques de ces maladies. Les modèles murins ont une espérance de vie relativement courte ce qui permet d'étudier les processus de vieillissement dans une fenêtre d'étude raisonnable. De plus, les modèles murins partagent de nombreux phénotypes liés à l'âge avec l'Homme comme l'augmentation du risque de développer certaines pathologies telles que les cancers.

Pour être valide, un modèle alternatif aux modèles animaux devrait prendre en compte l'ensemble des phénomènes biochimiques et physiologiques qui ont lieu chez l'animal. A ce jour, les tests in vitro ou les modèles informatiques ne permettent pas de rendre compte de l'ensemble de ces phénomènes. Aucune méthode alternative n'est envisageable pour reproduire le plus fidèlement les troubles liés au vieillissement et donc, étudier le potentiel effet bénéfique de nouvelles stratégies thérapeutiques.

L'objectif du présent projet est l'élevage de lignées génétiquement modifiées de rats et de souris reproduisant des pathologies associées au vieillissement. Cela permettra d'approfondir la caractérisation de ces modèles. Ultimement, ces études pourraient permettre d'identifier des substrats moléculaires et biologiques caractéristiques des troubles associés au vieillissement et de développer de nouvelles cibles thérapeutiques. Afin de satisfaire au raffinement, l'hébergement des animaux sera réalisé dans des locaux appropriés avec des conditions optimales de température et d'hygrométrie avec un cycle jour/nuit de 12h/12h. De plus, un enrichissement sera systématiquement placé dans chaque cage et le personnel sera habilité à réaliser les différentes procédures dans le respect des règles d'éthique, de bien-être animal et du principe des 3R. Les surveillances quotidiennes des animaux permettront d'identifier d'éventuels animaux en souffrance et de prendre les mesures appropriées (surveillance accrue, mise à mort dans les cas les plus graves). Le nombre d'animaux est calculé selon les protocoles expérimentaux de manière à obtenir le minimum d'animaux par groupe permettant des résultats significatifs et homogènes. Afin de constituer les différents lots expérimentaux il est estimé que sur les 5 années du projet, un total de 12000 animaux est nécessaire. Les espèces utilisées seront les souris et les rats.

19757 Le projet : La maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique sont des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). Leur incidence et prévalence sont fortes et en augmentation en Europe et aux Etats-Unis. Il n'existe actuellement aucun traitement curatif et les traitements disponibles sont inconstamment efficaces et suspensifs dans le meilleur des cas. D'autre part, nous ne disposons pas de biomarqueurs pronostic fiable pour prédire l'évolution de la maladie, ce qui serait pourtant extrêmement utile pour adapter les traitements de manière anticipée sans attendre la survenue des manifestations cliniques.

En se basant sur nos découvertes récentes mettant en évidence le rôle d'une bactérie de la flore intestinale sur la stimulation de cellules immunitaires anti-inflammatoires, notre objectif est d'évaluer l'efficacité d'une approche thérapeutique nouvelle en administrant ces cellules immunitaires combinée à l'administration de la bactérie d'intérêt dans un modèle de colite expérimentale. Les cellules humaines seront injectées à des souris immunodéficientes par voie intrapéritonéale ou intraveineuse et les bactéries inactivées seront administrées par gavage intragastrique afin d'activer les cellules immunitaires. Nous évaluerons ensuite le score de la maladie déterminé par le pourcentage de perte de poids, la consistance de selles et la présence de sang dans les selles ainsi que l'inflammation chez les animaux en fonction des différents traitements.

A terme, ce projet devrait permettre de mieux comprendre la physiopathologie des MICI, d'identifier de nouveaux facteurs pronostic et de nouvelles pistes thérapeutiques.

Les animaux :

* Type : Modèle de souris transgéniques immunodéficientes.

* Nombre: Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 500 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

La conformité au principe des 3R :

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

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

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

19758 Le projet : Les cellules cancéreuses se distinguent des cellules normales par l'accumulation de mutations dans leur génome. Ce phénomène est plus au moins important selon le type de tumeurs. Nous sommes intéressés à l'étude du cancer de type MSI (pour Microsatellite instable). Ces cancers surviennent à la suite de l'inactivation du système de réparation de l'ADN appelé MMR, normalement responsable de la réparation des erreurs produites pendant la réplication de l'ADN. Il est à noter que le cancer est une maladie multifactorielle en raison des nombreux facteurs génétiques, hormonaux, environnementaux, qui peuvent concourir à son déclenchement et multiphasique puisque le développement de la maladie est un phénomène prolongé dans le temps et pouvant comporter plusieurs étapes.

Le projet consiste à créer des groupes d'animaux qui développent des cancers de type MSI modélisant soit l'adénocarcinome colique et lymphome soit le glioblastome. Ces souris seront suivies pendant l'initiation et la progression de la tumorigenèse colique pour apprécier une possible augmentation de la réponse immune en présence ou en absence d'un traitement d'immunothérapie (anti PDL1, anti PD-1 et anti CD152).

L'objectif de ce projet est d'étudier les conséquences d'un traitement d'immunothérapie dans un contexte de développement tumorale MSI dans trois localisations différentes (épithélium colique, cerveau et système lymphatique). Nous voulons démontrer qu'in vivo un traitement d'immunothérapie induit une augmentation de la réponse immunitaire en ralentissant le développement des cancers MSI.

Les animaux :

* Type : Deux modèles de souris transgéniques seront utilisés dans ce projet. Le premier correspondant à un modèle murin d'adénocarcinome colique et lymphome sur fond C57BL/6n. Le second correspondant à un modèle murin de glioblastome sur fond FVB/n.

* Nombre: Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 480 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de réduction et de raffinement décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

La conformité au principe des 3R :

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

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

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

19759 Dans ce projet nous nous intéressons au lymphome T. Il s'agit d'un cancer du sang chez l'adulte pour lequel aucune stratégie thérapeutique n'a été clairement décrite et pour lequel, la survie sur 5 ans n'est que de 30%. Pour l'instant aucun traitement efficace n'existe pour ces lymphomes T. Nous utiliserons un modèle préclinique de souris qui développe un lymphome T rare équivalent à un lymphome T humain. Ce modèle de souris nous permettra pour la première fois d'évaluer de nouveaux traitements pour le lymphome T

A l'aide de modèles murins adaptés génétiquement modifiés qui développent un lymphome T nous allons évaluer l'efficacité d'une thérapie qui cible spécifiquement les cellules tumorales.

Les souris seront utilisées à un stade de lymphome installé. Les traitements seront administrés par voie intraveineuse, intrapéritonéal ou sous-cutanée.

Cette thérapie consiste à modifier certaines cellules de notre réponse immunitaire qui permettra spécifiquement de cibler les cellules tumorales dans le but de les éliminer. L'efficacité du traitement sera évaluée par détermination de cellules modifiées dans le sang et leur capacité à éliminer les cellules cancéreuses.

BENEFICE ATTENDU : La preuve d'efficacité des nouvelles thérapies anti-cancéreux nous permettra de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le cas des lymphomes T.

Conformément aux exigences de remplacement (R1), réduction (R2) et raffinement (R3), les expériences in vivo sont précédées de multiples expériences in vitro utilisant des méthodes de différenciation des cellules T mises en place au laboratoire ce qui permettra de n'utiliser que le nombre de souris strictement nécessaire (R1+R2).

Malheureusement, il n'existe à ce jour, pas d'autre alternative à l'expérimentation animale pour étudier in vivo l'efficacité d'une immunothérapie (R1). Pour réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés, tout en garantissant l'obtention de résultats robustes d'un point de vue statistique, nous avons utilisé le logiciel de prédiction statistique (GPower) (R2). De plus, les animaux transgéniques générés (mâles et femelles) seront tous utilisés et cela nous permettra de produire le nombre d'animaux strictement nécessaire (R2). Lorsque les animaux devront être traités avec deux traitements simultanément, un seule groupe témoin servira de référence. Notre plan

expérimental va permettre de réduire progressivement le nombre d'animaux : les résultats de la procédure 1 vont permettre de réduire le nombre d'animaux dans les procédures 2 et 3.

Les souris sont hébergées au maximum par 5 dans des cages de 500 cm² avec un enrichissement systématique du milieu avec du matériel de nidification et des maisonnettes (R3). De plus, toute manipulation des animaux sera effectuée par des manipulateurs expérimentés afin d'éviter tout geste susceptible de faire souffrir l'animal. Toute douleur et souffrance sera limitée par l'application de points limites précis et adaptés.

Ce projet prévoit l'utilisation de 2160 souris et est soutenu financièrement par des organismes de recherche publique.

19760 Même si l'espérance de vie augmente, la qualité de vie n'augmente pas de façon proportionnelle et le vieillissement est le premier facteur de risque de développer de nombreuses pathologies tel que les cancers, les maladies cardiovasculaires, la neurodégénérescence, les pathologies chroniques. Le vieillissement est caractérisé par une augmentation de la morbidité et un déclin fonctionnel qui peut éventuellement déboucher sur une mort de l'organisme. Il affecte différentes voies biologiques et ses mécanismes sont complexes et divers. Ainsi comprendre les processus de vieillissement pourrait faciliter le développement de nouveaux traitements de pathologies associées à l'âge.

Les syndromes progéroïdes sont des mutations génétiques relativement rares. Ils sont définis comme une pathologie génétique humaine qui est caractérisée par une espérance de vie réduite et un développement prématuré d'altérations biologiques qui sont normalement associées à un âge avancé.

Le syndrome de Hutchinson-Gilford ou progéria est le plus sévère des syndromes progéroïdes. C'est une maladie sporadique humaine qui est causée par une mutation du gène de la lamine (LMNA). En général, les patients souffrant de progéria sont normaux à la naissance mais ont un développement altéré de la clavicule, de la mandibule et du crâne. Les premiers signes de vieillissement prématurés sont une chute de cheveux, une athérosclérose et une hyperpigmentation de la peau. Les causes fréquentes de décès sont des AVC et des maladies coronariennes. Les patients ont une espérance de vie sévèrement réduite avec une moyenne de 13 ans.

Le syndrome de Werner entraîne une mutation de gène qui vont altérer la protéine Wrn (Werner). Cette protéine est impliquée dans le métabolisme de l'ADN et le maintien de la longueur des télomères. Les signes cliniques apparaissent en général progressivement à partir de 10 ans. Les signes sont une petite taille, des cataractes, des cheveux gris ainsi qu'une perte rapide et une sclérodermie de la peau (durcissement de la peau). Il existe d'autres syndromes progéroïdes comme le syndrome de Cockayne ou la xeroderma pigmentosum.

De plus, étudier des modèles qui possèdent une longévité plus importante que leurs congénères est important afin d'identifier les mécanismes physiopathologiques liés à l'âge ainsi que les facteurs clés qui ralentissent le vieillissement.

Les modèles murins jouent un rôle clé pour comprendre les mécanismes associés au vieillissement. Ces modèles sont pertinents pour être manipulés et pour détecter des indicateurs physiologiques de ces maladies. Les modèles murins ont une espérance de vie relativement courte ce qui permet d'étudier les processus de vieillissement dans une fenêtre d'étude raisonnable. De plus, les modèles murins partagent de nombreux phénotypes liés à l'âge avec l'Homme comme l'augmentation du risque de développer certaines pathologies telles que les cancers.

Pour être valide, un modèle alternatif aux modèles animaux devrait prendre en compte l'ensemble des phénomènes biochimiques et physiologiques qui ont lieu chez l'animal. A ce jour, les tests *in vitro* ou les modèles informatiques ne permettent pas de rendre compte de l'ensemble de ces phénomènes. Aucune méthode alternative n'est envisageable pour reproduire le plus fidèlement les troubles liés au vieillissement et donc, étudier le potentiel effet bénéfique de nouvelles stratégies thérapeutiques.

L'objectif du présent projet est l'élevage de lignées génétiquement modifiées de rats et de souris reproduisant des pathologies associées au vieillissement. Cela permettra d'approfondir la caractérisation de ces modèles. Ultimement, ces études pourraient permettre d'identifier des

substrats moléculaires et biologiques caractéristiques des troubles associés au vieillissement et de développer de nouvelles cibles thérapeutiques. Afin de satisfaire au raffinement, l'hébergement des animaux sera réalisé dans des locaux appropriés avec des conditions optimales de température et d'hygrométrie avec un cycle jour/nuit de 12h/12h. De plus, un enrichissement sera systématiquement placé dans chaque cage et le personnel sera habilité à réaliser les différentes procédures dans le respect des règles d'éthique, de bien-être animal et du principe des 3R. Les surveillances quotidiennes des animaux permettront d'identifier d'éventuels animaux en souffrance et de prendre les mesures appropriées (surveillance accrue, mise à mort dans les cas les plus graves). Le nombre d'animaux est calculé selon les protocoles expérimentaux de manière à obtenir le minimum d'animaux par groupe permettant des résultats significatifs et homogènes. Afin de constituer les différents lots expérimentaux il est estimé que sur les 5 années du projet, un total de 12000 animaux est nécessaire. Les espèces utilisées seront les souris et les rats.

19761 Les fonctions cognitives, sensibles et motrices sont assurées par un système de propagation rapide permis par la présence de la gaine de myéline autour des axones. Le processus de formation de cette gaine, appelée myélinisation est hautement régulé. Il est composé de plusieurs étapes distinctes telles que la prolifération, la migration, et la différenciation, d'une population de cellules nommées oligodendrocytes. Des études ont mis en évidence l'implication de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) dans la survie des oligodendrocytes. Les travaux menés sur son effet au cours des processus de myélinisation ont été restreints aux étapes de prolifération et de migration des oligodendrocytes ; et l'influence du tPA sur les processus de différenciation de la lignée oligodendrocytaire et sur l'étape de formation et d'enroulement de la gaine de myéline sont en cours d'étude.

Les premières données préliminaires ont pu montrer :

- i) un retard de la différenciation des cellules oligodendrocytaires,
- ii) un défaut de la compaction de la gaine de myéline dans un modèle de souris déficientes en tPA (tPA knock-out).

Cependant les répercussions fonctionnelles dans ce modèle n'ont pas encore été étudiés. De même le(s) mécanisme(s) et la/les voie(s) où le tPA pourrait être impliqué n'ont pas encore été identifiés. Le but de ce projet est donc de mieux comprendre l'implication du tPA dans les processus de formation de la gaine de myéline, d'identifier le(s) mécanisme(s) impliqué(s) et d'évaluer les répercussions fonctionnelles d'une mauvaise formation de la gaine de myéline.

Pour ce faire, nous utiliserons deux modèles de souris wild-types (tPA wild-type et Null wild-type) et déficientes pour le tPA de manière constitutive (tPA knock-out et Null tPA).

De plus, afin de mieux comprendre les mécanismes d'action du tPA au cours des processus de myélinisation et de ses incidences, une seconde partie du projet consistera à utiliser un modèle de souris déficientes en tPA de manière conditionnelle (tPA^{fl/fl}) et ce dans un type cellulaire précis au sein de la lignée oligodendrocytaire (CNP-Cre). Dans chacune des conditions, les animaux seront récupérés à différents stades pré- et post-nataux et des analyses in vivo et en ex vivo seront réalisées.

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

La souris est l'espèce animale la plus étudiée dans le domaine du développement. La communauté scientifique dispose pour ces études d'un modèle animal permettant de suivre les processus de myélinisation. L'ensemble des connaissances et des acquis dont nous disposons au laboratoire et dans la littérature grâce à ce modèle rend la souris particulièrement intéressante pour notre étude. Notre projet ne nous permet pas d'utiliser d'autres moyens que l'expérimentation animale. Avant de procéder à une telle étude, nous nous assurons d'utiliser le nombre minimal d'animaux adéquat pour atteindre le résultat souhaité. Ainsi, les procédures expérimentales décrites dans ce projet ont un caractère de stricte nécessité et ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes

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

Les principes éthiques et les standards de raffinement sont utilisés pendant tout le projet. Les animaux sont hébergés dans des cages standards aux normes européennes. Le bien-être des animaux est contrôlé 7j/7 par du personnel qualifié. Les animaux seront anesthésiés durant les mesures électrophysiologiques. L'ensemble des connaissances et des acquis dont nous disposons au laboratoire montre que les animaux se déplacent et s'alimentent normalement, prennent bien soin de leur pelage, n'émettent aucun son et ne présentent aucun trouble du comportement lié à la pathologie.

En prenant en compte ces recommandations, un total de 1296 souris sera utilisé lors de ce projet.

19762 Les maladies neurodéveloppementales (telles que les troubles du déficit intellectuel, les troubles de l'attention et de l'hyperactivité ou les troubles du spectre autistique) touchent environ 2 à 6 % des enfants. Une meilleure compréhension des bases neurobiologiques de ces troubles est cruciale pour la gestion de leurs symptômes et pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques ciblant les mécanismes sous-jacents à ces pathologies. L'objectif de notre étude est de développer de nouveaux biomarqueurs physiologiques liés aux problèmes de traitement de l'information par le système nerveux, chez des animaux modèles de troubles neurodéveloppementaux, en vue de proposer éventuellement, de manière raisonnée, un traitement ciblant ces altérations. Pour réaliser nos études, nous utiliserons plusieurs modèles génétiques (souris transgéniques) reproduisant les modifications génétiques et les symptômes comportementaux associés à cette pathologie chez l'homme. Pour mener notre étude, nous utilisons une approche d'électrophysiologie in vivo réalisée sur des souris anesthésiées, et des tâches comportementales, en combinaison avec l'administration de certaines molécules potentiellement thérapeutiques. Pour mener à bien ce projet à fort impact pré-clinique, le modèle animal est essentiel.

Conformément à la directive européenne, et au principe des 3R, nous avons réfléchi à l'exécution de notre programme expérimental et nous avons mis en place de nombreuses mesures pour minimiser le nombre d'animaux utilisés et la souffrance imposée. Raffinement : Les animaux sont hébergés de manière adaptée à leurs besoins (hébergement en cages collectives, fourniture de matériel pour la construction du nid) et font l'objet d'un suivi quotidien et de soins appropriés (par exemple, anesthésie, analgésie, stratégies d'évitement de la souffrance, etc). Remplacement : notre projet porte sur l'étude des altérations neurobiologiques liées aux troubles cognitifs / comportementaux dans des modèles de maladies neurodéveloppementales. Conformément aux études menées chez l'homme, l'utilisation de systèmes complexes, entiers et intacts est nécessaire à la réalisation des objectifs scientifiques de notre étude. Le remplacement par des animaux de moindre sensibilité, par exemple la mouche du vinaigre, n'est pas possible car ils ne possèdent pas la structure cérébrale adéquate. Le remplacement de nos études par des essais cliniques réalisés sur des sujets humains n'est pas possible car il s'agit d'une population fragile et que l'atteinte de nos objectifs scientifiques nécessite des approches invasives. Par ailleurs, pour certains aspects de notre étude, notamment l'administration de molécules thérapeutiques, nous effectuons également des tests complémentaires sur des modèles in vitro. Réduction : Nous avons réfléchi à nos expériences de manière à minimiser le nombre d'animaux nécessaires à l'exploitation statistique des résultats. Nous avons estimé le nombre total d'animaux nécessaires à ce projet crucial à 2000 animaux. Le bénéfice attendu de notre projet est une meilleure compréhension des mécanismes biologiques qui sous-tendent ces maladies et, à long terme, la possibilité de proposer de nouveaux traitements pharmacologiques ciblant ces altérations.

19763 Les coûts de production et de purification des biomédicaments, en général produits par des lignées cellulaires, sont très élevés et leurs modes de production à échelle industrielle sont les plus polluants de la pharmacopée occidentale en termes de bilan carbone et de consommation d'eau. Les coûts des biomédicaments sont donc particulièrement élevés financièrement et en termes de gestion de risques lorsqu'ils sont utilisés dans le traitement de maladies chroniques comme les

maladies rhumatoïdes et les maladies auto-immunes. Ces maladies concernent 8 millions de patients en Europe, dans un contexte général où 18 à 30% de personnes seraient potentiellement porteuses d'une maladie chronique en Europe. Par exemple, un patient souffrant d'arthrite rhumatoïde qui est traité à l'étanercept recevra une injection de ce produit tous les 4 à 5 jours, à raison de 350 € par injection.

Une alternative à la bioproduction industrielle des biomédicaments est de faire produire ces protéines directement par certains tissus d'un patient. Idéalement, cette expression s'effectue au niveau de tissus dans lesquels les cellules sont définitivement différenciées, ne se divisent pas, et sont capables de fortement exprimer une protéine puis de l'excréter dans le système circulatoire. Ce profil idéal correspond à celui des cellules musculaires.

Le concept de ce projet est ainsi d'injecter dans le muscle un complexe d'ADN pour faire produire à un ou plusieurs muscles un biomédicament, l'étanercept, qui sera excrété du muscle vers le système sanguin. Ces complexes ADN (aussi appelé Nanotaxi) permettent d'invalider ou de surexprimer un gène d'intérêt et présentent de nombreux avantages. A la différence d'autres approches, ils sont efficaces dans de nombreux tissus et surtout chez la plupart des vertébrés. Comme ils n'impliquent pas d'agents viraux, ces complexes sont plus faciles d'utilisation et n'ont pas d'effet inflammatoire. Nous souhaitons donc tester si l'injection de ces complexes dans le muscle peut être une technique efficace pour à terme faire produire de façon stable un biomédicament par un ou plusieurs muscles d'un patient.

Dans un souci du bien-être animal, notre protocole expérimental s'inscrit dans le respect de la règle des 3R :

- Remplacement : Notre démarche expérimentale vise à induire la production de l'étanercept par des cellules musculaires et à un taux de 2ug/mL dans la circulation sanguine. Dans ce contexte, notre étude adopte une approche de physiologie intégrative à l'échelle de l'individu qui ne peut donc pas être réalisée ex vivo ou par le biais de culture cellulaire.

- Réduction : notre protocole expérimental a été mis en place de sorte à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. S'agissant d'une étude pilote, le nombre d'animaux employé a aussi été réduit à un seul sexe afin de réduire la taille des groupes expérimentaux (36 rats à raison de 6 groupes avec 6 animaux par groupe). La durée d'expérimentation sur chaque animal a également été réduite, ainsi que les volumes et fréquences des prélèvements sanguins.

- Raffinement : les animaux impliqués dans cette étude sont élevés dans les conditions d'élevage classiques dans des cages en présence d'enrichissement (de type carton, pour la mise en place d'un nid, petite cabane en carton, morceaux de bois. . .). Les expériences sont menées dans les plus courts délais possibles afin de minimiser tout inconfort ou stress. De plus, les animaux seront visités au moins une fois par jour avec contact direct ou non (sans réalisation de procédure), permettant une habitude de l'animal à l'expérimentateur et un suivi du bien être des animaux et ainsi l'amélioration des conditions d'élevage.

19764 L'audition est la fonction qui permet de percevoir les sons grâce à l'oreille et aux voies nerveuses de l'audition.

Le but de ce projet est d'évaluer la tolérance locale et systémique après l'administration d'une solution nettoyante dans l'oreille de chiens suivant deux protocoles d'administration différents : l'un en l'appliquant la solution nettoyante trois fois par semaine pendant trois semaines et l'autre en l'appliquant la solution nettoyante une fois par jour pendant deux semaines.

Les avantages de ce projet seraient d'avoir une solution nettoyante efficace et bien tolérée par l'animal sans qu'il y ait de problème au niveau tissulaire (local) où plus généraux (type neurologique).

Dans ce projet, 16 chiens males seront inclus. Les animaux seront répartis aléatoirement en deux groupes. Dans le premier groupe, une lotion nettoyante sera appliquée trois fois par semaine pendant 3 semaines soit 9 applications au total. Dans le second groupe, une lotion sera appliquée 1 fois par jour pendant 2 semaines soit 14 applications au total. Dans chaque groupe les animaux recevront soit une solution de contrôle, soit une solution test. Les solutions seront appliquées

aléatoirement dans l'oreille droite ou gauche et suivant l'un ou l'autre des protocoles. Les animaux seront observés quotidiennement. Des examens neurologiques seront réalisés 1 fois par semaine par un vétérinaire. Tout animal présentant une atteinte neurologique sera immédiatement retiré de l'étude.

Un examen vidéo-otoscopique (observations, photos. . .) et des prélèvements de cérumen seront également effectués sur tous les chiens par un vétérinaire une fois par semaine. Des contrôles otoscopiques seront réalisés de manière complémentaire deux fois par semaine par un vétérinaire. Des prélèvements sanguins seront aussi réalisés pour contrôler les paramètres hématobiologiques et biochimiques afin de s'assurer du bon état de santé général des animaux.

Les prélèvements sanguins et les différents tests seront toujours réalisés conformément à la réglementation en vigueur et aux bonnes pratiques vétérinaires.

Dans ce projet, 17 chiens seront inclus, 16 animaux administrés et 1 animal réserve si besoin. Ce nombre d'animaux et le nombre minimal pour avoir des résultats interprétables en tenant compte de la variabilité des résultats attendus. Aucune méthode alternative ne permet actuellement de reproduire les signes de tolérance, il est donc indispensable de recourir à l'animal dans son ensemble.

Les animaux seront hébergés par groupe. Une attention particulière sera apportée à l'enrichissement du milieu avec apport de jouet.

Un suivi quotidien (voire plusieurs fois par jour) sera mis en place pour l'observation générale des animaux et la détection précoce de signe clinique pour une prise en charge rapide d'éventuels effets secondaires.

Toute intervention sur l'animal sera effectuée par une personne habilitée et expérimentée afin de réduire au minimum le stress.

Au total, 17 animaux pourront être utilisés en 1 an dans ce projet.

19765 Le principe de la perfusion intracardiaque est d'utiliser le système vasculaire pour délivrer des fixateurs ou solutions physiologiques au sein d'un tissu d'intérêt afin de le préserver rapidement et uniformément. L'anoxie précipite immédiatement une cascade d'événements entraînant la nécrose des neurones et du neuropile. En conséquence, la prise en charge rapide de l'organe est nécessaire. Immerger des tissus directement dans une solution fixatrice ou physiologique est efficace pour de petits échantillons. Pour le cerveau de souris (510 mm³), la solution ne pénètre pas tout l'organe à la même vitesse, ainsi la viabilité, la préservation morphologique et l'antigénicité des protéines peuvent être altérés. Il est donc nécessaire de perfuser l'animal pour préserver l'intégrité et/ou la viabilité du tissu cérébral murin. En fonction des expérimentateurs et des laboratoires, une controverse existe sur l'efficacité de la perfusion sous cœur arrêté ou battant (animal euthanasié ou sous anesthésie profond). Le savoir-faire et les connaissances pratiques sont relayés entre expérimentateurs et peuvent diverger suivant le laboratoire. A la vue du large spectre d'application ex vivo, il est nécessaire d'établir des protocoles clairs et spécifiques pour une qualité optimale des échantillons. L'objectif de notre étude est de déterminer et de documenter les conditions de perfusion les mieux appropriées en fonction des expérimentations post-mortem. Dans deux conditions de perfusion, l'animal sous anesthésie profonde ou euthanasié, nous étudierons les paramètres de qualités histologiques par microscopie optique et électronique ainsi que les paramètres de viabilité par électrophysiologie sur tranches. Nous établirons aussi le temps moyen de survenue de l'arrêt cardio respiratoire complet après injection d'euthanasiant chez la souris sédative. L'ensemble du projet est mis en œuvre dans l'application des 3 Rs : 1/Remplacement : ce projet vise à améliorer une procédure expérimentale sur le rongeur, l'animal ne peut être remplacé dans ce contexte. 2/Réduction : l'ensemble des expérimentations sera effectué sur une cohorte la plus faible tout en permettant de réaliser une analyse fiable des résultats. Ce projet vise à l'amélioration d'une procédure couramment utilisée en laboratoire. 3/Raffinement : ce projet est un projet de raffinement de la procédure de perfusion. En cas d'observation de la moindre douleur ou d'inconfort, les souris recevront un traitement analgésique et anti-inflammatoire, après consultation du concepteur et du vétérinaire. Si cette douleur devait persister, les animaux seraient euthanasiés

pour éviter toute souffrance. Ce projet nécessitera au maximum 82 souris, pour une durée de 2 ans.

19766 La perception de soi est un thème de recherches très étudié dans plusieurs champs disciplinaires tels que l'éthologie, l'écologie comportementale, la psychologie ou les neurosciences développementales et cognitives. La perception de soi est étudiée en exposant expérimentalement différentes espèces d'animaux à des stimuli tels que leur propre image, leur propre odeur ou leurs vocalisations. Le test du miroir qui consiste à exposer un animal à un miroir après avoir déposé une marque colorée sur une partie du corps non accessible visuellement, est la principale méthode utilisée pour étudier la reconnaissance de soi. Chez les oiseaux, les vocalisations propres à l'individu (cris et chant) sont souvent utilisées comme stimuli pour comprendre les mécanismes de codage / décodage vocal à la fois au niveau neuronal et comportemental. A ce jour, peu d'études ont pris en considération le rôle de l'expérience et du développement sur la perception de soi chez l'oiseau. Au cours de ce programme de recherches, nous souhaitons mesurer la réponse d'oiseaux à : 1) l'exposition à leur propre image reflétée dans un miroir, avec marque colorée, en présence d'un congénère familier ; 2) la diffusion de leurs propres vocalisations, en présence d'un miroir (approche multimodale de la reconnaissance du soi). A l'aide d'une procédure de double choix, nous souhaitons également mesurer leur préférence à appuyer sur un interrupteur afin de diffuser leurs propres vocalisations ou celles d'un congénère. Pour ce projet, nous utiliserons des canaris et des diamants mandarins, des deux sexes, juvéniles et adultes, pour tester à la fois les aspects développementaux et interspécifiques de la perception de soi.

Mesures prises pour le respect de la règle des 4Rs :

Remplacer : cette expérience a pour but de mesurer la perception et la reconnaissance de soi chez les oiseaux. Le Diamant Mandarin et le Canari sont les deux espèces les plus utilisées pour les recherches concernant les aspects neuro-éthologiques du chant des oiseaux (oscines). Nous utiliserons des individus issus de souches domestiquées. L'utilisation de ces deux espèces présentant des différences dans leur organisation socio-sexuelle et par extension dans leur rapport aux autres individus, amènera un éclairage sur les différences interspécifiques. Ces travaux s'inscrivent dans le cadre d'un programme d'éthologie cognitive avec une approche phylogénétique (utilisation de deux espèces d'oiseaux) et ontogénétique pour lequel l'utilisation de modèles autres que des animaux n'est pas possible.

Réduire : le nombre d'oiseaux utilisés pour chaque phase expérimentale a été calculé afin de garantir un traitement statistique correct des données (modèles linéaires généralisés). Au total, 204 individus seront utilisés : 120 diamants mandarins (72 mâles et 48 femelles) et 84 canaris (36 mâles et 48 femelles).

Raffiner : différentes mesures seront prises pour réduire le stress au cours des expériences. Pour certaines procédures expérimentales, en dehors des phases de test, les oiseaux pourront interagir visuellement et vocalement avec leurs congénères. Une inspection visuelle par les chercheurs et les animaliers sera effectuée régulièrement au cours de l'expérience. En cas de détection de stress ou d'inconfort, l'oiseau sera retiré de l'expérience. Un oiseau ébouriffé, une absence de mobilité, de nutrition et de vigilance sont des signes de stress détectables qui entraîneront l'exclusion d'un oiseau de l'expérience. Cette décision sera prise par les membres de la Structure Bien Etre Animal (SBEA) de l'université sous contrôle du vétérinaire référent.

Replacer : à la fin des expériences, les oiseaux ne seront pas euthanasiés. Ils seront placés dans un sanctuaire agréé pour l'accueil d'oiseaux de laboratoire.

19767 La sclérodémie systémique (ScS) est une maladie complexe et généralisée des artérioles, des microvaisseaux et du tissu conjonctif. Elle se caractérise par une fibrose et une raréfaction vasculaire ou une anomalie des petits vaisseaux qui irriguent certains tissus comme la peau, l'extrémité des membres et certains organes tels que les poumons, le cœur, le rein et l'appareil digestif.

Les sclérodermies font partie des maladies auto-immunes pour lesquelles il n'y a pas de cause parfaitement connue. Dans cette pathologie, le système immunitaire fabrique des anticorps contre les propres constituants de l'organisme. Dans le cas de la sclérodermie systémique, le système immunitaire contribue à l'activation de cellules appelées fibroblastes, qui produisent en quantité trop importante du collagène. Le collagène est un ensemble de protéines fibreuses qui dans ce cas modifie la structure des vaisseaux sanguins et tissus qui composent les organes, provoquant ainsi la fibrose.

Les manifestations cardiaques sont fréquentes chez les patients atteints de sclérodermie (environ 15% à 35% des malades). Lorsque la fibrose du cœur est plus étendue, elle peut provoquer une baisse de la capacité du cœur à se contracter normalement (insuffisance cardiaque). Ceci peut occasionner de la fatigue, de l'essoufflement lors d'efforts physiques ou même au repos, des palpitations et du gonflement indolore (enflure ou œdème) des pieds et des jambes.

Quand la fibrose touche les poumons, on parle de pneumopathie interstitielle, qui est fréquente, et parfois grave. Les petits vaisseaux artériels se contractent et ont une paroi épaissie, ce qui gêne la circulation du sang. Ces anomalies vasculaires sont responsables du phénomène de Raynaud, de certaines ulcérations digitales, de l'atteinte rénale dont la survenue est probablement favorisée par les corticoïdes (crise rénale sclérodermique, rare mais parfois grave), et de l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP, qui concerne 10% des patients et qui peut être grave) quand les petites artères pulmonaires sont touchées.

La sclérodermie systémique atteint surtout les femmes et concerne 6. 500 à 10. 000 personnes en France. Comme la plupart des maladies auto-immunes, l'environnement pourrait avoir une influence sur le développement de cette pathologie même si un terrain génétique favorisant des perturbations auto-immunes peut être retrouvé dans de rares cas au sein de familles de patients.

Les mécanismes précis qui contribuent au déclenchement, à l'entretien, ou à la survenue de complications de la maladie ne sont malheureusement encore pas tous bien compris.

L'objectif de ce projet est de mettre en place un modèle chez la souris mimant le développement de la fibrose caractéristique de la pathologie humaine, afin d'évaluer l'efficacité préventive de composés sur ce phénomène et sélectionner les potentiels candidats médicaments. L'Angiotensine II est une hormone qui exerce une multitude d'actions biologiques au sein de différents organes et qui contrôle principalement la pression artérielle et le volume sanguin. L'augmentation du taux d'Angiotensine II après son administration chez la souris durant 1 à 2 mois entraîne une augmentation de la pression artérielle (hypertension artérielle) associée à une augmentation du taux de collagène (fibrose) dans les organes cibles comme le cœur, le poumon et le rein. Elle va également induire une augmentation de la taille du cœur (hypertrophie). Ce remodelage cardiaque serait également responsable de la mise en place d'une dysfonction cardiaque. Cette conséquence pathologique due à l'induction par l'angiotensine II a déjà été étudiée dans notre laboratoire dans le cadre d'un autre projet dédié à une exploration axée spécifiquement sur la dysfonction rénale et cardiaque. L'efficacité préventive des candidats médicaments sera évaluée sur les critères de fonction rénale (récolte et dosage dans les urines), fonction cardiaque (évaluations en fin d'étude sous anesthésie générale) et enfin fibrose tissulaire (dosages biochimiques dans différents organes prélevés en fin d'étude),

REMPACEMENT :

Les études in vitro permettent de travailler sur des agents induisant des fibroses spécifiquement sur des cellules cardiaques, pulmonaires ou rénales. Elles interviennent en amont des études in vivo dans des phases de sélection des candidats médicaments avant de les évaluer dans des systèmes modélisant l'ensemble des types cellulaires atteints et leurs interactions dans l'organisme des personnes malade de sclérodermie. L'induction de la fibrose cardiaque particulièrement responsable de la dysfonction cardiaque chez le rongeur est un modèle expérimental de référence pour l'étude de la sclérodermie systémique car les atteintes des organes reflètent la physiopathologie du patient, qu'il n'est donc pas possible de remplacer.

REDUCTION

La conception des designs expérimentaux de chaque étape de ce projet ainsi que les choix de nombre d'animaux par groupe sont accompagnées à chaque phase clé par le service biostatistiques afin de réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaire au projet.

Une fois le modèle validé, seuls les candidats médicaments qui auront été sélectionnés au cours des différentes étapes de recherche in vitro en amont de ce projet seront évalués.

ce modèle physiopathologique ne sera utilisé que pour des candidats traitement ayant obtenu des résultats positifs au cours de l'ensemble de ces tests permettant ainsi de réduire considérablement le nombre de mises en œuvre de ce projet.

RAFFINEMENT :

Le modèle que l'on souhaite mettre en place consiste à implanter chirurgicalement, , sous anesthésie et analgésique approprié, de manière très peu invasive sous la peau, une mini-pompe osmotique délivrant de façon continue de l'Angiotensine II pendant 1 à 2 mois. Les souris seront hébergées dans un environnement propice à l'expression de leurs besoins, interactions sociales par le maintien de groupes sociaux, apport de matériel d'enrichissement leur permettant de nidifier, ronger).

L'état général des souris ainsi que leur poids seront surveillés en post-opératoire et tout au long de l'administration d'angiotensine II et d'installation de la fibrose afin de détecter tout signe éventuel de détérioration de l'état général de l'animal.

En cas de constatation de signes de souffrance, les animaux seront euthanasiés en fonction de points limites prédéfinis.

Ce projet vise à développer un modèle de courte durée de fibrose associée à une dysfonction cardiaque et rénale comprenant une phase chirurgicale simple et peu invasive. Ce projet prévoit l'utilisation de 1160 souris sur une durée totale de 5 ans.

19768 L'embolisation est une procédure de radiologie qui consiste à injecter à l'intérieur d'un vaisseau un produit qui va occlure ce vaisseau. Le but visé est soit d'arrêter un saignement soit de dévasculariser un tissu pathologique irrigué par ce vaisseau pour rendre possible une ablation chirurgicale sans risque d'hémorragie quelque temps après l'embolisation. Plusieurs agents d'embolisation sont disponibles et peuvent notamment être classés selon leur caractère temporaire ou permanent. Les avantages des agents temporaires (résorbables) tiennent en leur élimination en quelques jours/semaines permettant de préserver les zones saines autour des lésions pathologiques ou d'effectuer une seconde injection après leur dégradation si nécessaire. Pour les agents les plus récents, synthétiques et dans lesquels on peut charger des médicaments, la durée de dégradation peut être ajustée par la composition de la particule. On peut ainsi choisir après combien de temps le vaisseau sera à nouveau ouvert ou la période pendant laquelle le médicament va être libéré.

L'objectif du projet est d'étudier la distribution, la durée de dégradation et les effets à court/moyen terme d'agents d'embolisation résorbables et non résorbables.

Les essais réalisés pourront faire partie des dossiers règlementaires pour les demandes d'autorisation de mise sur le marché aux USA et Europe.

Les tests doivent être réalisés dans les mêmes conditions que chez l'homme. Ils sont par conséquent effectués sur des animaux de grande taille (mouton). L'étude portera sur un nombre maximum de 120 animaux, pour une période de 5 ans. L'injection des produits est faite à l'aide d'un cathéter intravasculaire dans l'artère rénale, dans l'artère hépatique et utérine. Les animaux sont mis à mort à la fin de la procédure ou suivi pendant une période allant jusqu'à 28 jours après l'administration du produit test.

Principe des 3R :

- Remplacement : Un certain nombre de conditions du vivant ne peuvent être modélisées dans des systèmes in vitro : contact avec le sang, déformation des vaisseaux, réaction tissulaire et dégradation des produits, ré-ouverture des vaisseaux, ce qui implique le recours à l'animal vivant.

- Réduction : En amont, des tests in vitro de mécanique, dégradation, toxicité sur cultures de cellules sont réalisés afin de ne sélectionner que les prototypes présentant des propriétés satisfaisantes pour leur injection in vivo. Le nombre d'animaux utilisés est estimé d'après les données de la littérature, l'expérience de notre établissement et les guides règlementaires sur le nombre d'individus nécessaire pour réaliser une analyse statistique pertinente, classiquement compris entre 4 et 6 animaux par groupe de traitement. Quand c'est possible, on traite plusieurs territoires chez le même animal et on effectue plusieurs analyses sur le même animal pour diminuer le nombre total d'animaux utilisés.
- Raffinement : La procédure d'embolisation est réalisée sous anesthésie générale. Des analgésiques et des antibiotiques seront administrés systématiquement au moment des procédures et occasionnellement pendant la période de suivi de 28 jours si l'état de l'animal l'impose. Un protocole de suivi des animaux avec observation quotidienne et analyses sanguines sont utilisés pour évaluer et réduire au maximum la douleur animale, avec le respect des points limites adaptés et des critères d'arrêt bien définis. Les animaux sont logés par groupes sociaux de 3-4 individus sur lit de paille.

19769 L'insuffisance hépatique aigue (IHA) se traduit par une attaque brusque et massive du foie chez les patients. Il s'agit de situations d'urgence qui peuvent nécessiter une transplantation dans les plus brefs délais. L'IHA a dernièrement été médiatisée en décembre 2017 suite à un décès lié à une intoxication involontaire au paracétamol qui est la première cause d'IHA dans les pays industrialisés. Mais l'IHA peut aussi être la conséquence d'hépatites virales, cause prédominante dans les pays en voie de développement, ou encore d'intoxication aux champignons ou aux produits toxiques. Le paracétamol est un composé chimique utilisé comme antalgique (anti-douleur) et antipyrétique (anti-fièvre), qui figure parmi les médicaments les plus utilisés et prescrits au monde. En France, il est le médicament le plus prescrit (+ de 260 millions de doses) car il y a très peu d'alternative à l'usage du paracétamol pour le traitement de la douleur. En cas de surdose, le paracétamol provoque une sévère toxicité pour le foie par la production d'un métabolite hépatotoxique pouvant entraîner une nécrose hépatique, comme cela a été aussi démontré chez la souris. Les mécanismes de nécrose programmée par nécroptose ou par ferroptose ont été mis en évidence dans les dommages hépatiques induits par le paracétamol. Par ailleurs, l'infection par le virus murin MHV3 provoque aussi une insuffisance hépatique aigue caractérisée par une nécrose hépatique chez la souris.

Nous avons identifié au moyen de tests in vitro plusieurs molécules inhibitrices de la nécrose programmée pour lesquels un brevet a été déposé. Ces molécules pourraient constituer de nouveaux médicaments pour soigner l'IHA sachant qu'aucun traitement efficace n'est actuellement disponible chez l'homme. Afin de progresser sur la connaissance du potentiel thérapeutique de ces molécules, notre projet est d'évaluer l'effet d'inhibiteurs de nécrose programmée (inhibiteurs de la kinase RIPK1 ou de ferroptose) sur l'IHA chez la souris.

Pour cela, nous utiliserons 2 modèles d'hépatites expérimentales, (1) une exposition aigue au paracétamol, (2) l'infection par le virus murin de l'hépatite. Toutes les souris seront traitées par l'agent inducteur d'une hépatite aigue, puis traitées par les inhibiteurs de nécrose programmée (inhibiteur de RIPK1 ou de ferroptose). Des analyses quantitatives de l'atteinte hépatique seront réalisées ainsi que l'étude de marqueurs de nécrose et des cytokines pro-inflammatoires afin de caractériser une possible protection apportée par les inhibiteurs.

Ce protocole est construit en suivant la règle des 3 R, en effet :

- Le processus de l'hépatite et l'inflammation en particulier se déroulant dans l'organe en impliquant le recrutement de cellules venant d'autres parties de l'organisme, on ne peut pas envisager le remplacement par des tests in vitro.
- le nombre de souris engagés dans ces expériences (912) a été réduit au minimum pour permettre une validation des résultats statistiques
- L'étude a été raffinée au mieux en privilégiant un traitement de courte durée permettant à la fois la mesure des paramètres d'évaluation de l'hépatite et limitant le développement de douleurs et

malaise induits par le traitement. Enfin nous avons anticipé l'étude de tous les organes pertinents (4) qui permettront une étude complète de la pathologie et des molécules pour un maximum d'informations.

Cette partie expérimentale est indispensable pour caractériser l'effet des inhibiteurs de nécrose programmée et développer de nouvelles stratégies thérapeutiques de l'IHA.

19770 Au démarrage de leur lactation, les vaches laitières sont confrontées à une augmentation très importante de leur besoin physiologique en calcium due à la sécrétion d'importantes quantités de calcium dans le lait. Cette augmentation des besoins en calcium est très rapide par rapport aux processus d'adaptation de l'organisme à la lactation. Dans certains cas, ces processus d'adaptation des vaches à la lactation sont insuffisants, ce qui se traduit par une diminution pathologique de la calcémie (teneur en calcium plasmatique) après le vêlage. Cette pathologie se traduit dans sa forme clinique par une faiblesse musculaire extrême détectable par le fait que l'animal ne se lève pas, tremble ou a du mal à marcher. Elle peut entraîner la mort si l'administration d'une forme de calcium rapidement assimilable n'est pas réalisée. L'objectif de cette étude est d'estimer si les variations de la teneur en calcium du lait dans les jours qui suivent le vêlage peuvent permettre de prédire des chutes de la calcémie et donc ces difficultés d'adaptation des vaches à la lactation. Si tel était le cas, l'analyse des teneurs en Ca du lait en début de lactation pourrait être une alternative aux prises de sang pour qualifier les états d'hypocalcémie d'après vêlage. Ce serait alors un outil précieux pour concevoir des stratégies de prévention de la fièvre vitulaire sous ses formes cliniques ou subcliniques, pour mesurer des prévalences d'hypocalcémies sub-cliniques dans les jours qui suivent le vêlage ainsi que pour qualifier leurs liens avec d'autres pathologies en début de lactation. Pour ce projet, 40 vaches seront suivies pendant les deux mois qui entourent la période de vêlage pendant une première année. Ce suivi fait suite à un suivi de 20 vaches réalisé car la variabilité souhaitée n'avait pas été atteinte. Des prises de sang et de lait seront réalisés en parallèle pendant les 2 semaines qui suivent la mise-bas. L'objectif de ce projet sera de déterminer, à travers l'observation de la variabilité individuelle, s'il est possible de mettre en évidence une relation entre les dynamiques des teneurs en calcium du lait et du sang. Le choix de vaches à la fois primipares et multipares permettra de vérifier que ces relations sont généralisables selon la parité car il est établi que les problèmes d'hypocalcémie pendant les jours qui suivent le vêlage augmentent avec l'âge de l'animal.

Remplacer : Il n'est pas possible de remplacer l'utilisation d'animaux pour définir si la teneur en calcium du lait peut être un indicateur d'une pathologie de la régulation du métabolisme calcique car il n'existe pas de modèle.

Réduire : Le nombre d'animaux impliqué a été calculé d'après les données déjà acquises en 2017 et vise à obtenir une variabilité individuelle de la calcémie qui était insuffisante pour obtenir des équations de prédiction généralisable.

Raffiner : La conduite d'élevage sera respectueuse du bien-être des animaux. Un suivi régulier du comportement des animaux sera mis en place pour détecter le plus rapidement possible tout signe de souffrance ou de douleur. Des points limites adaptés ont été définis afin d'éviter au maximum toute forme de souffrance des animaux.

19771 Le sepsis est un dysfonctionnement d'organes secondaire à une réponse inflammatoire incontrôlée de l'hôte suite à une infection systémique sévère qui représente un problème majeur de santé publique. En 2017, 49 millions de cas de sepsis ont été recensés dans le monde ce qui représente environ 20% de la mortalité globale. Malgré les recherches et les travaux publiés ces dernières années, les mécanismes physiopathologiques qui conduisent à l'aggravation du sepsis et à son issue défavorable sont encore mal connus.

L'un des principaux critères de définition du choc septique est la fièvre, générée suite à une élévation des niveaux de certains médiateurs circulants grâce à un contrôle du cerveau. La fièvre est un mécanisme conservé au cours de l'évolution et sa manifestation est considérée par certaines études comme bénéfique pour lutter contre l'infection. Elle augmente en effet l'élimination des

microorganismes pathogènes, la réponse immunitaire et favorise la réponse au choc thermique. Il a été montré en outre que diminuer la fièvre pouvait aggraver les manifestations du sepsis. Dans certains cas à l'inverse, la fièvre est considérée comme délétère en cas de choc septique et doit être contrôlée. En effet, diminuer la fièvre permet de réduire la demande globale en énergie et en oxygène et de diminuer le risque d'atteinte du cerveau.

Dans ce contexte, peu d'essais cliniques intégrant un contrôle précis et continu de la température dans le sepsis sont disponibles. S'il a été rapporté que les patients présentant un choc septique et souffrant d'hypothermie ont une mortalité plus élevée que les patients souffrant de fièvre, le rôle que joue la fièvre dans le sepsis est mal compris d'un point de vue mécanistique. Ainsi son traitement reste empirique et dépendant des services de réanimation.

Le sepsis induit une mortalité très élevée qui est due à un dysfonctionnement des organes. Cette dysfonction implique une réponse inflammatoire complexe, une dérégulation immunitaire et une dysfonction endothéliale sévère des microvaisseaux irrigant l'organe. Des données récentes montrent que la température pourrait jouer un rôle majeur dans la réponse immunitaire. En revanche, le rôle que joue la température sur la cellule vasculaire reste largement inexploré.

Notre hypothèse est que la température joue un rôle protecteur important sur la fonction vasculaire en favorisant la survie des cellules vasculaires endothéliales.

Pour valider notre hypothèse nous devons utiliser un modèle expérimental chez l'animal car c'est le moyen incontournable à l'heure actuelle pour étudier de nombreux aspects de notre projet. La culture de cellules endothéliales in vitro sera réalisée en parallèle afin de tester certaines hypothèses moléculaires.

Notre étude se déroulera sur 24 mois. Nous utiliserons un modèle de péritonite chez 96 souris induit par l'injection par voie intra-péritonéale (injection IP non-douloureuse) d'une solution de fèces afin d'étudier l'inflammation et la bactériémie.

Afin de faire varier la température des animaux lors de l'induction des péritonites, toutes les souris seront placées dans une bobine d'induction générant (n=48, groupes hyperthermie) ou non (n=48, groupes contrôles) un champ magnétique finement contrôlé, permettant d'élever la température corporelle en temps réel et de manière contrôlée. Ce modèle est le seul à notre connaissance permettant de faire varier la température d'un organisme sans affecter la température environnementale et ceux de manière non inflammatoire. La température interne des souris sera évaluée en temps réel grâce à l'implantation en sous-cutanée au préalable d'une sonde téléométrique (température et mouvement) implantée à l'aide d'un trocard et sous anesthésie gazeuse (n=96). Les animaux seront maintenus en vie jusqu'à 6 jours après injection de fèces. Un prélèvement sanguin aura lieu une fois par jour le temps de l'expérience et les animaux seront euthanasiés pour prélever le sang, cerveau, foie reins, poumons, rate et cœur.

Pour ce projet, afin de respecter la règle des 3R (Remplacer-Réduire-Raffiner), nous utilisons autant que possible des lignées cellulaires en culture afin de tester nos hypothèses in vitro (Remplacement). Nous diminuerons également l'utilisation du nombre d'animaux (Réduction), par le biais d'une étude statistique déjà effectuée lors d'une étude préliminaire in vivo pour calculer le nombre d'animaux minimum nécessaire, mais suffisant pour valider notre étude. La prise en charge de la douleur se fera dès le début de l'expérience et durant toute sa période par l'administration d'analgésiques. Si la douleur venait à persister et/ou s'amplifier, et si l'atteinte des points limites était constatée, cela entraînerait l'euthanasie des animaux. Les animaux seront surveillés quotidiennement afin de vérifier le bien-être des animaux et la présence de signes de souffrances grâce à la mise en place d'une grille de scoring (Raffinement).

19772 Les tumeurs cérébrales constituent la première cause de mortalité et de morbidité par cancer chez l'enfant. Actuellement, la durée de survie moyenne après diagnostic d'un patient atteint d'un gliome infiltrant du tronc cérébral (DIPG) est de 9 mois.

Ces tumeurs se situent majoritairement dans une zone profonde du cerveau, elles ne forment pas de masse tumorale distincte mais infiltrent les structures cérébrales normales puis se disséminent dans la majorité du cerveau (formation fréquente de métastase intracrânienne). Elles ne répondent

également à aucun traitement que sont la chimiothérapie et la radiothérapie. Ces tumeurs sont donc inopérables et incurables.

Les DIPGs constituent à ce jour, un des plus grands défis en cancérologie pédiatrique.

Récemment, nous avons pu identifier, au moyen de modèles cellulaires dérivés des patients au diagnostic un gène potentiellement responsable de la capacité accrue des cellules tumorales de certains patients à infiltrer et à former des métastases. Nos analyses sur les tumeurs de patients confirment que ce gène est plus fortement exprimé chez les patients ayant développé des métastases au cours de la maladie.

Le rôle de ce gène a été confirmé par de tests fonctionnels d'invasion en 3D sur nos modèles cellulaires de DIPG. En effet, lors de différentes expériences utilisant des ARN interférent (shARN) ciblant ce gène identifié, nous avons observé une diminution de la motilité de ces cellules. Afin de confirmer l'importance du rôle de celui-ci dans l'invasion tumorale et la formation de métastases, mais aussi d'améliorer la prise en charge de la maladie chez les patients, il est nécessaire d'étudier le rôle de ce gène dans un contexte physiologique tel que le cerveau murin.

Lors d'études vivo antérieures, nous avons pu développer des modèles de souris greffées représentatifs des tumeurs de patients atteints de DIPG (caractère invasif, caractéristiques cliniques, etc.).

Dans cette étude, nous injecterons sous anesthésie générale des cellules tumorales dans le cerveau de nos souris. Ces cellules auront été préalablement modifiées pour exprimer des marqueurs de bioluminescence et de fluorescence ainsi que le shARN atténuant l'expression du gène. L'évolution de la pathologie sera suivie toutes les deux semaines par imagerie, cette méthode est non invasive.

Les animaux seront sacrifiés en deux temps : un temps intermédiaire (valeur de bioluminescence moyenne) et en point final (valeur de bioluminescence maximale supportée par les animaux) pour évaluer l'invasion des cellules tumorales dans le cerveau, à l'aide de la fluorescence des cellules humaines. Nous nous attendons dans cette étude à une différence de profil d'invasion entre les souris contrôle et les souris avec shARN mais aussi entre le temps intermédiaire et le point final.

Nous espérons que l'inhibition de la fonction de ce gène chez les patients réduise la capacité de ces tumeurs à infiltrer en rendant la radiothérapie plus efficace chez les patients atteints de DIPGs.

Les groupes expérimentaux seront constitués d'un minimum d'animaux assurant la fiabilité des résultats en termes de statistiques. Nous aurons 3 groupes de souris : lot témoin greffés avec des cellules non modifiées, lot shARN contrôle et lot shARN-BMP7. Chaque lot sera composé de 9 souris par point cinétique soit 3 groupes*2 points cinétiques * 9 souris = 54 animaux par modèle.

Dans le cas où nous aurions une réponse positive sur le modèle testé, nous confirmerons les résultats sur un deuxième. ($54*2 = 108$ animaux sur 2 ans).

Les souris seront observées au minimum 3 fois par semaine. Pour limiter le stress des animaux, ils seront hébergés en groupe (minimum deux au cas échéant) avec des éléments d'enrichissement permettant la nidification. Pour limiter les douleurs, des points limites précoces ont été établis (apparition de symptômes neurologiques, modification de l'état général, fort signal à l'imagerie, perte de poids >10% en 24h) et l'euthanasie des animaux sera effectuée dès l'apparition des premiers signes cliniques qui sont irréversibles.

19773 Face aux enjeux économiques, environnementaux et sociétaux que doit relever l'élevage laitier, le pilotage de l'alimentation est une des clés majeures d'adaptation du système. En particulier, viser une meilleure valorisation de la ration offerte aux animaux, autrement appelée efficacité alimentaire, permet de maximiser la production tout en minimisant les intrants (ex : concentrés) et en réduisant le plus souvent les coûts d'alimentation et les impacts sur l'environnement. De nombreuses études scientifiques ont pour objectif de mesurer cette efficacité d'utilisation des nutriments, en particulier celle de l'azote qui est un élément essentiel et distribué en grande quantité dans les rations des vaches laitières. L'efficacité azotée d'un animal est le ratio entre l'azote exporté vers les produits (lait, viande) et celui provenant des apports alimentaires. L'efficacité dépend des

caractéristiques de l'animal et de la composition de sa ration. Chez la vache laitière, cette efficacité est le plus souvent comprise entre 20 et 35%. Elle diminue fortement lorsque l'azote apporté par la ration est supérieur aux besoins, l'azote excédentaire étant excrété via les déjections (en particulier l'urine) à l'origine d'impacts sur l'environnement (émissions d'ammoniac, lessivage des nitrates...). A l'inverse, une baisse des apports azotés réduit peu la production laitière et les matières protéiques excrétées dans le lait mais entraîne une baisse importante de la quantité d'azote urinaire, en particulier sous forme uréique, réduisant les rejets polluants dans l'environnement. L'étude de l'efficacité azotée (mais également de tout autre nutriment) et la compréhension des conséquences des stratégies d'alimentation sur les rejets d'azote vers l'environnement nécessitent la mesure de bilans complets des flux d'azote à l'échelle de l'animal (ingestion, excrétion dans le lait, l'urine et les fèces). Du fait de la plus grande facilité de mesure, les connaissances des déterminants de cette efficacité sont le plus souvent issues de travaux réalisés sur des vaches nourries à l'auge, en conditions contrôlées. Ces études permettent de mesurer précisément les quantités ingérées et la production laitière des animaux et de collecter les effluents de manière complète et séparée (urine d'un côté, fèces de l'autre) pour en mesurer les quantités et en étudier la composition précise.

Les protocoles de bilans tels que réalisés de façon standard dans les fermes expérimentales impliquent ainsi de coller un dispositif de collecte d'urine sur l'arrière train des vaches laitières, permettant de diriger les flux urinaires vers un bidon, alors que les fèces tombent dans un collecteur séparé placé à l'arrière des vaches (à l'attache le temps des mesures). Ce dispositif doit rester en place et permettre une étanchéité totale durant les 4 à 5 jours successifs de collecte que nécessitent ces études pour des bilans précis. Actuellement, la colle utilisée est une colle néoprène à forte adhérence. Elle est appliquée à la fois sur le dispositif à coller et directement sur la peau des vaches (préalablement rasée et nettoyée) et montre une très bonne tenue durant les mesures. Le dispositif est ensuite retiré en fin de période de mesures et l'opération peut être à nouveau répétée 2 (minimum pour laisser le temps à la peau de cicatriser le cas échéant) à 3 semaines plus tard pour une nouvelle période de mesure. Bien que les collecteurs soient bien supportés par les vaches durant les mesures, il semble que la pose de la colle soit un moment inconfortable, de même que le retrait des dispositifs. C'est pourquoi ce projet propose de tester des colles alternatives, utilisées couramment par les vétérinaires, probablement mieux supportées par les animaux, pour en évaluer l'efficacité en conditions réelles de mesures. Différents modes de retrait seront également testés (immédiat versus après repousse des poils).

Nous proposons de mettre en place une expérimentation pour comparer 4 colles sur 4 vaches laitières, si possible de conformations différentes, pour en tester la praticité et l'efficacité pour la pose et la tenue des dispositifs, durant 4 périodes de 3 semaines. Chaque période sera composée de 5 jours de collecte en conditions réelles (mais sans pesée des effluents collectés) suivis de 16 jours sans collecte. La tenue des dispositifs et la qualité des collectes (non mélange des urines et fèces) seront suivies au quotidien. Les dispositifs seront retirés soit immédiatement soit après un temps de repousse des poils (mais en gardant un temps suffisant avant une nouvelle pose du dispositif pour laisser la peau respirer, probablement autour de 7 jours). Des observations comportementales permettront d'évaluer le potentiel inconfort des vaches au moment de la pose et du retrait.

Ces essais respecteront la règle des 3R : Remplacer : Il n'est pas possible de remplacer l'utilisation d'animaux pour étudier les flux d'azote à l'échelle de l'animal, incluant des mécanismes de recyclage/mobilisation notamment au sein du rumen et par la salive. Cette étude méthodologique doit donc logiquement être réalisée sur animaux en conditions réelles. Réduire : Seulement 4 vaches laitières seront utilisées pour ce projet, nombre minimum pour tester 4 colles selon un carré latin (chaque vache recevra chaque colle dans un ordre différent). Raffiner : L'objectif de cette étude méthodologique est justement de raffiner les méthodes de collectes urinaire et fécale pour la mise en place d'essais futurs moins inconfortables pour les animaux. La conduite d'élevage sera conforme aux règles d'élevage en vigueur. Un suivi régulier du comportement des animaux sera mis en place pour détecter le plus rapidement possible tout signe de souffrance ou de douleur. Des points limites adaptés ont été définis afin d'éviter au maximum toute forme de souffrance des animaux.

19774 Contexte et objectif du projet : Nous étudions la physiopathologie de maladies génétiques neurologiques avec un intérêt particulier pour les troubles du spectre de l'autisme (TSA). Les TSA constituent un ensemble hétérogène d'anomalies neuro-développementales précoces, défini cliniquement par des déficits d'interaction sociale et de communication, associés à un répertoire de comportements restreints et stéréotypés. Nous nous intéressons à un gène qui apparaît aujourd'hui comme un gène de susceptibilité majeur pour le développement de la pathologie. L'objectif général de notre travail est de mieux comprendre le rôle de ce gène dans le développement du cerveau et d'éclaircir les mécanismes physiopathologiques impliqués dans les TSA, notamment en interaction avec l'environnement.

Modalités de mise en œuvre :

Nous utilisons trois modèles de souris transgéniques. Nous réalisons :

- Des interventions chirurgicales chez les femelles gestantes, permettant d'étudier l'implication du gène dans les étapes précoces de développement du cerveau (étapes embryonnaires) ;
- Le traitement des souris avec un agent neurotoxique pour investiguer l'implication du gène dans des étapes plus tardives de développement du cerveau (étapes post-natales) ;
- Des analyses morphologiques de tissus (cerveaux, nerfs) à différents stades de développement, qui nécessitent de réaliser des perfusions intracardiaques pour fixer les tissus ;
- Des tests comportementaux non invasifs visant à mettre en évidence des défauts cognitifs et moteurs chez les souris mutantes adultes ;
- Le traitement de femelles gestantes avec un médicament connu pour augmenter le risque relatif de TSA chez les enfants exposés in utero, ceci afin d'étudier l'impact de ce médicament sur la descendance (morphologie des cerveaux et comportement).

Ce projet utilisera un maximum de 2666 souris sur 5 ans.

Conformité éthique et 3 R :

- Remplacer

Les questions que nous posons dans ce projet concernent des aspects très intégrés sur l'influence de mutations au niveau d'un gène sur le développement du cerveau et les conséquences sur les fonctions cognitives. Une partie de notre projet est réalisé in vitro (biochimie et biologie cellulaire) ; nous utilisons des lignées cellulaires et des cellules souches embryonnaires afin de limiter le nombre d'animaux. Mais pour des raisons scientifiques, ces approches restent limitées et les modèles murins sont incontournables. Le gène que nous étudions est exprimé spécifiquement dans le système nerveux et nous avons montré qu'il est essentiel pour l'établissement de connexions entre diverses régions du cerveau. Le développement de ces connexions ne peut être étudié que dans le cadre du tissu en entier. Les modèles murins pour les troubles neurodéveloppementaux présentent l'avantage de mimer assez bien le phénotype humain. Le développement du cerveau est en effet bien conservé chez la souris, surtout pour les étapes temporelles qui nous intéressent, favorisant l'identification de phénotypes robustes. De nombreux comportements intégrés, pertinents dans le cadre des TSA, peuvent en outre être étudiés chez la souris, ceci permettant d'établir une corrélation potentielle entre génétique, neurodéveloppement, environnement et pathologie.

- Réduire

Nous veillons à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés :

- 1) en combinant plusieurs approches expérimentales ; ainsi, les couples de reproduction sont réalisés de façon à ce que tous les animaux soient utilisés et répartis dans les différentes procédures ;
- 2) en optimisant au maximum les données obtenues à partir d'une expérience donnée ; à titre d'exemple, le prélèvement conjoints de différents tissus (cerveau, nerfs) nous permet d'analyser un nombre important de paramètres morphologiques à partir d'une seule souris.

D'une manière générale, nous avons conçu les lots de souris pour que soit généré le nombre optimal d'animaux compatible avec la réalisation des expériences. La transmission des mutations pour les 3 lignées de souris que nous étudions se faisant de façon mendélienne, nous sommes en mesure

de comparer des souris de type sauvage et mutantes issues de la même portée. Les TSA constituant une pathologie qui affecte de façon différentielle les mâles et les femelles, tous les animaux générés, mâles ou femelles, sont informatifs. De plus, chez la souris, la période de gestation est courte et le nombre d'embryons important, ce qui nous permet de générer un nombre d'animaux suffisant pour plusieurs expériences à partir de relativement peu de fondateurs. Nos très bonnes connaissances des protocoles nous ont par ailleurs permis d'évaluer le nombre d'animaux au plus juste pour chaque expérience, en tenant compte de l'importance de l'effet attendu pour assurer une parfaite robustesse et reproductibilité des résultats.

- Raffiner

Nos activités impliquent toujours une attention particulière sur le soin et le bien-être de l'animal. Les souris sont hébergées dans un environnement sécurisant (maison en carton/sizzle nest) et des observations du bien-être sont réalisées 1 fois/jour. Les souriceaux et jeunes animaux sont surveillés afin de s'assurer que la mère s'occupe bien d'eux. Pendant toutes nos expériences de comportement, nous prenons toutes les précautions de calme pour ne jamais stresser les animaux. Pour toutes les autres expériences, nous prenons toutes les précautions nécessaires afin d'éviter toute douleur, en utilisant des pratiques adaptées. Les interventions chirurgicales, réalisées sous anesthésie et en présence d'analgésiques, soulèvent une attention post-chirurgicale particulière (surveillance et traitement des plaies). En cas de comportements anormaux (manque de toilettage, léthargie ou manque d'intérêt pour la nourriture, stéréotypies), l'état des animaux est surveillé plusieurs fois par jour. En cas de souffrance, les animaux sont anesthésiés et euthanasiés par des méthodes adaptées.

19775 De nombreuses études chez l'homme comme chez l'animal ont montré qu'un individu soumis à un stress psychologique va présenter à la fois des troubles psychopathologiques, en particulier des symptômes d'anxiété et de dépression, et des réponses immunitaires modifiées. Toutefois, les mécanismes moléculaires et cellulaires qui sont responsables de ce phénomène n'ont été que partiellement caractérisés. De plus, alors que des situations de stress ont été largement utilisées pour étudier les interactions entre le système nerveux et le système immunitaire chez l'animal, pratiquement rien n'est connu sur l'impact d'un environnement enrichi (hébergement dans un environnement riche en stimulations sensorielles, motrices, sociales et cognitives).

Nous avons pu montrer dans des études préliminaires que l'environnement enrichi conduit à une meilleure résistance des souris face à une infection par le virus de la grippe. En revanche elles sont moins résistantes à une infection bactérienne. Cette différence de réponse immunitaire se manifeste dès les toutes premières heures de l'infection. Nous avons également pu montrer grâce à des souris transgéniques que, cette différence était dépendante de l'expression des récepteurs aux glucocorticoïdes par certaines cellules immunitaires. Les récepteurs aux glucocorticoïdes ont pour fonction principale d'inhiber la réponse immunitaire.

Le but de ce projet est d'étudier les mécanismes conduisant les souris hébergées en environnement enrichi à mieux résister à une infection virale mais moins bien à une infection bactérienne.

Plus précisément nous:

- caractériserons la réponse immunitaire vis-à-vis de molécules inflammatoires (dérivées de virus ou de bactéries) administrées par voie intranasale à des temps très précoces afin de déterminer laquelle de ces molécules induit une réponse plus efficace chez les souris élevées en environnement enrichi;

- identifierons les cellules responsables de la résistance à l'infection virale ou bactérienne par une approche consistant à éliminer ces cellules par administration d'anticorps chez des souris ayant reçu les molécules identifiées dans l'objectif ci-dessus;

- Réaliserons une analyse de l'ensemble des ARN messagers exprimés par les identifiées au point 2 à la suite de l'administration de molécules inflammatoires identifiées au point 1.

Pour les point 1 et 3, nous utiliserons des souris transgéniques n'exprimant plus le récepteur aux glucocorticoïdes dans certaines cellules immunitaires afin de déterminer si ce récepteur et bien

impliqué dans la différence de réponse inflammatoire chez des animaux hébergés en environnement enrichi par rapport aux animaux élevés en environnement standard.

Ce projet permettra de mieux comprendre l'impact du système nerveux sur la réponse immunitaire et pourrait éventuellement aider à la prise en charge des patients souffrant de pathologies liées aux infections pulmonaires.

Remplacement : Ce type d'étude ne peut être envisagé que sur des organismes entiers préservant l'intégrité des interactions entre le système immunitaire et nerveux. Cependant afin d'éviter la souffrance animale liée à des infections pulmonaires, nous nous placerons dans les toutes premières heures suivant l'infection (maximum 8h après l'infection).

Réduction : Le plan d'étude est conçu pour éviter toute répétition non nécessaire des procédures. D'autre part, en tenant compte des exigences de réduction, également imposées par la législation, nous avons choisi d'utiliser un nombre minimum de souris par groupe expérimental qui nous permet d'obtenir des résultats statistiquement exploitables. En utilisant des doses utilisées dans d'autres études, nous éviterons de réaliser une étude dose-réponse et nous réduirons ainsi d'autant le nombre d'animaux utilisés dans cette étude.

Raffinement : La sélection dans le point 1 du type de molécule inflammatoire ainsi que du timing qui induit une réponse plus efficace chez les souris hébergées en environnement enrichi permettra de raffiner les expériences réalisées dans les points 2 et 3. Par conséquent, le nombre de souris indiqué est un nombre maximum.

Enfin, des mesures seront mises en place pour réduire la douleur pendant les procédures expérimentales incluant :

- l'utilisation d'anesthésiques adaptés (injection intrapéritonéale d'un mélange Ketamine-xylazine) avant administration par voie intranasale ;
- le sacrifice des animaux par surdosage de pentobarbital ;
- un suivi rapproché des animaux sous forme d'une liste des points limites (déplacements, de la posture, du comportement et de la respiration) qui serviront de guide de conduite à tenir en cas d'effets secondaires importants.

Ces études seront réalisées sur un maximum de 2592 souris.

19776 CONTEXTE

Chez le chien, le cancer de la vessie ne représente que 2% des cancers cependant, 97% de ces tumeurs sont malignes et représentent donc un risque évident de réduction de l'espérance de vie de l'animal. Dans certains cas, la chirurgie reste obligatoire car elle permet de reconstruire certaines fonctions (uretères bouchés. . .). Dans les autres cas non métastatiques, la chirurgie pourrait être évitée par le même procédé utilisé dans le cadre de certains cancers comme le cancer de la prostate chez l'homme. En effet, un traitement de quelques minutes à base d'ultrason focalisés de haute intensité (HIFU) permet la destruction des cellules cancéreuses ciblées à l'aide d'une sonde échographique équipant le dispositif et ce, à travers la peau sans chirurgie. Les HIFU pourraient être une solution notamment pour certaines zones de la vessie difficilement accessibles à la chirurgie comme la zone d'insertion des uretères.

OBJECTIF

Il est émis l'hypothèse qu'un traitement par HIFU peut détruire la tumeur sans causer de dommages aux tissus environnants (muscle de l'abdomen, rectum, appareil reproducteur...). Les résultats de ce projet permettront ensuite de réaliser une étude clinique vétérinaire. Les retombées de ce projet pourraient également être utilisées pour l'homme dont le cancer de la vessie présente de nombreuses similitudes avec celui du chien.

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

Ce projet de recherche translationnelle sera réalisé avec 12 porcs charcutiers au cours de deux procédures (une sans réveil et une classée légère). En effet, l'anatomie de la zone abdominale basse est suffisamment similaire à celle du chien. Le traitement HIFU (réalisé sous anesthésie locale pour la prostate chez l'homme), sera réalisé sous anesthésie générale et antidouleur. Après

le traitement, les animaux seront observés pendant 7 jours. Aucune douleur n'est attendue cependant, la miction sera observée et la douleur traitée si nécessaire. Les animaux sont visités au minimum deux fois par jour.

CONFORMITE AVEC LES 3R :

Réduction

La mise au point de la technique a été réalisée sur cadavres d'animaux issus d'autres projets.

Raffinement

Les animaux bénéficieront d'une anesthésie et d'une analgésie bien adaptées et copiées sur ce qui est réalisé chez l'homme. Outre le temps que passent les techniciens avec les animaux, ces derniers sont promenés dans un espace plus grand que ceux de leur cage de façon régulière.

Remplacement

Toute la mise au point du traitement HIFU a été préalablement réalisée sur des gels simulant du tissu, des pièces de foie ou de vessie issues de cadavres d'animaux d'autres projets.

19777 Le syndrome d'apnées du sommeil (SAS) est le trouble respiratoire nocturne le plus fréquent dans la population. Il est associé à de nombreuses autres pathologies, parmi lesquelles les pathologies cardiovasculaires comme l'hypertension ou l'infarctus du myocarde. Il touche 5 à 20% de la population et est un facteur de risque indépendant de la survenue d'évènements cardiovasculaires fatals et non fatals. Si le traitement actuel de référence du SAS semble fonctionner lorsqu'il est bien toléré, il apparaît essentiel de comprendre les mécanismes à l'origine de ces pathologies associées dans le but de proposer des compléments ou des alternatives thérapeutiques à ce traitement.

Le SAS est caractérisé par plusieurs composantes dont l'hypoxie intermittente (HI) chronique, connue pour avoir le plus fort impact en termes de conséquences délétères cardiovasculaires et métaboliques. Ainsi, nous nous intéressons aux complications cardiométaboliques du SAS induites par l'HI chronique lors de l'ischémie-reperfusion (IR) myocardique, une technique mimant l'infarctus du myocarde chez l'Homme, et du développement de l'insulinorésistance, dans le but d'étudier les nombreux mécanismes susceptibles d'expliquer la mort cellulaire induite par l'HI chronique au cours de l'ischémie et de la reperfusion et les dysfonctionnements métaboliques associés au manque d'oxygène intermittent chronique.

Le présent projet a pour but de déterminer les mécanismes métaboliques et cellulaires induits par l'HI 1) pendant l'ischémie et la reperfusion, et 2) au cours du développement de l'insulinorésistance. Pour étudier ces mécanismes, nous utiliserons également un mimétique de l'hypoxie à savoir le chlorure de cobalt.

Ce projet nécessitera 432 souris, témoins et transgéniques dont les caractéristiques correspondent à nos besoins, et mettra en œuvre des modèles expérimentaux in vivo et in vitro. Nous exposerons les animaux à la normoxie ou à l'HI. A l'issue de ce protocole d'exposition, certains animaux seront soumis à une ischémie cardiaque seule, soit à une IR cardiaque, pour étudier l'effet de l'HI sur la cinétique de mort cellulaire et la susceptibilité à l'IR myocardique. D'autres animaux seront mis à mort pour étudier les mécanismes induits par l'HI d'un point de vue mitochondrial, métabolique et cellulaire dans différents organes, via des techniques in vitro de biologie moléculaire. Nous étudierons également ces mécanismes chez des animaux non exposés à l'HI ou à la N, mais injectés au chlorure de cobalt (mimant les effets de l'hypoxie).

Nous avons choisi de travailler avec des souris exposées à la normoxie ou à l'HI pour plusieurs raisons. L'utilisation d'un modèle murin est encouragée par nos travaux précédents dans lesquels nous avons reproduit les conséquences délétères du SAS et aussi parce que la souris nous permet de tester nos hypothèses à l'aide d'absence d'expression de certains gènes (animaux transgéniques). Tous les échantillons seront conservés de façon optimale dans le but de pérenniser notre matériel de travail. Le choix des techniques est varié et nous sommes dans l'obligation d'utiliser diverses techniques (in vivo et in vitro) pour tester nos hypothèses très mécanistiques.

Nous avons veillé à respecter au maximum la règle des 3R. Pour notre projet nous ne pouvons pas « remplacer » ce modèle animal par un autre modèle cellulaire puisqu'il n'existe aucune méthode

alternative à l'expérimentation animale nous permettant de comprendre l'effet de l'HI chronique sur les organes et l'organisme entier. En revanche, suite à des travaux antérieurs, nous avons « réduit » au maximum le nombre d'effectif par groupe pour observer des éventuelles différences significatives. Nous utiliserons un logiciel statistique pour réaliser des tests adaptés aux paramètres à évaluer. Enfin le « raffinement » consiste en un hébergement selon les règles de bien-être animal dans une animalerie adaptée et autorisée, avec eau et nourriture à volonté, et enrichissements à leur disposition dans les cages (sauf pendant l'exposition à la N/Hi). Les animaux seront toujours manipulés après une semaine minimum de stabulation dans l'animalerie. Ils seront observés quotidiennement dans leur cage pendant toute la durée de l'hébergement et du protocole d'hypoxie, pesés au moins une fois par semaine, pour veiller à leur bien-être, à leur état de santé et à l'atteinte des points limites ; les critères d'arrêt et la décision d'exclure un animal d'une procédure sera prise par le responsable du projet. Pour toutes les procédures qui le nécessitent, les animaux seront sous anesthésie générale ; les antalgiques ne seront pas utilisés car les animaux ne seront pas réveillés. D'un point de vue scientifique, ce travail permettra de mieux comprendre la physiopathologie du SAS dans le cadre de l'infarctus du myocarde et de l'insulinorésistance, en vue de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques aux patients apnéiques à risque cardiovasculaire élevé.

19778 Contexte : Cinq millions de personnes dans le monde ont un déficit sévère de la parole suite à des traumatismes ou lésions vasculaires, ou des maladies neurodégénératives (e. g. , Parkinson, Alzheimer, Huntington). L'objectif des interfaces cerveau-machine pour la parole (BCI parole), est de permettre à certaines personnes de communiquer à nouveau grâce au contrôle d'un synthétiseur vocal à partir de leur activité cérébrale enregistrée à l'aide d'implants cérébraux.

Objectifs :

Afin d'optimiser les BCIs parole, ce projet vise à mieux comprendre la dynamique cérébrale sous-tendant la production de vocalisations (objectif 1) et à valider de nouvelles générations d'implants corticaux permettant de stimuler et d'enregistrer plus finement et de manière plus stable l'activité cérébrale sur le long terme avant leur utilisation en clinique chez l'homme (objectif 2). Plus spécifiquement, ces deux objectifs sont les suivants :

Objectif 1 : Étude des bases corticales de la vocalisation chez le miniporc

Les BCIs parole chez l'homme utilisent des algorithmes qui nécessitent d'avoir identifié les caractéristiques pertinentes des signaux cérébraux en lien avec la production vocale. L'objectif 1 du projet est de préciser finement cette dynamique chez le miniporc en comportement, en couvrant de manière extensive le cortex avec des implants à haute densité. Cela permettra d'extraire des caractéristiques des activités liées au contrôle volontaire de vocalisations, qui pourront alors servir de références pour le décodage de la parole chez l'homme. Deux types de dispositifs seront implantés : des implants commerciaux et de nouveaux implants développés pour mieux enregistrer et stimuler les zones cérébrales. Pour cela, un maximum de 40 animaux sur 5 ans seront utilisés.

En parallèle, nous préciserons les voies anatomo-fonctionnelles sous-tendant cette dynamique par différentes approches d'imagerie anatomiques et fonctionnelles par IRM, ainsi que par des marquages de fibres neuronales avec des traceurs fluorescents. Ce travail permettra d'élargir les connaissances des voies neuronales chez le porc encore très largement inexplorées et de mieux identifier les zones corticales d'implantation. Afin de limiter autant que possible le nombre d'animaux utilisés dans cet axe neuroanatomique, pour la partie ex-vivo, nous prélèverons le cerveau de minipigs implantés. Toutefois, pour finaliser les résultats obtenus, il sera nécessaire d'utiliser des animaux dédiés afin de prélever leurs cerveaux intacts pour certaines imageries anatomiques par IRM.

Objectif 2 : Validation préclinique de nouveaux implants corticaux

Le deuxième objectif du projet vise à valider sur plusieurs mois la performance d'enregistrement/stimulation et la biocompatibilité de nouveaux implants cérébraux. Dans le cas où de nouveaux matériaux non déjà utilisés dans des systèmes implantables, les biocompatibilité et toxicité des implants seront tout d'abord testées in-vitro sur lignée cellulaire et également in-vivo chez le rat. Les tests prévus chez le miniporc dans la présente étude viendront à la fin du processus

d'évaluation préclinique de manière à obtenir une validation dans un modèle animal le plus proche possible de l'homme avant une étude translationnelle en situation clinique. Il en sera de même pour l'évaluation de leur performance : les implants auront tout d'abord été évalués in-vitro en termes de bruit et impédances intrinsèques, puis chez le rat. A noter que ces tests chez le rat ont déjà reçu l'approbation ministérielle et ne font donc pas partie de la présente demande. Les tests chez le miniporc correspondant à la présente demande viseront à déterminer la performance des implants et leur acceptabilité par le tissu cérébral dans une situation la plus proche de celle de l'homme. Notamment : 1) contrairement au rat, le porc comme l'homme est très sensible aux infections, ce qui permet d'inclure la problématique de l'efficacité et compatibilité de différents tests de stérilisation, et 2) le cerveau de miniporc est sujet à des mouvements importants qui permettront de valider la stabilité des implants développés. La plupart de ces tests seront combinés avec les expérimentations réalisées dans le cadre de l'objectif 1 pour minimiser le nombre global d'animaux utilisés.

Minimisation des préjudices pour l'animal :

- Nombre (au maximum 60 sur 5 ans pour les 2 objectifs) : les tests seront strictement limités aux effectifs nécessaires pour s'assurer de la reproductibilité statistique des résultats.
- Justification de l'espèce : Le modèle de miniporc est beaucoup plus pertinent que le modèle rat pour plusieurs raisons : anatomie et taille du cerveau plus proche de celle de l'homme ; contraintes similaires à l'homme en termes de chirurgie d'implantation, d'hygiène et de biocompatibilité ; facilité de travailler en comportement avec un grand nombre de vocalisations produites de manière spontanée ; alternative éthique au Primate Non Humain.
- Réduction : Autant que possible les mêmes animaux seront utilisés pour les deux objectifs. Les nouveaux implants seront testés pour préciser la dynamique corticale de la vocalisation et les cerveaux prélevés pour les études de biocompatibilité seront dans la mesure du possible utilisés au préalable en imagerie anatomique.
- Remplacement : Nous chercherons à replacer les animaux ne nécessitant pas le prélèvement de leur cerveau dans des centres d'accueils.
- Raffinement : les animaux seront hébergés en groupe. Les zones de stabulation seront enrichies (ballons, chaînes suspendues, musique, jouets...). Lorsque les miniporcs devront être temporairement isolés après la pose des implants, ils resteront plusieurs dans la même pièce avec des barrières transparentes permettant interactions et communication. Des visites quotidiennes seront réalisées de manière à surveiller le comportement des animaux et détecter d'éventuels symptômes de douleur ou de mal-être. Dans ce cas, un vétérinaire référent sera averti et des mesures identifiées prises pour atténuer la douleur et en traiter la cause (traitement analgésique, et/ou anti-inflammatoire, et/ou antibiotique). Pour faire l'imagerie, les animaux seront transférés au centre d'imagerie en voiture sous l'anesthésie générale.

19779 L'hémophilie A est une maladie hémorragique rare affectant principalement les hommes. Il s'agit d'une maladie génétique et le gène affecté est celui du facteur VIII (FVIII), une protéine jouant un rôle crucial dans la cascade de la coagulation sanguine. Il existe plusieurs types d'hémophilie A (mineure, modérée et sévère) en fonction du taux résiduel du FVIII. L'hémophilie A sévère est due à une absence totale de FVIII et si la maladie n'est pas traitée, l'espérance de vie est en moyenne de 15 ans. Jusqu'à maintenant, le traitement standard de l'hémophilie A sévère reposait sur l'injection intraveineuse régulière (3 fois/semaine) de la protéine de FVIII purifiée. Ce traitement est coûteux, contraignant, à durée de vie limitée, avec une probabilité élevée de développer des inhibiteurs (30% des patients) et 70% des patients hémophiles dans le monde n'ont pas accès à cette thérapie. Des nouvelles stratégies sont en développement pour répondre à ces limites. L'une des plus prometteuse est la thérapie génique utilisant des vecteurs viraux. Malgré ses succès, des limites d'utilisation existent encore dans ces produits pionniers d'une révolution dans le traitement des maladies génétiques. Parmi les obstacles principaux au succès total de cette approche il y a le taux d'expression de la protéine d'intérêt ou thérapeutique, ici le FVIII, qui n'est pas toujours produite en quantité suffisante pour assurer une coagulation normale à l'individu. De plus, il y a une grande

variabilité dans le taux d'expression du FVIII d'un individu à l'autre pour la même dose de particule virale injectée. De ce fait certains individus seront totalement protégés avec des taux de FVIII circulant normaux alors que d'autres seront certes avec des taux de FVIII supprimant les saignements spontanés mais ne garantissant pas une protection totale face à certaines situations rencontrées au cours de la vie (interventions chirurgicales même ambulatoires comme l'extraction dentaire ou pratiques de sports de contacts ou à risque de chutes). Il sera alors nécessaire de co-traiter ces individus par des traitements existants mais beaucoup moins confortables et ne protégeant l'individu que temporairement. Une autre limite aux vecteurs viraux actuellement développés en phases cliniques est qu'ils ne garantissent pas une expression infinie de la protéine thérapeutique. Ce n'est donc pas un traitement définitif comme il avait été au début considéré. Malheureusement, il n'est pas (encore) possible d'effectuer une seconde injection d'une particule virale à un même individu sans provoquer une réaction immunitaire qui rejette le traitement.

Le but de ce projet est de tester une nouvelle construction virale de la société Freeline et de la comparer à une construction virale développée par une société concurrente et qui est aujourd'hui en phase clinique 3 chez l'homme. L'objectif est de déterminer si cette nouvelle thérapie est supérieure à ce qui se fait de mieux actuellement en thérapie génique en termes de 1) longévité d'expression du transgène (le FVIII) dans le temps, 2) taux d'expression du FVIII, 3) homogénéité des taux d'expression d'un individu à l'autre pour une même dose de particules virales injectées, 4) bien-être de l'individu après traitement. Plusieurs paramètres seront mesurés : 1) les taux d'expression du FVIII induits par ces particules virales; 2) la durée d'expression du FVIII induits par thérapie génique par ces particules virales ; 3) l'efficacité des particules virales à restaurer la coagulation ; 4) l'effet du traitement sur la survie et le bien-être de l'individu.

Remplacer : Le système de la coagulation est complexe, faisant intervenir de nombreux acteurs sanguins, autant des molécules procoagulantes que leurs inhibiteurs mais aussi des phospholipides membranaires, différents types cellulaires, le flux sanguin etc. . . Actuellement les tests disponibles in vitro, même s'ils se sont beaucoup améliorés depuis quelques années, ne permettent pas de reproduire l'intégralité de ce processus. De plus, il est difficile aussi d'apprécier in vitro les effets que peuvent avoir la thérapie génique à particules virales sur un organisme en entier notamment en ce qui concerne son bien-être, sa survie. Il est donc crucial de pouvoir tester leur effet dans un modèle animal d'hémophilie A, ici la souris.

Réduire : le nombre d'animaux nécessaire à l'ensemble de l'étude a été défini pour chaque procédure de façon à avoir une réponse statiquement analysable sur tous les paramètres mesurés. Les mêmes souris permettront de mesurer différents paramètres : taux d'expression du FVIII, durée d'expression du FVIII, efficacité du traitement à restaurer la coagulation, effet du traitement sur le bien-être et sur la survie de l'animal, sur le bilan de cellules sanguines. Nous prévoyons d'utiliser 90 souris déficientes en FVIII pour ce projet.

Raffinement : Les procédures utilisées se feront dans le cadre adapté d'un hébergement agréé, respectant au maximum le bien-être des animaux avec des groupes sociaux stables sans isolement, un accès à volonté à la nourriture et à la boisson. Les animaux bénéficieront d'un enrichissement du milieu : morceaux de bois à ronger, filaments de papier kraft pour faire un nid, mezzanine en alternance avec balcons tous les changements de cage pour améliorer la vie sociale et le bien-être animal sur une période qui est prévue de s'étendre à 52 semaines, en limitant la souffrance par le respect des méthodes anesthésiques et analgésiques. Les animaux seront suivis individuellement et ils seront obligatoirement euthanasiés aux points limites définis dans la procédure. L'anesthésie générale sera induite dès la sortie du groupe afin d'éviter tout stress. L'ensemble des expériences sera effectué par une personne habilitée à expérimenter sur animaux.

19780 Caractérisation du métabolisme énergétique et de la flexibilité métabolique de souris sur différents fonds génétiques par un outil non-invasif et complètement automatisé. Cette étude à destination des chercheurs permettra de mieux appréhender les caractères de chaque lignée au regard des particularités de la thématique de recherche du chercheur.

L'étude des physiopathologies dans le contexte des maladies métaboliques (diabète, obésité, troubles du comportement alimentaire, maladies cardiovasculaires et les cancers) nécessite

d'évaluer les composantes de la balance énergétique qui comprennent ; le comportement spontanée de l'animal (rythmes journaliers, activité, repos), la prise alimentaire (quantitatif et qualitatif), la dépense énergétique (la dépense pour le maintien de la température corporelle, le métabolisme de base et l'activité musculaire).

Il est important aussi d'évaluer la flexibilité métabolique, qui se définit comme la capacité de l'organisme à, d'une part s'adapter au besoin énergétique suite à une modification environnementale tel que la température, l'accès à et le type de nourriture, et de l'autre à mobiliser et utiliser ses réserves en sucres ou en lipides.

La plateforme d'analyse métabolique est composée d'un système de calorimétrie indirecte, un outil qui permet de calculer la dépense énergétique en mesurant la consommation d'oxygène inspiré et la consommation de dioxyde de carbone expiré dans la cage. Il comprend 16 cages identiques aux cages d'hébergement placées dans une armoire environnementale ventilée de manière à contrôler et modifier les paramètres environnementaux (température, les cycles jour/nuit).

Des capteurs placés dans le couvercle de la cage et à l'extérieur permettent pour chaque animal individualisé la mesure en temps réel de :

- La prise alimentaire et hydrique
- La mesure de la consommation d'oxygène et la production de dioxyde de carbone
- La mesure du quotient respiratoire
- La dépense énergétique globale de l'animal issue de l'activité locomotrice, de la thermogénèse et du métabolisme de base
- L'activité locomotrice spontanée et la mesure fine des déplacements dans les 3 dimensions.

La caractérisation des paramètres métaboliques in vivo, sera effectuée de manière non invasive et sans douleur sur des souris mâles et femelles de 13 différents fonds génétiques classiquement utilisées dans les thématiques de recherche associées aux physiopathologies comme le diabète de type 2, l'obésité, la stéatose hépatite non alcoolique (NASH) et la cachexie (associé au cancer, insuffisance cardiaque, rénale et hépatique).

Une caractérisation métabolique de 96h avec régime alimentaire équilibré à une température ambiante de 22°C sera effectuée pour chaque lignée et sur les deux sexes, suivi d'une évaluation des capacités adaptatives lors d'un changement de température et d'un changement de régime alimentaire.

En complément, nous analyserons, de manière non-invasive, la composition corporelle des rongeurs au moyen d'un scanner RMN. Ce système, rapide, ne requiert pas d'anesthésie et permet de déterminer les proportions en tissus gras, tissus maigres et fluides biologiques chez l'animal in vivo.

La finalité de cette étude répond aux questions du choix de la lignée de souris dans les thématiques de recherche développées autour du diabète, de l'obésité, de la stéatose hépatite non alcoolique (NASH) et des cancers. A notre connaissance, aucune étude comparative et d'évaluation des capacités adaptatives aux variations environnementales n'a été menée sur des fonds génétiques différents au moyen de la calorimétrie indirecte.

Lors de ces études la règle des trois R (Réduire, Raffiner, Remplacer) sera respectée de la manière suivante :

Réduire :

Le nombre d'animaux sera réduit au maximum en tenant compte des impératifs de l'analyse statistique. La lecture métabolique effectuée sur plusieurs jours permettra de réduire la variabilité intrinsèque de l'animal et inter animal, et limite le nombre d'animaux utilisés.

Raffiner :

La mesure en calorimétrie indirecte s'effectue dans des cages d'hébergement classiques qui acceptent les enrichissements de milieu communs aux animaleries. Il n'y a pas de modification de leur environnement et l'animal est libre d'exprimer son comportement d'espèce. Des points limites

et des critères d'arrêt de l'expérience ont été prévus en cas d'anomalie de comportement ou d'alimentation.

Le tout est effectué de manière automatique, de jour comme de nuit et sans intervention de l'opérateur. Au final, c'est un ensemble de plus de 30 paramètres enregistrés par minute. L'analyse ne peut se faire que sur l'animal individualisé.

Remplacer :

L'exploration du métabolisme énergétique et des comportements attenants ne peut se faire que sur un organisme entier, en raison de l'organisation et de la coopération des tissus métaboliques actifs.

Chaque étude sera réalisée sur 16 mâles et 16 femelles par lignée (13 lignées), soit un total de 416 animaux sur 5 ans.

Résumer :

Ce système permet la caractérisation métabolique de l'animal dans un milieu identique à une cage d'hébergement. Les différents paramètres évalués visent à caractériser les mécanismes biologiques de l'animal *in vivo* reliant la prise alimentaire, la balance énergétique, la capacité d'utilisation des aliments, et les comportements.

La caractérisation de ces paramètres et la comparaison entre les différentes lignées murines est un apport important à la communauté scientifique. Il permet de mieux appréhender les caractéristiques métaboliques d'une lignée en rapport avec le sujet d'étude et il recentre la perspective au niveau de l'animal dans son entier. Enfin, dans un contexte de recherche pluridisciplinaire, la caractérisation physiologique et métabolique des lignées non mutantes permettra d'éclairer le choix des chercheurs, non physiologistes, et répondre au mieux à leurs exigences scientifiques sur les caractéristiques des différentes lignées à disposition.

19781 Le syndrome de Li-Fraumeni (LFS) est une maladie autosomale dominante de prédisposition aux cancers, portée par des mutations germinales du gène tumeur suppresseur TP53. Son incidence dans la population générale est estimée à 1/5000. Les porteurs du LFS développent des cancers multiples dès le plus jeune âge. A ce jour, leur prise en charge inclue principalement un suivi par imagerie afin de détecter les cancers au plus tôt. Par contre, les analyses des mécanismes de leur prédisposition aux cancers ne sont pas encore bien élucidées. Le but de nos recherches vise à combler cette lacune, et à permettre le développement de biomarqueurs de développement tumoral et/ou de cibles thérapeutiques pour traiter ces patients.

Nos recherches utilisant des lignées de fibroblastes de patients atteints de LFS, nous ont permis de déterminer que les mutations de TP53 engendrent des défauts transcriptionnels et métaboliques, qui pourraient être à l'origine de la prédisposition aux cancers. Nous souhaitons maintenant transposer nos résultats dans un contexte physiologique, afin de déterminer l'ampleur de ces dérégulations dans différents organes murins qui sont susceptibles au développement de cancers. Le but sera d'isoler des organes avant l'âge auquel les tumeurs se développent, afin de comprendre les dérégulations précoces qui se produisent au cours de la vie des porteurs de mutations germinales de TP53. Nous réaliserons ces études sur les modèles murins de LFS R270H et R172H, qui sont des modèles LFS admis par la communauté scientifique. Le nombre d'animaux a été évalué avec un test statistique tenant compte de la variabilité expérimentale des analyses moléculaires, ainsi que la variabilité inter-individuelle des porteurs du LFS. Nous obtenons un minimum de 10 animaux par condition expérimentales, d'après les experts en transcriptomiques et métabolomiques.

Au total, nous prévoyons d'utiliser 410 animaux dans ce projet.

Nous avons pris en compte la règle des 3 R :

- Réduire : nous avons réalisé un design d'élevage et d'expérimentation qui utilise juste le bon nombre de souris, et nous plafonnons le nombre d'animaux grâce à la multiplication des tests/analyses sur un seul animal.

- Raffiner : nous tenons compte des meilleures conditions d'hébergement pour nos modèles murins et nous veillerons au bien-être animal de nos souris. Pour se faire, nous utilisons des points limites spécifiques et des critères d'arrêt de souffrance.
- Remplacer : nous avons réalisé en amont les expériences sur des modèles cellulaires pour éviter d'utiliser l'animal, mais à ce stade de nos recherches nous ne pouvons pas nous en passer car aucun moyen ne nous permet de remplacer ce modèle murin pour analyser les différents organes et la physiologie des individus porteurs du LFS.

19782 De nombreuses études présentent une corrélation entre le cancer et le surpoids ou l'obésité. Le surpoids et l'obésité favorisent le développement de plusieurs types de cancer. Ils augmenteraient le risque de cancer de l'œsophage, de l'utérus, et du rein. On estime que 3 % des cancers masculins et 6 % des cancers féminins sont liés à une surcharge pondérale. Il est donc intéressant de savoir si en modulant l'appétit, la formation de graisse et donc le surpoids et l'obésité, il est possible d'agir sur l'apparition des tumeurs. Il a été récemment montré que certaines protéines pouvaient avoir un impact sur l'appétit et être un simulateur lipogénique chez la souris. C'est pourquoi, nous aimerions comprendre l'impact de ces protéines dans la tumorigénèse mais également son impact dans les traitements anti-cancéreux comme les immunothérapies généralement utilisées. En effet, le système immunitaire est un élément crucial dans l'efficacité des différents traitements anticancéreux et il est important de connaître les modifications métaboliques qui pourraient moduler cette réponse immunitaire anti-cancéreuse. Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des expérimentations a été mis au point afin de respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement. L'utilisation d'animaux vivants est indispensable car seul un animal vivant, entier, peut permettre d'étudier la tumorigénèse, l'immunité anti tumorale et le métabolisme. Cet environnement est impossible à reproduire dans toute sa complexité et dans sa régulation in vitro ou ex vivo. Ce projet se dessine sur 5 ans et implique des études de croissance tumorale et des analyses immunologiques ex vivo. Nous utiliserons des souris immunocompétentes, immunodéficientes (systèmes immunitaires déficients) et des souris transgéniques (maximum de n. = 4608). Nous appliquerons la règle des 3 R. La règle des 3 R est un principe élaboré visant à la protection animale. Les trois « R » désignent les initiales de Remplacer (remplacer les modèles animaux par d'autres modèles lorsque cela est possible), Réduire (réduire le nombre d'animaux utilisés pour les expériences), et Raffiner (Raffiner la méthodologie utilisée, afin de supprimer, réduire, soulager la douleur ou la détresse des animaux). Les expérimentations seront regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. L'étude sera arrêtée si la procédure initiale invalide l'hypothèse de travail. Plusieurs tissus seront prélevés et soumis à diverses analyses (immunologiques, histologiques ou de biologie cellulaire et moléculaire) pour extraire le maximum de données de chaque expérimentation. Ces tissus seront également partagés avec nos collaborateurs dans le but de réduire le nombre d'animaux utilisés. Les conditions d'hébergement seront conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposeront de nourriture et d'eau ad libitum; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification). Les animaux seront observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être. La mise en place d'une grille de suivi stricte des points limites permettra d'éviter au maximum le stress et/ou la douleur au cours de l'expérimentation. De plus, le personnel impliqué dans ce projet est qualifié sur le plan technique et formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale. Il assure également une veille scientifique continue, évitant toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature.

19783 L'étude des effets pharmacologiques d'un candidat médicament sur les lymphomes non Hodgkinien vise à caractériser ses propriétés pharmacologiques sur les cancers du système immunitaires ou lymphatique. Les lymphomes non Hodgkinien sont des tumeurs malignes qui se développent lorsqu'une erreur survient au niveau de la fabrication des lymphocytes B ou T. Ces tumeurs cancéreuses se développent principalement dans les ganglions lymphatiques mais également dans d'autres organes comme les muqueuses, les intestins, la rate, le foie, les poumons, le thymus, la

moelle osseuse... Ils représentent 90% de l'ensemble des lymphomes diagnostiqué chaque année en France.

Le principe de cette technique consiste à injecter, en sous cutanée chez l'animal anesthésié, des cellules cancéreuses issues d'une espèce différente. Nous parlerons alors d'une xénogreffe. Le développement tumoral sera ensuite évalué après traitement par le candidat médicament sur plusieurs semaines en mesurant principalement la taille de la tumeur. Cette technique est très régulièrement citée dans la littérature scientifique.

Ces études sont réalisées au bénéfice des patients incorporés dans les essais cliniques ou post commercialisation pour prévenir d'éventuels effets indésirables et/ou augmenter la probabilité de tester des candidats médicaments efficaces dans les essais cliniques.

La souris est l'espèce régulièrement utilisée dans la littérature scientifique pour l'étude de nouveaux candidats médicaments sur le modèle du lymphome non Hodgkinien.

Concernant la règle des 3Rs :

- les animaux bénéficient d'un enrichissement de leur milieu d'hébergement (jouets, objets à ronger, incitation au fouissement. . .)
- le nombre d'animaux par groupe est réduit au minimum pour permettre la détection des effets recherchés par des approches statistiques optimisées.
- actuellement, il n'existe pas de méthodes alternatives permettant d'obtenir toutes les informations collectées grâce à ces études, à savoir des données relatives à l'efficacité ou aux effets secondaires de candidats médicaments en relation avec les niveaux d'exposition à ces mêmes candidats médicaments.

Les études des effets pharmacologiques de candidat médicament sur les lymphomes non Hodgkinien sont réalisées à des doses non toxiques et donc non susceptibles d'entraîner, la mort ou des signes d'intolérance marqués. Dans les cas contraires, les animaux moribonds seront mis à mort en concertation avec le vétérinaire du centre et le responsable du projet.

Les points limites pour ce projet sont :

- Amaigrissement marqué >20%
- Baisse de la température corporelle (<34°C)
- Signes sévères de douleur ou de détresse
- Un développement tumoral trop important (> à un volume de 2000 mm³)

Ce projet est classé avec un degré de sévérité modéré lié au stress généré par l'isolement des animaux en cage individuelle.

Cette étude est réalisée sur des groupes de 8-12 animaux maximum. Cet effectif par groupe correspond au nombre minimum d'animaux nécessaires permettant de révéler les effets recherchés avec la sensibilité statistique requise dans ce type d'étude.

Compte-tenu de la fréquence à laquelle ces études de recherches sont requises, le nombre d'animaux maximum pour le présent projet (5 ans) est de 150 souris.

19784 L'ostéoporose est une maladie qui fragilise les os, fréquente chez les femmes après la ménopause, mais qui peut également survenir chez des patients plus jeunes ou chez l'homme. Dans ce cas, elle est le plus souvent la conséquence d'une autre pathologie, de la prise de médicaments ou de toxiques. L'ostéoporose se traduit par une densité minérale de l'os faible, avec un risque accru de fracture. Elle résulte d'un déséquilibre entre la formation et la destruction (ou résorption) de l'os. Du fait d'un mécanisme de couplage entre la formation et la résorption osseuse, qui conduit au remodelage de l'os, la majorité des traitements de l'ostéoporose qui bloquent la résorption bloquent également la formation osseuse. Il existe un réel besoin de traitements anti-ostéoporotiques qui stimulent la formation osseuse. Dans cette optique, il semble naturel de s'intéresser à la voie Wnt, un acteur clé de la formation osseuse. Il s'agit d'une voie de signalisation cellulaire, qui permet la transmission d'un message à l'intérieur de la cellule pour moduler son action. Lorsque la protéine WNT se fixe à ses récepteurs à la surface cellulaire (appelés LRP5 et Frizzled notamment), cela

aboutit à l'activation de gènes impliqués dans la formation osseuse. L'absence ou le blocage de cette voie de signalisation induit donc une diminution de la formation osseuse. Cependant, de nombreux points restent à éclaircir concernant la régulation osseuse par la voie Wnt.

Chez l'Homme, des mutations de Lrp5 (récepteurs membranaires de la protéine WNT) ont été identifiées, notamment une mutation appelée p. Val667Met, que l'on trouve dans un syndrome appelé Ostéoporose pseudogliome (OPPG). Cette maladie est caractérisée notamment par une ostéoporose sévère et une atteinte oculaire (rétinopathie exsudative et anomalies rétiniennes vasculaires), mais qui a aussi été décelée chez des hommes jeunes atteints d'ostéoporose sans cause retrouvée. Nous avons constitué une cohorte de patients jeunes ostéoporotiques et avons pu constater que l'on trouve cette mutation à une fréquence plus élevée chez ces patients que dans la population générale. D'autres mutations de Lrp5 ont également été détectées chez ces patients. Nous avons donc formulé l'hypothèse que la mutation p. Val667Met pourrait expliquer en grande partie l'ostéoporose chez ces patients jeunes, et pourrait avoir une influence sur la façon dont ils vont répondre aux traitements anti-ostéoporotiques.

L'objectif principal de cette étude est de caractériser l'effet de cette mutation sur l'os de base et après induction d'une perte osseuse par les corticoïdes, et de tester une molécule pour le traitement anabolique de l'ostéoporose.

Nous chercherons les réponses à ces questions grâce à des expériences de culture cellulaire, mais également grâce à un modèle de souris qui porte la mutation décrite chez l'Homme et grâce à l'injection de corticoïdes qui vont mimer une ostéoporose en induisant une perte osseuse plus importante que l'ostéoporose induite par la mutation seule. En effet, les expériences in vitro ne permettent pas de mimer de façon satisfaisante le remodelage osseux en raison de multiples interactions cellulaires et tissulaires, et de l'influence de la composante mécanique, hormonale et du vieillissement intervenant dans l'ostéoporose. L'expérimentation animale a été conçue afin de respecter la règle des 3R. Le nombre de souris sera réduit au minimum nécessaire (au maximum, 144 souris seront nécessaires). Ce nombre a été calculé afin de pouvoir observer des différences significatives lors des procédures, selon les données de la littérature et l'effet des procédures attendus. Un maximum d'information sera récupéré chez l'animal (prélèvements de différents os, de sang) afin de pouvoir répondre aux différentes questions qui se poseront lors de l'étude tout en limitant le nombre d'animaux. De même, plusieurs procédures seront réalisées sur les mêmes animaux (mesure de densité minérale osseuse et phénotypage avec mise à mort). Les animaux seront maintenus par groupe de 6 par cage, nourris ad libitum, dans un environnement enrichi (matériel pour nidification). Ils seront suivis de façon rapprochée suite aux procédures, tout comportement associé à un malaise de la souris (prostration, modification du comportement, poils hérissés et ternes, hypoactivité, prostration, vocalisations, boitement) depuis plus de trois jours ainsi que des signes locaux d'inflammation (œdème, induration) seront recherchés et consignés. Si nécessaire, des injections d'antalgique par voie sous-cutanée (Buprénorphine à la dose de 50 µg/kg) ainsi que l'installation de nourriture plus accessible seront mises en place. Si ces signes persistent et que l'animal perd 20% de son poids malgré les traitements antalgiques dans la semaine qui suit, il sera alors retiré de l'expérimentation et mis à mort afin d'éviter la souffrance.

Ce projet permettra de mieux comprendre comment la mutation p. Val667Met influe sur la résistance osseuse mais également d'obtenir des enseignements sur le fonctionnement de la voie Wnt, qui a un rôle majeur dans la formation osseuse. Il permettra également de tester l'efficacité de la molécule candidate pour le traitement de l'ostéoporose. Cela pourra faciliter une prise en charge plus précise de l'ostéoporose et une meilleure adaptation des traitements.

19785 La maladie de Huntington (MH) est une préoccupation croissante en santé publique. Il n'existe encore aujourd'hui aucun traitement capable de combattre de façon efficace la progression de cette maladie.

Des nouvelles approches thérapeutiques sont essentielles pour progresser dans la prise en charge des patients. Parmi ces nouvelles approches prometteuses se trouve la thérapie génique. Elle utilise l'ADN pour soigner ou prévenir de la maladie. Selon la pathologie, cet objectif peut être atteint en délivrant aux cellules un gène à action thérapeutique (transgène) qui surexprime la protéine

déficitaire dans la maladie. Ces acides nucléiques sont le plus souvent transportés dans les cellules grâce à un vecteur viral.

Nous avons déjà la preuve de concept de notre stratégie dans des modèles murins pour la MH : l'enzyme clé du métabolisme cérébrale du cholestérol (CYP46A1) à l'aide d'un vecteur (de type AAV) dans les régions précocement atteintes par la pathologie chez des souris modèle permet de corriger les anomalies neuropathologiques et comportementales chez la souris modèle.

Le but principal de cette étude est de valider in vivo et de comparer le niveaux d'expression et de transduction les nouveaux lots d'AAV-CYP46A1 produit avec des procédés et des échèles de production différents. A la fin de l'étude les souris seront euthanasiées.

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

Réduction: Le nombre d'animaux utilisés est optimisé pour obtenir des résultats statistiques. Leur nombre (272) a été restreint au minimum indispensable de façon à obtenir des données nécessaires pour valider l'efficacité d'une stratégie thérapeutique innovante qui peut être considérée comme cible dans plusieurs maladies neurodégénératives. En effet, des travaux précédents ont permis d'établir les doses de vecteur à injecter et les temps d'analyses.

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

19786 Les avancées récentes dans notre compréhension de la régulation des fonctions des cellules immunitaires ont permis l'émergence de nouvelles immunothérapies anti-tumorales. Ainsi, plusieurs thérapies fondées sur l'utilisation d'anticorps ont montré un bénéfice clinique dans la prise en charge de plusieurs types de cancers. Néanmoins, bien que ces traitements aient permis d'améliorer la survie de certains patients, le taux de réponse reste limité notamment à cause de mécanismes développés par la tumeur pour inhiber les fonctions immunitaires et de l'hétérogénéité de l'infiltration lymphocytaire des tumeurs.

L'objectif de ce projet consiste à améliorer notre compréhension de certaines cellules immunitaires infiltrant les tumeurs ayant une activité anti-tumorale particulière. Notre programme vise à long terme à potentialiser les immunothérapies anti-cancéreuses actuelles en optimisant le recrutement des globules blancs dans les tumeurs et en dopant leurs fonctions cytotoxiques afin d'éliminer toutes les cellules tumorales. Du fait de leur rôle stratégique au sein de l'immunité dans les modèles infectieux, les cellules T mémoires peuvent être un facteur clé du modèle tumoral. En effet, certaines études montrent que des cellules immunitaires résidentes dans les tissus pourraient retarder la croissance tumorale et être un facteur clé de la réponse aux immunothérapies. Il est donc crucial d'améliorer notre compréhension de la relation entre ces cellules et la réponse aux immunothérapies.

Malheureusement à l'heure actuelle, il n'existe pas de modèle in vitro permettant de reconstruire un microenvironnement adéquat pour le développement des tumeurs qui nous permettrait d'étudier l'interaction du système immunitaire avec la tumeur. L'utilisation des souris est donc indispensable dans ce projet. Le système immunitaire de la souris est proche de celui de l'Homme, ce qui en fait un modèle pertinent et nous permet d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes immunitaires antitumoraux et protumoraux. De plus, ce type d'expérience ne peut se faire in vitro car, la mécanistique est trop complexe pour reconstruire un microenvironnement adéquat pour le développement des tumeurs et étudier l'interaction du système immunitaire avec la tumeur.

Ce projet représente un enjeu considérable pour le développement d'approches d'immunothérapies visant à éradiquer la tumeur. Nous souhaitons, comparer l'impact des immunothérapies sur les populations T mémoires retrouvées au sein de la tumeur et également étudier l'impact de CD103, un des marqueurs clé des cellules T résidentes (TRM) dans la tumeur, sur la réponse aux immunothérapies. Pour cela nous utiliserons des souris transgénique CD103KO ou des souris C57Bl/6 sauvages (WT) injectées en sous-cutanée avec des cellules des lignées tumorales cutanées ou colo-rectales. Ces souris recevront alors ou non un traitement par immunothérapie (anti-PD1 ou anti-CTLA4) administrée par voie intra-péritonéale, tous les 3-4 jours selon un plan prédéfini. Après 15 à 30 jours, en fonction du type tumoral, les procédures seront terminées. Les cellules T présentes au sein de la tumeur, du sang périphérique, de la rate et des ganglions lymphatiques drainant la tumeur seront collectés. Nous souhaitons également déterminer quel type cellulaire exprimant CD103 est responsable des effets des immunothérapies, pour cela nous transférerons des cellules CD8+ ou CD4+WT dans des souris CD103KO et compareront la pousse tumorale. Nous souhaitons également transférer des cellules CD8 CD103WT ou CD8CD103KO dans des souris CD8KO afin de déterminer si les cellules CD8+CD103+ sont les majoritairement responsable de l'effet des immunothérapies. Pour cela nous utiliserons au maximum 1440 souris sur 5 ans. Les expérimentations in vivo seront réalisées toutes les 5 semaines pour nous permettre d'analyser les résultats et de modifier le protocole suivant les résultats précédents obtenu, afin de réduire le nombre d'expérience. Les souris seront suivies continuellement pour s'assurer de leur bien-être, et des soins seront immédiatement prodigués en cas de besoin. Les souris bénéficieront d'un enrichissement environnemental permanent. Nous avons mis en place des points limites adaptés et des critères d'arrêt qui seront scrupuleusement respectés afin de s'assurer du bien-être des animaux inclu dans ces procédures.

19787 L'épilepsie mésiale du lobe temporal est la forme d'épilepsie la plus réfractaire aux traitements anti-épileptiques. En effet, cette forme d'épilepsie représente à elle seule la moitié des patients épileptiques en échec thérapeutique et 75% des patients souffrant d'une épilepsie mésiale du lobe temporal sont réfractaires aux traitements. Récemment, un nouveau candidat médicament a été développé et il a montré des effets anticonvulsivants dans des modèles de convulsions induites chez des rats sains. Ces résultats prometteurs doivent maintenant être complétés par des études visant à démontrer un effet anti-convulsivant dans un modèle validé de l'épilepsie mésiale du lobe temporal chez la souris.

L'objectif de ce projet vise à évaluer sur un modèle de l'épilepsie mésiale du lobe temporal validé si l'administration de ce nouveau candidat médicament permet de diminuer la fréquence des crises d'épilepsie. Pour répondre à cet objectif, le projet sera subdivisé en deux procédures. Dans la première procédure, trois groupes de 20 souris chacun recevront par voie orale soit l'agent contrôle neutre, soit le candidat médicament à la dose de 5 mg/kg ou de 25 mg/kg, une fois que l'épilepsie sera installée, soit 33 jours après une injection d'acide kainique dans l'hippocampe. Des électroencéphalogrammes (EEGs) seront réalisés régulièrement pour évaluer l'effet du candidat médicament sur l'activité épileptique. Dans une seconde procédure, afin d'évaluer les taux plasmatiques du candidat médicament sans contrarier les enregistrements EEG, trois groupes de 5 souris chacun seront traités avec le candidat médicament ou son solvant comme précédemment. Deux EEG seront réalisés à 30-31j post-injection pour valider le caractère épileptique des animaux. Puis deux prélèvements sanguins (100 µL) seront effectués, l'un à 35j post-injection, l'autre à 38j post-injection. Tous les animaux seront mis à mort à 45j post-injection avec prélèvement d'un second échantillon sanguin et du cerveau. L'hypothétique effet anti-crise du candidat médicament sera évalué selon l'activité EEG et mis en regard de sa concentration plasmatique. Des dosages du candidat médicaments seront également réalisés sur les prélèvements de cerveau. Ainsi, ce protocole utilisera au total 75 souris.

Concernant la règle Remplacement-Réduction-Raffinement, il n'est pas envisageable d'utiliser une approche in-vitro en remplacement de l'approche in-vivo puisque le trait évalué correspond à la réponse mettant en jeu tout un processus physiologique intégré chez un sujet respirant. La taille des échantillons est calculée pour permettre une mise en évidence d'un quelconque effet significatif

connaissant la taille de l'effet attendu dans la population parente modulée par l'expérience que nous avons du trait mesuré. Enfin notre protocole suit des procédures standardisées soucieuses de minimiser le stress et toute souffrance des animaux avec une détermination précise des points limites. Ceci se traduit par une visite quotidienne à l'animalerie pour contrôler le bien-être des animaux, l'enrichissement des cages autant que faire se peut, le respect des normes liées aux surfaces/volumes des cages pour éviter la surpopulation ainsi que celles liées aux plages acceptables pour la température et l'hygrométrie.

19788 Malgré des efforts considérables pour lutter contre le cancer et trouver un traitement efficace, cette pathologie reste l'une des principales causes de décès chez l'homme en France et dans le monde. L'un des problèmes majeurs des différentes approches anticancéreuses est leur incapacité à éliminer la totalité des cellules tumorales, conduisant ainsi à une récurrence tumorale souvent fatale. La nature de ces cellules cancéreuses résistante reste largement inconnue et débattue.

Parallèlement à cette constatation, la contribution au développement et à la résistance tumorale d'un type cellulaire particulier, la cellule sénescence, et de plus en plus étudié. En effet, la sénescence est un processus qui se caractérise par un blocage définitif de sa capacité à se reproduire, par exemple si elle semble devenir cancéreuse. La sénescence serait donc un mécanisme de défense contre le cancer.

Néanmoins, les cellules sénescences étant incapables de se diviser pourraient résister aux traitements anticancéreux ciblant justement les cellules qui se multiplient. De plus, ces mêmes traitements pourraient favoriser l'apparition de cellules sénescences. Par conséquent, la sénescence pourrait également favoriser les récurrences tumorales.

Nous spéculons donc que la sénescence n'est pas forcément une barrière définitive mais pourrait être outrepassée, permettant ainsi à des cellules potentiellement tumorales de survivre aux traitements pour finir plus tard leur transformation en cellules cancéreuses et ainsi expliquer les récurrences tumorales.

Le but du projet est de déterminer comment les cellules sénescences peuvent contribuer au développement tumoral avant et après l'utilisation de traitements anticancéreux. Il pourrait mener à une amélioration des traitements, notamment en diminuant le nombre de récurrences en choisissant, par exemple, de cibler les cellules sénescences ou en privilégiant les traitements produisant moins de cellules précancéreuses de ce type.

Pour cela, nous utiliserons un modèle murin disponible commercialement développant des lymphomes. Ce phénotype est considéré comme dommageable étant donné que les tumeurs se développent spontanément à partir de 15-20 semaines. Néanmoins, celles-ci sont facilement identifiables et mesurables car elles apparaissent au niveau des ganglions du cou, permettant ainsi de suivre le développement tumoral assez facilement. Cela nous permettra donc de sacrifier les souris avant que leur bien être ne soit impacté, d'autant plus qu'aucun autre effet indésirable n'est associé à ce développement tumoral. De plus ce type de cancer n'est pas métastatique.

Ce modèle présente également l'intérêt de répondre très bien à des injections de traitements anticancéreux (régression de la tumeur après une seule injection de cyclophosphamide en quelques jours) tout en produisant généralement des récurrences deux à quatre semaines plus tard. A cause de la composante tumorale, les procédures du projet seront classées comme « sévères ».

Ce modèle murin pro-cancéreux sera modifié par l'ajout d'un système qui peut soit marquer les cellules sénescences, soit les tuer, suivant ce que l'expérimentateur décidera. De cette manière, nous pourrions localiser les cellules sénescences avant et après traitement, mais également voir l'impact de leur délétion sur le développement des tumeurs puis sur la récurrence. En effet, une partie des souris recevra également de la cyclophosphamide dès l'apparition des tumeurs.

Les temps d'apparition des tumeurs, l'efficacité de la cyclophosphamide, et l'observation de la composition des tumeurs collectées après euthanasie des souris, donneront de précieuses informations pour répondre aux questions du projet.

Ce projet nécessitera 5 ans et impliquera 624 souris. Elles seront toutes sacrifiées à l'issue des procédures.

Description de notre application de la règle des 3 R:

-Le remplacement : Un modèle in vivo est indispensable pour ce projet à cause de la diversité des types cellulaires impliqués dans la sénescence, le développement tumoral et la récurrence tumorale ainsi que de la complexité de leurs interactions. Il est donc essentiel de réaliser des expériences sur un modèle murin.

-La réduction : le nombre d'animaux utilisés dans ce projet a été calculé afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs tout en limitant au maximum le nombre d'animaux. Nous utiliserons notamment le logiciel « Gpower » pour déterminer la taille de nos différents groupes. Ayant une grande expérience de ce modèle tumoral, nous avons également une idée précise de ce que sera la mortalité au sein de nos groupes et ainsi pu évaluer leurs tailles en conséquence.

Étant donné que nous aurons besoin de maintenir la lignée murine au moins 5 ans et que nous ferons des groupes d'au moins 20 animaux, nous évaluons le nombre de souris nécessaire à 624.

-Le raffinement : 1) les animaux seront observés quotidiennement et les tumeurs mesurées par un pied à coulisse numérique. 2) un examen clinique individuel sera réalisé min 2 fois par semaine à l'aide d'une grille de score adapté au modèle, permettant de suivre l'état de santé de l'animal et le développement tumoral. La fréquence de ces examens pourra être intensifiée en fonction du stade et du type de cancer, ainsi que de l'âge de la souris. 3) Les points limites ont été définis afin d'anticiper toute souffrance à l'animal. 4) Par souci de respect des rapports hiérarchiques établis entre souris, les groupes expérimentaux seront formés au moment du sevrage, et conservés intacts jusqu'à ce que les animaux soient utilisés pour la reproduction. 5) Les cages sont enrichies à l'aide de matériaux permettant l'expression des besoins comportementaux et physiologiques de l'espèce.

19789 La compréhension des adaptations physiologiques est un enjeu de recherche crucial dans le contexte des changements globaux. Il s'agit notamment de comprendre comment les besoins énergétiques et hydriques vont influencer la réponse des espèces. Les reptiles sont des modèles particulièrement pertinents et notamment les vipères Européennes avec des répartitions qui reflètent des climats contrastés. Si la plupart des espèces ne coexistent pas, il existe des zones de contact avec des hybridations possibles. C'est le cas au Nord de l'Espagne où la vipère aspic (*Vipera aspis*, espèce de climat frais) rentre en contact avec la vipère de lataste (*Vipera latastei*, espèce Méditerranéenne). Des formes hybrides sont observées dans cette zone de contact et ont préalablement fait l'objet d'études génétiques.

Nous allons étudier la physiologie (consommation d'oxygène et pertes hydriques) pendant la gestation chez les femelles des deux espèces et les femelles hybrides. Nous échantillonnerons donc 3 groupes (deux espèces et la forme hybride) sur une base de 15 femelles maximum par groupe ce qui amène à un effectif maximal de 45 individus. Les femelles seront capturées en fin de printemps (début de gestation) et amenées en captivité pendant 2 mois. Les mises-bas auront lieu en captivité (225 au maximum sur une base de 5 nouveau-nés par femelle) et l'ensemble des animaux sera relâché à l'automne sur le lieu de captures. L'effectif total sera donc de 270 individus au maximum.

Deux procédures seront réalisées. Sur les femelles gestantes nous mesurerons les échanges gazeux de façon non invasive pour quantifier la consommation d'oxygène et les pertes hydriques. Une prise de sang sera réalisée après les mises-bas. Il sera alors possible de comparer l'importance des budgets énergétiques et hydriques pendant la reproduction et comprendre l'impact des conditions environnementales sur la physiologie. A la naissance les jeunes vipères disposent de réserves corporelles qui permettent l'activité et la croissance sans prise alimentaire ni consommation d'eau. Nous étudierons la réponse des nouveau-nés à une restriction hydrique modérée.

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

- Remplacement: les questions étudiées concernent spécifiquement deux espèces de vipères Européennes avec hybridation naturelle. Il n'est pas possible de remplacer par d'autres espèces ou bien par d'autres processus.
- Réduction: à l'aide de tests de puissance, nous avons réduit au minimum les effectifs par groupe (15 femelles) pour pouvoir détecter des effets interprétables statistiquement. Les données seront analysées avec des modèles linéaires mixtes
- Raffinement: les conditions de maintien en stabulation et lors des procédures seront optimisées avec un enrichissement du milieu (différents abris, substrat) répondant aux besoins des espèces

19790 La thrombose veineuse (TV) représente la troisième cause de mortalité cardiovasculaire dans les pays industrialisés. C'est une pathologie fréquente (incidence annuelle 1/1000) avec une mortalité de 20% après un an. Une protéine n'ayant jamais été associée à la coagulation a récemment été identifiée comme étant associée à la TV (risque accru de 30% selon le polymorphisme du gène exprimé chez l'individu). Cette protéine appelée CTL-2 (choline transporter-like protein 2) code pour une protéine appelée Slc44a2 donc les fonctions sont encore mal connues à ce jour. Elle est notamment présente à la surface des neutrophiles et des plaquettes, qui sont des cellules circulantes très importantes dans le développement de la TV.

Des études chez l'homme ayant montré que CTL-2 était associée à la TV, nous aimerions étudier les mécanismes liant cette protéine à la TV. Pour cela nous nous proposons dans un premier temps de regarder dans un modèle TV chez la souris, si là aussi CTL-2 influence la TV. Une réduction de la thrombose dans les souris déficientes en CTL-2 nous offrirait ainsi un nouveau modèle pour étudier les mécanismes liant CTL-2 à la TV in vivo.

Nous utiliserons des souris sauvages ou déficientes en CTL-2 pour étudier la TV. Pour ce projet nous prévoyons d'utiliser un maximum de 75 souris C57BL/6J comprenant souris sauvages, déficientes et hétérozygotes pour l'expression de la protéine CTL-2.

On étudiera la thrombose chez ces souris 6h et 48h post induction du thrombus. Pour chaque temps les souris seront réparties en 2 groupes en fonction de leur génotype. (procédure effectuée sur 2 temps, avec 3 ou 2 génotypes à chaque fois selon le temps de thrombose).

Les animaux seront hébergés par groupe de 4-5 individus/cage et auront un accès ad libitum à la nourriture et à l'eau tout le temps. Un délai minimum de 72 heures entre la réception des souris et la date de la première intervention sera respecté. Tous les actes invasifs seront réalisés sous anesthésie générale par sévoflurane.

Nous appliquerons la règle des 3R.

Aucune autre méthode alternative in vitro ou in silico ne permet de satisfaire l'objectif de remplacement à notre connaissance.

Concernant l'objectif de réduction nous avons limité nos travaux aux expériences indispensables pour répondre à notre question scientifique. (avec risque alpha de 5% et une puissance atteinte de 80%).

L'objectif de raffinement a été pris en compte : nous ferons notre possible afin de diminuer les contraintes imposées aux animaux en renforçant leur confort: hébergement avec milieu enrichi (igloo de cages, enrichissement foisonnant à base de frisure de papier, nid végétal à base de fibres courtes de coton), anesthésie et analgésie pour supprimer la douleur et le stress, diminution du stress en séparant animaux lors de l'hébergement et l'expérimentation.

Nous avons établi des points-limites, et nous avons prévu de maximiser les données obtenues en mesurant un maximum de paramètres pour chaque animal (i. e: formation d'un thrombus, poids et taille du thrombus, étude immunohistochimique, mesure de marqueurs plasmatiques...).

19791 Le cancer de la langue est un cancer de mauvais pronostic, il est donc nécessaire d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour mieux appréhender le protocole thérapeutique des patients. Notre peptide est issu de la dégradation de l'élastine, protéine responsable de l'élasticité des tissus. Il est libéré dans des conditions physio-pathologiques dans l'organisme. Lors de la progression

tumorale, l'élastine est davantage dégradée et ce peptide se retrouve en quantité plus importante dans l'organisme. Nous avons montré que ce peptide stimule la migration de cellules du cancer de la langue en culture. A partir de données de la littérature, nous avons identifié un antagoniste potentiel du peptide. Nous avons testé sa capacité à inhiber l'action du peptide in vitro sur la migration des cellules de cancer de la langue.

L'objectif de cette étude est de vérifier in vivo que l'antagoniste identifié est capable de bloquer l'action pro-tumorale du peptide.

Afin de répondre à cette question, le recours à l'expérimentation animale est nécessaire car il n'existe pas, à l'heure actuelle, de méthode alternative permettant de modéliser de manière fiable le comportement des cellules cancéreuses dans un organisme entier vivant. Le comportement de ces cellules dépend de très nombreux facteurs et notamment de son environnement direct (matrice extracellulaire, composante inflammatoire...).

La souris immunodéficiente (présentant un thymus atrophié) a été retenue car elle est appropriée à la mise en place d'un modèle tumoral et son caractère consanguin renforce la probabilité d'une pousse tumorale homogène.

Quatre groupes ont été défini : groupe contrôle, groupe traité avec le peptide, groupe traité avec l'antagoniste seul, groupe contenant le peptide et son antagoniste.

Les injections des cellules tumorales se feront en sous cutanée sur des souris anesthésiées. Une fois la mise en évidence de la présence de la tumeur et selon leur groupe d'appartenance, elles recevront, via des injections en intra péritonéale, une solution contenant le peptide et/ou l'antagoniste ou une solution saline (groupe contrôle). La croissance tumorale des souris sera mesurée tous les 2 jours. Les souris seront également analysées par imagerie préclinique afin d'évaluer la vascularisation tumorale. Des études sur les tissus seront également réalisées après mise à mort de la souris et excision des tumeurs afin d'étudier l'influence des 2 effecteurs sur la prolifération des cellules tumorales, leur migration, ainsi que la vascularisation tumorale.

Le bien-être des animaux sera assuré : (i) en respectant une période d'acclimatation de 7 jours après réception ; (ii) en hébergeant les animaux en groupe et en conservant autant que possible les groupes formés afin de maintenir la stabilité hiérarchique établie ; (iii) en leur mettant à disposition un enrichissement matériel spécifique à l'espèce utilisée.

Des critères d'interruption ou « points limites » seront définis via une grille d'évaluation tout au long de ces études : un suivi clinique quotidien des animaux sera réalisé afin de détecter tout signe anormal, le volume tumoral moyen des souris avec le peptide ne devra pas excéder 1 cm³. Toute modification du comportement de l'animal (prostration, isolement, anxiété, troubles de l'équilibre et/ou diminution de la réponse aux stimuli) ou d'une variation significative du poids (20% de perte ou gain de la masse corporelle) seront une indication pour juger de la nécessité ou non de la mise à mort de l'animal. Si l'animal présente une ulcération au niveau de la tumeur, ce dernier sera également euthanasié.

Toute anomalie clinique sera rapportée au responsable sanitaire de l'établissement. Des mesures thérapeutiques seront prises pour traiter les animaux en fonction des signes cliniques observés (injection de fluides / analgésiques, isolement, réchauffement, etc).

Une étude pilote (procédure 1) comportant 5 souris par groupe permettra de mettre en évidence la variabilité et de déterminer le nombre d'animaux nécessaire pour l'étude statistique (procédure 2). L'étude ne dépassera pas l'utilisation de 10 souris par groupe soit 40 souris pour l'ensemble de l'étude.

La procédure démarrera à l'injection des cellules tumorales et se terminera lorsque le volume tumoral des souris avec le peptide (pro tumoral) atteindra 1 cm³, par euthanasie, soit une durée de 3 à 4 semaines.

Le projet s'inscrira sur une durée de 3 ans.

19792 La paralysie cérébrale (PC) de l'enfant est un handicap grave (incidence 2 à 3/ 1000 naissances) et pour l'instant intraitable lié à une ischémie cérébrale néonatale. Des essais cliniques à l'aide de

cellules souches mésenchymateuses (CSM) ont été réalisés car ces cellules sont connues pour stimuler la réparation du tissu nerveux après leur administration. Cependant, les limitations majeures de la plupart des études non cliniques et cliniques restent le manque de caractérisation des cellules implantées, la survie des CSM implantées, et leur accès au sein même du tissu cérébral. Nous avons développé une approche permettant de dépasser ces limitations en fournissant un support polymérique en 3-dimensions aux cellules lors de leur administration au plus près de la lésion, la substance blanche périventriculaire. Cette approche, associant une sous-population homogène de cellules portées par des « microcarriers » biodégradables, permet d'augmenter la survie de cellules transplantées et leur efficacité dans différents modèles murins des lésions cérébrales. L'ensemble constitue un Médicament de Thérapie Innovante (MTI). Avant de réaliser la première étude clinique, nous devons confirmer nos résultats et l'absence de complications dans un modèle de gros animal reproduisant les lésions de la PC. Nous avons choisi le porcelet car son cerveau possède des circonvolutions et un rapport substance blanche/substance grise très proche de celui de l'homme. Le développement du système nerveux est aussi similaire à celui de l'homme, il est ainsi considéré comme un bon modèle en recherche neuropédiatrique. Ce projet de stratégie chirurgicale a été réalisé mais les animaux contrôles manquent à l'étude. Jusqu'à présent, nous avons caractérisé la lésion ischémique et ensuite utilisé ce modèle pour réaliser les objectifs de l'étude, qui sont : 1) de montrer la survie des cellules souches après implantation intracérébrale dans le modèle porcelet de PC ; 2) d'évaluer la capacité du MTI à réparer une lésion ischémique et d'étudier la réaction cellulaire à l'implantation du MTI dans le cerveau. Pour réaliser cette étude d'une stratégie chirurgicale, nous avons utilisé un total de 28 porcelets de race Large White. Dans le cadre des 3R ; i) remplacer : le recours aux porcelets néonataux est indispensable car notre étude nécessite de travailler sur un gros animal dont la taille, la physiologie et la maturation cérébrale est proche de celle de l'homme. Le porcelet est un modèle unanimement reconnu dans la littérature, la seule autre alternative est le primate non-humain ; ii) réduire : le nombre d'animaux est calculé pour avoir suffisamment de points d'analyses et de résultats exploitables, et est suffisamment faible pour ne pas imposer des souffrances à d'autres animaux. La méthodologie associe des imageries et des contrôles histologiques pour multiplier les points d'analyse sans augmenter le nombre d'animaux; iii) raffiner : l'implémentation de chaque étape du projet est soumise à la validation de l'étape précédente. La chirurgie se fait sous anesthésie par un neurochirurgien et les animaux sont monitorés tout au long de l'intervention qui est de courte durée. On assure aussi des conditions de confort et de sécurité pour les animaux et de reproductibilité optimale. Les points limites de souffrance sont anticipés et l'animal sera euthanasié s'il atteint ce point limite. Nous avons développé un modèle de lésion ischémique de la substance blanche périventriculaire reproductible. Le principe de la chirurgie est le même que celui d'interventions réalisées couramment chez l'homme, telles les biopsies cérébrales stéréotaxiques, connues pour être peu douloureuses et bien tolérées. Par la suite, nous avons implanté le MTI en intracérébral au plus près de la lésion dans le but de la réparer. Nous avons établi et validé la faisabilité et la bonne tolérance de l'implantation intracérébrale de MTI dans notre modèle porcin de PC. Les cellules se retrouvent bien dans la substance blanche périventriculaire à proximité de la zone germinative sous ventriculaire et survivent à 1 mois après implantation. Aucun effet secondaire ni réaction cellulaire importante due à l'implantation n'a été à déplorer. Il n'y a eu aucune mortalité directe liée à l'implantation en elle-même. Nous voulons maintenant continuer l'étude et rajouter 6 animaux contrôles à la saisine pour valider convenablement les premiers résultats obtenus suite à l'implantation du MTI. La preuve de concept de l'efficacité de ce MTI chez le modèle de porcelet permettra de mieux établir le bénéfice apporté par cette stratégie de réparation déjà démontrée chez les rongeurs. Une fois la preuve de concept obtenue, nous pourrions continuer avec le développement de ce MTI pour une étude clinique de phase I/II chez l'enfant.

19793 Les maladies chroniques du foie sont fréquentes. Ainsi, en France, on estime qu'il y a environ 700 000 malades atteints de cirrhose. La stéatohépatite non alcoolique (NASH) est une des principales causes de maladies chroniques du foie, son incidence en France et dans le monde ne cesse d'augmenter avec l'augmentation du nombre de personnes obèses et diabétiques.

La NASH est une manifestation hépatique liée à l'obésité, le diabète, l'hypertension artérielle et à l'augmentation du cholestérol/triglycérides dans le sang. Elle se manifeste par une accumulation du gras dans le foie, une inflammation et une mort des cellules du foie.

Il n'existe aucun agent thérapeutique efficace pour le traitement de cette maladie qui peut malheureusement évoluer vers la fibrose hépatique (inflammation et perturbation des mécanismes du foie), puis vers la cirrhose, et cette dernière complication peut évoluer vers le cancer du foie. Les mécanismes responsables de ce cancer ne sont pas bien élucidés, et le seul traitement pour les patients reste la greffe de foie.

Les cellules endothéliales hépatiques sont les cellules qui tapissent la face interne des vaisseaux sanguins du foie. Ce sont les premières cellules en contact avec le sang qui irriguent le foie. Bien que leur rôle soit mal identifié, elles semblent importantes dans le développement du cancer du foie chez les patients atteints de NASH.

L'autophagie est un mécanisme cellulaire important par lequel la cellule recycle et nettoie son contenu. Elle est de plus en plus décrite comme impliquée dans les cancers, mais son implication dans le cancer du foie est controversée et non encore élucidée.

Ce projet a pour but de mettre en évidence le rôle de l'autophagie endothéliale dans le développement du cancer du foie dans le contexte de la NASH.

Il n'existe pas de modèle *in vitro* reproduisant de manière fiable la NASH et le cancer du foie. L'utilisation de modèles animaux est donc essentielle. C'est vers des modèles de souris que se porte notre choix car des souris transgéniques (phénotype non dommageable) existent permettant de supprimer spécifiquement des protéines de l'autophagie. Nous utiliserons (1) des souris mâles et femelles car le cancer du foie touche les deux sexes, (2) un régime alimentaire gras/sucré pour induire une obésité et un diabète (pendant 1 an pour le modèle de cancer et 6 mois pour le modèle fibrose), (3) le tétrachlorure de carbone (une injection sans anesthésie en intrapéritonéale, 1 fois par semaine pendant 6 mois) pour induire la fibrose, (4) l'agent carcinogène (une seule injection sans anesthésie de diethylnitrosamine en intrapéritonéale chez les souris à l'âge de 2 semaines) pour induire un cancer dans le foie, (5) et un anticancéreux (une injection en intrapéritonéale, 2 fois/semaine, pendant 2 mois) pour voir les effets sur le développement du cancer.

Protocole expérimental (pour les deux lignées déficientes en autophagie endothéliale) :

1) Pour étudier le rôle de l'autophagie endothéliale dans le développement du cancer sur NASH selon un processus accéléré sans fibrose (observé chez 25% des patients), 240 souris recevront l'agent carcinogène à l'âge de 2 semaines (date de début du protocole), elles seront réparties ainsi [60 souris nourries avec un régime normal, 60 nourries avec un régime gras/sucré, 60 nourries avec le régime normal et traitées avec le médicament anticancéreux, 60 souris nourries avec le régime gras/sucré et traitées avec l'anticancéreux] et 20 souris contrôles sans carcinogène seront utilisées. La durée du protocole sera de 14 mois.

2) Afin d'étudier le rôle de l'autophagie endothéliale dans le développement du cancer du foie sur NASH en passant par la fibrose, nous utiliserons un modèle de tétrachlorure de carbone associé au régime gras/sucré. Les deux mêmes lignées de souris (âgées de 2 mois) seront utilisées. La durée du protocole sera de 8 mois. 240 souris recevront une seule injection de diethylnitrosamine, elles seront réparties ainsi : [60 souris nourries avec un régime normal, 60 nourries avec un régime gras/sucré, 60 nourries avec le régime normal et traitées avec le médicament anticancéreux, 60 souris nourries avec le régime gras/sucré et traitées avec l'anticancéreux], et 20 souris contrôles sans diethylnitrosamine seront utilisées. La durée du protocole sera de 8 mois.

En conformité avec la loi des 3R (réduction, remplacement, raffinement), plusieurs mesures seront mises en place.

Pour le remplacement : les connaissances issues de cette étude *in vivo* ne peuvent pas être obtenues actuellement par d'autres méthodes, compte-tenu de la complexité de la cancérogenèse dans ce contexte de NASH. Ce modèle permettrait d'étudier le cancer du foie dans son environnement et ses interactions avec les différentes cellules qui l'entourent, notamment les cellules endothéliales qui jouent un rôle important dans le développement tumoral. Des études *in*

vitro ont été réalisées en amont, elles compléteront ce volet d'expérimentation animale sans pouvoir le remplacer.

Pour la réduction : des expériences in vitro sur cellules en cultures seront effectuées avant toute expérience animale dans le but de seulement valider chez l'animal ce qui aura été identifié in vitro. Ceci permettra donc de réduire le nombre d'animaux qui sera utilisé. Le nombre d'animaux nécessaire à ce projet a été calculé de manière à utiliser le minimum de souris tout en assurant des résultats robustes scientifiquement et statistiquement. Nous utiliserons un groupe de souris contrôle pour chaque étude (fibrose et cancer) pour pouvoir comparer qui ont le même âge car ce facteur peut influencer les résultats.

Pour le raffinement : les méthodes et mesures choisies visent à diminuer au maximum les contraintes imposées aux animaux. Un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables. Une anesthésie générale sera effectuée lors des procédures douloureuses et l'utilisation d'antalgique sera envisagée si l'animal présente des signes de douleur tout au long de l'expérimentation.

Le soin et le suivi des animaux seront faits par des personnes compétentes et expérimentées. Une grille avec un score de souffrance de l'animal et des points limites ont été définis, de manière adaptée au projet, afin d'éviter toute souffrance inutile. Si l'animal atteint un score limite, il sera euthanasié.

A terme, les résultats de ce projet permettront de mieux comprendre la physiopathologie des maladies du foie qui conduisent au cancer et d'identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement de ces maladies qui souffrent du manque d'agents thérapeutiques efficaces. Au final, ce projet nécessitera l'utilisation de 520 souris sur 5 ans. Tous les animaux seront euthanasiés à la fin du projet.

19794 La pandémie Covid-19 est devenue une priorité sanitaire dans le monde. A ce jour, l'arsenal thérapeutique prévenant les formes graves et limitant la multiplication est très limité. Nos études menées in vivo et in vitro ont montré que lors de l'infection, un récepteur couplé aux protéines G(RCPG) à la surface des cellules immunitaires était sur-exprimé. Selon la bibliographie dans d'autres contextes, ce récepteur, lorsqu'il est activé, induit un emballement de la réponse inflammatoire qui cause des dégâts tissulaires. Le contrôle de ce récepteur pourrait permettre un contrôle de l'infection et donc améliorer la prise en charge des patients. Dans ce contexte, il est indispensable de pouvoir avoir une démonstration in vivo de l'efficacité d'un antagoniste, qui ouvrirait de nouvelles perspectives thérapeutiques ou préventives des formes graves de Covid-19. Plus précisément, nos études menées à l'échelle cellulaire ont montré que le virus SARS-CoV-2 induisait une surexpression du récepteur que nous souhaitons étudier chez les macrophages. Aussi, nous avons montré avec nos collaborateurs que chez des animaux expérimentalement infectés par le virus, il y avait, au niveau des poumons (macrophages), une surexpression de ce récepteur. Dans ce contexte, le but de notre étude est d'évaluer un antagoniste du récepteur d'intérêt sur la réponse immunitaire chez des souris infectées expérimentalement par le virus. L'efficacité de l'antagoniste sera évaluée en association ou non avec un antiviral.

Pour cela, 360 souris seront utilisées. Cette étude a été rédigée et pensée de manière à respecter la règle des 3 R (Remplacement, Réduction, Raffinement).

L'objectif de notre étude est d'évaluer l'effet d'un antagoniste du récepteur que nous avons identifié en association avec un antiviral. Cette évaluation requiert un suivi de plusieurs paramètres (charge virale, recrutement des cellules immunitaires, dosages de facteurs solubles...) qui peuvent être appréciés uniquement dans un modèle animal.

Le bien-être animal a été l'une des priorités dans la conception de cette étude mais nous ne pouvons à ce stade nous passer d'utiliser des animaux, c'est pourquoi nous n'utiliserons que le nombre d'animaux nécessaires pour mener à bien cette étude et tous les résultats obtenus seront utilisés et exploités. Le nombre d'animaux dans chaque lot a été pensé pour permettre de collecter des données statistiquement fiables sans pour autant exagérer leur nombre.

Afin de raffiner les conditions de vie des souris, un suivi adapté des animaux a été instauré afin de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, mais aussi la détresse ou l'angoisse qu'elles pourraient éprouver. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux et bénéficient d'un enrichissement adapté (cabanes, papier, tubes en carton). Un suivi régulier sera effectué sur l'ensemble des animaux et des indicateurs comportementaux et physiques sont prédéfinis et constituent les points limites. Ce projet s'inscrit ainsi dans une gestion éthique de l'expérimentation animale et est donc en accord avec les réglementations européennes et françaises de bonnes pratiques de laboratoire. Ce projet ne débutera que lorsque l'APAFIS ci présent aura été validé par le comité d'éthique et le ministère. Toutes les expérimentations seront réalisées dans un niveau de confinement 3.

19795 Le but de notre équipe est de créer et/ou de caractériser des modèles animaux de maladies musculaires humaines (myopathies) et de tester l'éventuelle amélioration du phénotype grâce à différentes approches de thérapie génique. Notre travail est principalement axé sur des maladies génétiques affectant les muscles, les myopathies centronucléaire. Ces pathologies impliquent notamment une perte de la force musculaire et potentiellement une paralysie progressive des membres. Dans le but de mieux comprendre les fonctions des protéines impliquées dans ces pathologies et leurs interactions, nous prévoyons d'utiliser un modèle murin pour les myopathies centronucléaire récessives. En effet seul le modèle animal permet d'étudier d'une part la physiopathologie et d'autre part l'amélioration des symptômes (REPLACEMENT).

Le but de cette étude est d'évaluer le potentiel effet bénéfique d'une thérapie génique appliquée à un stade de développement tardif de la myopathie afin de mieux comprendre le mécanisme d'action du traitement, mais également dans le but de développer une thérapie applicable aux patients déjà atteints.

Nous avons précédemment obtenu de bons résultats en utilisant le même traitement sur la même lignée de souris en injectant les souriceaux à un stade précoce, avant la déclaration de la maladie. Nous prévoyons à présent d'utiliser ces souris modèles de la myopathie centronucléaire récessive en leurs administrant le traitement à 8 semaines d'âge : période à laquelle la maladie est déjà déclarée.

Les souris seront injectées intramusculairement dans chacune des pattes arrière, soit avec le traitement soit avec une solution contrôle. Ainsi en comparant les deux pattes, chaque souris sera son propre contrôle, permettant ainsi de réduire le nombre d'animaux requis pour atteindre la puissance statistique nécessaire. (REDUCTION)

Nous mesurerons la force musculaire de chaque patte, chaque semaine à partir de 6 semaines d'âge et jusqu'à 16 semaines pour observer l'effet du traitement sur l'évolution de la maladie.

Puis après sacrifice, nous prélèverons les muscles injectés pour effectuer des analyses complémentaires.

Les myopathies sont des maladies qui affectent les muscles pouvant entraîner des difficultés pour se déplacer, de la nourriture liquide est placée dans la cage si nous observons ces difficultés. Afin de s'assurer que les animaux ne souffrent pas, ils seront surveillés quotidiennement. Tout signe de douleur sera pris en charge en prenant les mesures appropriées en fonction du niveau de douleur observé (soit un analgésique sera administré, soit les animaux seront euthanasiés prématurément si nécessaire). De plus lorsque cela est possible nous effectuerons plusieurs procédures expérimentales sous la même anesthésie. Après anesthésie les souris seront placées sur une plaque chauffante le temps de leurs réveil. (RAFFINEMENT).

Pour cette étude nous prévoyons d'utiliser uniquement des souris mâles en raison des différences de musculatures entre mâles et femelles.

Nous prévoyons ainsi d'utiliser 10 mâles myopathes et 10 mâles sains.

19796 Le lupus érythémateux disséminé ou systémique (SLE) est une maladie auto-immune c'est à dire que le corps fabrique des anticorps qui attaquent et détruisent les tissus sains. La présence de ces anticorps induit un emballement du système immunitaire et crée une inflammation chronique qui peut toucher toutes les parties du corps. En effet, les patients atteints de SLE peuvent présenter

des lésions cutanées ou des muqueuses, mais également des atteintes articulaires, rénales, neurologiques, cardio-pulmonaires ou gastro-intestinales.

Cette maladie évolue avec des poussées d'un degré de sévérité variable et des périodes de rémission où les symptômes s'améliorent. Elle touche principalement les femmes entre 15 et 45 ans. Le traitement du lupus fait appel à plusieurs moyens thérapeutiques. Les traitements médicamenteux sont nécessaires pour la gestion des manifestations du lupus. Les traitements par anti-inflammatoires ou corticoïdes par voie orale représentent le traitement de fond du lupus mais sont à éviter sur le long terme. Le traitement des formes sévères repose sur la corticothérapie seule ou associée aux immunosuppresseurs. D'autres médicaments qui agissent sur le « dérèglement immunitaire » sont disponibles ayant pour objectif de maintenir en rémission la maladie et de réduire la corticothérapie. Toutefois l'utilisation prolongée de ces traitements peut entraîner des effets secondaires lourds. Les corticoïdes peuvent par exemple provoquer une hypertension, des troubles du sommeil et de l'humeur, une prise de poids, la fonte musculaire ou encore une ostéoporose (déminalisation des os), déjà favorisée par la maladie seule. Quant aux immunosuppresseurs, ils privent le corps de ses défenses immunitaires, ouvrant alors la voie aux infections.

Il est donc nécessaire de continuer de développer des médicaments ciblant mieux les mécanismes d'action de la pathologie. Pour cela nous devons évaluer, sur des modèles physiologiques intégrés, l'impact de nouveaux candidats pharmacologiques ou cellulaires pour mieux traiter cette pathologie. La complexité de cette maladie nécessite de pouvoir faire la preuve de concept et d'efficacité dans un organisme intégré comme l'animal. Ce projet vise à étudier l'effet de nouvelles molécules sur le développement du SLE dans un modèle murin développant spontanément la maladie. En effet ces souris génétiquement modifiées développent les premiers symptômes de la maladie vers 12 semaines. Dans ce contexte, nous évaluerons l'impact des molécules à tester, administrées en préventif et/ou en curatif, sur la production d'auto-anticorps, l'apparition de lésions cutanées mais également sur la fonction rénale en dosant différents marqueurs dans les urines. La procédure comportera un groupe de 15 souris contrôles ne développant pas la maladie, un groupe de 15 souris développant la maladie et traitées avec une molécule contrôle et un groupe de 15 souris développant la maladie et traitées avec la molécule à tester. A raison d'une étude par an, nous envisageons d'utiliser 225 souris sur la totalité du projet.

Dans le respect de la règle des 3R, et lorsque cela est possible ces candidats sont évalués sur culture cellulaire ou organe isolé préalablement aux tests animaux afin de remplacer ou de réduire le nombre d'animaux impliqués dans les protocoles. Nous utiliserons le nombre minimum de souris nécessaire à une analyse statistique (log rank test, T test, Anova) en prenant en compte la variabilité inter-individuelle mais également le risque de décès précoce dû à la maladie. D'autre part, un raffinement des protocoles sera effectué en fonction des avancées technologiques dans le domaine. Les souris sont hébergées selon les conditions de la nouvelle réglementation 2010/63 en unités ventilées de type III ou IV avec enrichissement de l'environnement (composants de nidification et igloo). Chaque animal entrant dans une étude disposera d'une fiche individuelle de suivi sur laquelle tout traitement et observation seront reportés. L'état de santé des animaux sera évalué quotidiennement selon des critères d'apparence physique (perte de poids significative, gêne respiratoire. . .) et comportementaux (souris prostrée, agressivité. . .) définis en accord avec le comité de suivi du bien-être animal de notre établissement.

19797 L'hyperactivité vésicale est une entité complexe redéfinie par l'International Continence Society en 2002 comme un syndrome clinique nécessitant au moins l'existence d'une urgenterie, associée ou non à une incontinence et généralement associée à des contractions involontaires du détroleur (muscle lisse de la vessie). L'hyperactivité détrosorienne est définie par la survenue de contractions du détroleur non inhibées pendant la phase de remplissage, de façon spontanée ou provoquée.

Il existe 3 types d'hyperactivité détrosorienne: neurogène, non-neurogène et idiopathique selon qu'elle soit d'origine neurologique, urologique ou inconnue respectivement. Chez les blessés médullaires, les troubles urinaires observés sont quasi constants. Ils nécessitent toujours un bilan et une prise en charge adaptée en raison des complications uro-néphrologiques, engageant le pronostic vital. Après la phase de choc spinal (absence de reflexe mictionnel) où la vessie est flasque et acontractile, le tableau clinique et urodynamique dépend du niveau lésionnel. Les lésions médullaires situées au-dessous de T10 sont caractérisées par l'association d'une hyperactivité détrosorienne et d'une dysnergie vésico-sphinctérienne. Cette situation favorise la survenue de fuites d'urine et l'apparition d'un résidu post-mictionnel conduisant à des mictions reflexes fractionnées avec régime de pression élevé soutenu pouvant induire des complications sévères.

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

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

Dès leur arrivée dans la zone d'exploration fonctionnelle, les animaux seront hébergés dans les conditions définies par la directive européenne 2010/63/UE et un enrichissement sera introduit dans l'hébergement des animaux afin de les stimuler. Le nombre d'animaux nécessaire à ce projet sera de 780 en raison de 13 rats par groupe (minimum nécessaire pour l'obtention de 12 animaux inclus). En accord avec la règle de raffinement, les procédures anesthésiées seront réalisées sous anesthésie générale avec maintien de la température corporelle via l'utilisation de plaque chauffante thermorégulée. De plus après la lésion médullaire, les animaux seront traités pendant 7 jours avec un antibiotique afin de limiter les risques infectieux. Durant toute la période d'expérimentation, l'état général des animaux sera observé tous les jours, le suivi étant assuré par les zootechniciens certifiés de l'animalerie. Les animaux présentant des signes de souffrance, un amaigrissement important (perte supérieure à 20% du poids initial avant la chirurgie avec prostration, piloérection,...) et/ou une cavité abdominale gonflée associée à une prostration, piloérection ou des animaux présentant une automutilation seront sacrifiés.

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